



**MARINHA DO BRASIL**  
**INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA**

**THALITA DIONISIO BELMONTE**

**PISTAS QUÍMICAS EM INTERAÇÕES ECOLÓGICAS DO NUDIBRÂNQUIO *Cadlina rumia* Er. MARCUS, 1955 (MOLLUSCA, GASTROPODA)**

**ARRAIAL DO CABO / RJ**

**2023**

**THALITA DIONISIO BELMONTE**

**PISTAS QUÍMICAS EM INTERAÇÕES ECOLÓGICAS  
DO NUDIBRÂNQUIO *Cadlina rumia* Er. MARCUS,  
1955 (MOLLUSCA, GASTROPODA)**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia Marinha.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Daniela Bueno Sudatti  
Coorientador: Prof. Dr. Renato Crespo Pereira

**ARRAIAL DO CABO / RJ**

**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

B451p Belmonte, Thalita Dionisio

Pistas químicas em interações ecológicas do Nudibrânquio *Cadlina rumia* Er. Marcus, 1955 (Mollusca, Gastropoda) / Thalita Dionisio Belmonte. – Arraial do Cabo, 2023.

89 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Daniela Bueno Sudatti.

Coorientador: Renato Crespo Pereira.

Tese (Doutorado) – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e Universidade Federal Fluminense - IEAPM/UFF, Programa Associado de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, Arraial do Cabo, 2023.

1. Nubibranchia. 2. Espongivoria. 3. Interação presa-predador.  
I. Sudatti, Daniela Bueno. II. Pereira, Renato Crespo. III. Título.

CDD:660.6

**THALITA DIONISIO BELMONTE**

**PISTAS QUÍMICAS EM INTERAÇÕES ECOLÓGICAS DO NUDIBRÂNQUIO *Cadlina rumia* Er. MARCUS, 1955 (MOLLUSCA, GASTROPODA)**

Tese apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Marinha.

**COMISSÃO JULGADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Daniela Bueno Sudatti**

**UFF – Universidade Federal Fluminense**

**Professora Orientadora – Presidente da Banca Examinadora**

---

**Dra. Nathália Peixoto Nocchi Carneiro**

**Universidad de La Laguna - Espanha**

---

**Dr. Vinicius Padula Anderson**

**MN/UFRJ – Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro**

---

**Dr. Bernardo Antonio Perez da Gama**

**UFF – Universidade Federal Fluminense**

---

**Dr. Heitor Monteiro Duarte**

**NUPEM/UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé**

**Arraial do Cabo, 19 de julho de 2023.**

Dedico este trabalho aos meus sobrinhos gêmeos, Miguel e Theo.  
Eu amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas minhas conquistas e a minha família que sempre apoiou minhas escolhas e esteve presente em todos os momentos. Especialmente os últimos anos só me confirmaram que a família é o nosso bem mais precioso e é o que faz tudo valer a pena! Meus pais, Elisabeth e Humberto, não tenho palavras para externar o amor que sinto por vocês. Vocês sempre acreditaram em mim e me proporcionaram todas as condições para que eu pudesse realizar este trabalho. Vocês são meu exemplo de amor, dedicação e fidelidade.

Minha irmã Thaise, minha melhor amiga; que sorte a minha sermos irmãs! Meu exemplo de coragem e determinação, eu não teria conseguido enfrentar os desafios dos últimos anos sem você ao meu lado me dizendo que tudo ia dar certo! Agradeço também por, juntamente com o Jefferson, me darem a benção de ser madrinha dos gêmeos mais lindos.

Aos meus sobrinhos e afilhados, Miguel e Theo, que antes de nascerem já haviam mudado completamente a minha vida e me deram a força e coragem que eu precisava para concluir este trabalho. Tão pequenos e tão guerreiros, lutando pela vida nos primeiros meses neste mundo. Eu amo vocês meus 'curitibinhas'.

À minha avó Lindalva, que partiu durante a realização deste trabalho. Por um mês e a vacina poderia ter feito a diferença. Te amo vó! Iremos sempre honrar a sua memória.

À minha cachorrinha Mell, que foi meu apoio emocional até seus últimos dias ao meu lado e era companhia constante enquanto eu trabalhava no computador.

À minha orientadora, Dra. Daniela Sudatti (Universidade Federal Fluminense - UFF) e ao meu coorientador Dr. Renato Crespo (UFF) por me proporcionarem a oportunidade de realizar este trabalho, pelo auxílio com a criação do desenho experimental, pelas trocas de informações, sugestões, fornecimento de bibliografias e revisões de texto. Obrigada por todo apoio e ajuda na conclusão desta tese.

Aos membros do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM/UFF). À Tenente Beatriz Dutra, que, durante seu secretariado, sempre esteve disponível para tirar minhas dúvidas e me ajudou com toda a burocracia dos documentos.

Ao coordenador e professor do PPGBM Dr. Ricardo Coutinho (IEAPM), pelo auxílio e sensibilidade que teve comigo ao longo destes anos, sempre disposto a ajudar para que eu concluísse este trabalho.

Ao IEAPM, pela estrutura disponibilizada para a realização dos experimentos. Agradeço especialmente aos técnicos de laboratório, os biólogos Maurício Andrade e Márcio Farias pelo auxílio logístico durante minha necessidade em manter os organismos vivos no laboratório.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa da tese por aceitarem contribuir com meu trabalho.

Aos colegas de turma, Marcelo Tardelli, David Quintanilha, Patricia Quintanilha, Ubirajara Gonçalves, Débora Brito, Rodrigo Cumplido e Julia Bueno, pela excelente convivência durante os anos no IEAPM.

Agradeço aos que me ajudaram nas coletas e saídas a campo: Marcelo Tardelli, Débora Brito, Domênica Lima, Patricia Albuquerque, Debora Cedro, Ronaldo Mascarenhas Junior e Humberto Belmonte. Obrigada por estarem, sempre que possível, disponíveis a me acompanhar. Agradeço especialmente ao Dr. Marcelo Tardelli (IEAPM/UFF) por estar presente em praticamente todas as minhas coletas.

Ao Dr. Alexandre Kassuga pela identificação da espécie de caranguejo utilizada nos ensaios.

À Dra Maíra Cardoso, pelo auxílio com a análise estatística e pela disponibilidade em tirar minhas dúvidas a qualquer momento.

À minha querida amiga Dra. Suzi Ribeiro, pela ajuda em todos os momentos deste trabalho, inclusive na seleção para o doutorado. Agradeço pelo companheirismo, pela amizade, paciência, apoio e incentivo na minha vida pessoal e profissional. Obrigada pela disponibilidade, revisões de texto, críticas e sugestões. Obrigada pelas orações dedicadas à mim e minha família nos piores momentos que passamos.

À minha querida amiga Dra. Domênica Lima, por estar sempre disponível para tirar minhas dúvidas, pela ajuda nas coletas, pelo seu apoio e incentivo, pelas nossas trocas de informações e pelo empréstimo de material utilizado nos ensaios. Obrigada pela sua amizade, sua ajuda financeira e suas orações dedicadas à mim e minha família nos momentos que estivemos mais necessitados.

Aos meus queridos amigos Amanda, Domênica, Maíra e Oswaldo, que sempre apoiaram e acreditaram em mim. Pelas trocas de informações, referências bibliográficas, pelas críticas e sugestões ao longo deste trabalho. Pela convivência, pelas risadas, pelos memes, rs! Por toda a leveza que vocês trazem à minha vida. Quando me perdi no labirinto da minha mente, vocês estavam ao meu lado e nunca soltaram a minha mão. Pelas orações e pela ajuda financeira quando minha família mais necessitou. Passar pela turbulência foi um pouco 'mais leve' com vocês ao meu lado.

Às minhas amigas de uma vida toda, Ingrid e Roberta, que sempre apoiaram e incentivaram minhas escolhas. Ter vocês na minha vida é um presente! Obrigada por tudo, sempre!

À minha psicóloga Ana Cristina, pelo seu excelente trabalho, pelo incentivo e pela confiança em mim. Ter você neste momento foi fundamental na minha vida!

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por fornecer a licença necessária para as coletas dos organismos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado concedida para a realização desta tese.

A todas outras pessoas que por ventura não foram citadas.



“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”  
(João Guimarães Rosa – Trecho de ‘Grande Sertão: Veredas’)

## RESUMO

Diversos organismos marinhos utilizam pistas químicas liberadas na água do mar em vários contextos ecológicos, tais como forrageamento, busca por abrigo, encontro de parceiros para acasalamento e fuga de predadores. Os nudibrânquios são gastrópodes marinhos conhecidos por possuírem defesas químicas obtidas diretamente de suas dietas alimentares. Por possuírem baixa acuidade visual, lidam com a percepção quimiosensorial no meio aquático, utilizando os rinóforos e tentáculos orais, para realizar estas diferentes estratégias ecológicas citadas. O objetivo geral desta tese foi avaliar as interações ecológicas do nudibrânquio *Cadlina rumia* em relações intra- e interespecíficas, com ênfase na biologia comportamental e sinalização química das espécies envolvidas. Foram conduzidos ensaios controlados em laboratório, utilizando aquários em formato Y, a fim de verificar a resposta e o tempo de escolha de *C. rumia* para reconhecer pistas químicas ou odores liberados na água do mar por: **a.** sua presa, a esponja *Dysidea etheria* fresca e submetida à predação; **b.** seu predador, o caranguejo *Pachygrapsus transversus*; e **c.** seus coespecíficos. Também foram realizados ensaios para verificação da existência de interação tritrófica mediada por sinalização química indireta entre o potencial predador do nudibrânquio, o caranguejo *P. transversus*, *C. rumia* e sua presa *D. etheria*. Foi observado que *C. rumia* se dirigiu a pistas químicas provenientes de sua presa (esponja fresca ou previamente predada) e de seus coespecíficos, e exibiu comportamento de fuga aos odores provenientes do predador *P. transversus*. Os resultados dos ensaios de interação tritrófica não foram conclusivos, porém, indicaram uma possível interação entre as espécies citadas uma vez que os sinais químicos emitidos por *D. etheria* predadas por *C. rumia* mostraram uma tendência a serem reconhecidos pelo caranguejo. Conclui-se que nudibrânquios são hábeis em reconhecer diferentes pistas químicas, sendo esta uma importante estratégia para estabelecimento de interações ecológicas no ambiente natural. Diante dos escassos experimentos referentes à predação sobre nudibrânquios, os resultados de interação tritrófica fortemente encorajam que novos estudos sejam realizados sobre a temática a fim de avaliar os possíveis efeitos no comportamento das espécies de nudibrânquios e suas populações.

Palavras-chave: Nudibranchia; espongivoría; interação presa-predador; interações tritróficas; *Dysidea etheria*; *Pachygrapsus transversus*.

## ABSTRACT

Several marine organisms use chemical cues released into the seawater in various ecological contexts, such as foraging, seeking shelter, finding mating partners, and avoiding predators. Nudibranchs are marine gastropods known for possessing chemical defenses obtained directly from their diet. Due to their low visual acuity, they rely on chemosensory perception in aquatic environment, using their rhinophores and oral tentacles to carry out these different ecological strategies mentioned. This thesis aimed to evaluate the ecological interactions of the nudibranch *Cadlina rumia* in intra- and interspecific relationships, with an emphasis on behavioral biology and chemical signaling of the species involved. Controlled laboratory experiments were conducted using Y-maze aquarium to determine the response and choice time of *C. rumia* in recognizing chemical cues or odors released in the seawater by: **a.** its prey, the fresh and preyed-upon sponge *Dysidea etheria*; **b.** its predator, the crab *Pachygrapsus transversus*; and **c.** its conspecifics. Additional experiments were carried out to assess the existence of tritrophic interactions mediated by indirect chemical signaling between the potential predator of the nudibranch, the crab *P. transversus*, *C. rumia*, and its prey *D. etheria*. It was observed that *C. rumia* was attracted to chemical cues from its prey (fresh or previously consumed sponge) and its conspecifics, while exhibiting avoidance behavior towards odors emanating from the predator *P. transversus*. The results of the tritrophic interaction experiments were inconclusive; however, they indicated a possible interaction between the mentioned species, as the chemical signals emitted by *D. etheria* preyed upon by *C. rumia* showed a tendency to be recognized by the crab. It is concluded that nudibranchs are adept at recognizing different chemical cues, which is an important strategy for establishing ecological interactions in the natural environment. Given the rare instances of predation on nudibranchs, the results of tritrophic interactions encourage further studies on the subject to assess the potential effects on nudibranch species' behavior and their populations.

*Keywords:* Nudibranchia; spongivory; prey-predator interactions; tritrophic interactions; *Dysidea etheria*; *Pachygrapsus transversus*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação atual da Ordem Nudibranchia.....	17
Figura 2 – Estrutura externa dos rinóforos.....	19
Figura 3 – Morfologia externa de nudibrânquios.....	20
Figura 4 – Espécie <i>Cadlina rumia</i> no habitat natural.....	24
Figura 5 – Modelo de interações tritróficas. ....	54
Figura 6 – Área de estudo no litoral de Cabo Frio.....	60
Figura 7 – Coleta e manutenção dos organismos.....	62
Figura 8 – Teste piloto para verificar interação do caranguejo.....	62
Figura 9 – Estrutura para a realização dos ensaios de interação tritrófica.....	63
Figura 10 – Tipos de tratamento utilizados nos ensaios de interação tritrófica. ....	66
Figura 11 – Comportamento do caranguejo em relação ao nudibrânquio. ....	67
Figura 12 – Deslocamento de <i>Pachygrapsus transversus</i> em ensaios de interação tritrófica.....	68
Figura 13 – Comportamento de quimiotaxia do caranguejo <i>Pachygrapsus transversus</i> .....	69
Figura 14 – Tempo médio (min) para os indivíduos de <i>Pachygrapsus transversus</i> realizarem a escolha nos ensaios de quimiotaxia.....	70

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1: Estudos sobre nudibrânquios realizados na costa brasileira a partir do ano 2000.....	26
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EQM	Ecologia Química Marinha
PSU	Practical salinity unit
Ind.	Indivíduos
IEAPM	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
T1	Tempo para escolha

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	14
<b>1. ATTRACTION AND ESCAPE: THE NUDIBRANCH <i>Cadlina rumia</i> LOCATES ITS PREY AND CONSPECIFICS AND ESCAPES FROM ITS PREDATOR THROUGH PRECEPTION OF WATERBORNE SIGNALS AND CUES.....</b>	<b>28</b>
1.1 INTRODUCTION.....	29
1.2 MATERIAL AND METHODS.....	32
1.3 RESULTS.....	35
1.4 DISCUSSION.....	36
1.5 REREFENCES.....	42
1.6 FIGURES.....	49
1.7 SUPLEMENTAR MATERIAL.....	52
<b>2. EFEITOS DAS INTERAÇÕES ENTRE NUDIBRÂNQUIOS, ESPONJAS E O CARANGUEJO PREDADOR <i>Pachygrapsus transversus</i>: UM CASO DE INTERAÇÃO TRITRÓFICA?.....</b>	<b>53</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	53
2.2 OBJETIVO.....	58
2.2.1 <u>Hipótese</u> .....	58
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
3.1 ÁREA DE ESTUDO.....	59
3.2 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS.....	61
3.3 TESTE PILOTO SOBRE ESCOLHA DO PREDADOR-CARANGUEJO.....	62
3.4 ENSAIOS DE INTERAÇÃO TRITRÓFICA .....	63
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
4.1 TESTE PILOTO SOBRE ESCOLHA DO PREDADOR-CARANGUEJO.....	67
4.2 ENSAIOS DE INTERAÇÃO TRITRÓFICA.....	67
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
5.1 ANÁLISE METODOLÓGICA SOBRE A ESCOLHA DO PREDADOR.....	70
5.2 ENSAIOS DE INTERAÇÃO TRITRÓFICA.....	73
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A Química é a base da vida e, por esta razão, os organismos interagem entre si ou com o meio em que vivem utilizando a linguagem química para diversos propósitos (THAKUR & SINGH, 2016). A produção de substâncias químicas é essencial para o bem-estar e a sobrevivência dos organismos (McCLINTOK & BAKER, 2001), que respondem aos fatores abióticos e bióticos através da produção desses metabólitos (HAY, 1996). O estudo de interações quimicamente mediadas entre os organismos e seu ambiente é definido como ecologia química (THAKUR & SINGH, 2016).

A Ecologia Química Marinha (EQM) é uma ciência integrativa que busca o conhecimento sobre a função de substâncias químicas nos ecossistemas marinhos (HAY, 2009) onde, no geral, se avalia a ação e as consequências ecológicas e evolutivas dos metabólitos secundários em interações entre os organismos marinhos (PEREIRA, 2009). As funções biológicas desses metabólitos secundários passaram a ser objeto de estudo, de fato, com o desenvolvimento do campo interdisciplinar da EQM (PAWLIK, 1993).

Os organismos marinhos bentônicos estão constantemente sob intensa pressão competitiva por espaço, luz e nutrientes. Portanto, estes organismos desenvolveram diversos mecanismos de defesa, incluindo defesas comportamentais, físicas e químicas para garantir sua sobrevivência (McCLINTOK & BAKER, 2001). Inicialmente, os metabólitos secundários isolados dos tecidos de alguns invertebrados marinhos (como, por exemplo, as esponjas, cnidários e moluscos) foram associados à função defensiva e uma das principais razões é a forte correlação entre a diminuição da eficiência de um mecanismo de defesa física e a presença de substâncias químicas (PAWLIK, 1993).

Além das interações presa-predador, as pesquisas em EQM incluem defesa contra organismos incrustantes, infecção por microrganismos, interações de competição por espaço, pistas químicas para assentamento larval, dentre outras (PAWLIK, 1993; HAY, 1996; McCLINTOK & BAKER, 2001). Atualmente, também são pesquisadas a biossíntese de produtos naturais marinhos produzidos por microrganismos simbiotes (PUGLISI et al., 2014). Os principais organismos marinhos estudados em ecologia química são as macroalgas e os invertebrados como as esponjas, cnidários, crustáceos, equinodermos e moluscos (PAUL &



RITSON-WILLIAMS, 2008; PUGLISI et al., 2014).

As interações intra- e interespecíficas entre os organismos marinhos são mediadas por substâncias químicas chamadas semioquímicos, que transmitem a informação entre os organismos de maneira individual (DICKE & SABELIS, 1988). Os semioquímicos podem ser divididos em sinais químicos e pistas químicas. Os sinais químicos são as substâncias produzidas de forma intencional pelo organismo emissor para manipular o comportamento do organismo receptor podendo gerar benefícios para ambos. Os sinais químicos são conhecidos como feromônios e atuam, frequentemente, na comunicação entre coespecíficos (DICKE & SABELIS, 1988; HAY, 2009). Por outro lado, as pistas químicas são produzidas por organismos de espécies diferentes, onde o organismo emissor libera as substâncias químicas de maneira passiva ou acidental no meio. Esta liberação desencadeia uma resposta comportamental ou fisiológica no organismo receptor (HAY, 2009). As pistas químicas são conhecidas como aleloquímicos. Os aleloquímicos podem ser divididos em alomônios, que geram benefícios somente para o organismo emissor; cairomônios, que geram benefícios para o organismo receptor; e sinomônios, que geram benefícios para ambos organismos envolvidos (DICKE & SABELIS, 1988).

Os semioquímicos são importantes para guiar o comportamento dos organismos aquáticos, incluindo as pistas detectadas através do contato direto ou por quimiorreceptores liberados na água (WYETH, 2019). Rastrear os odores em direção à fonte ou para longe da mesma é provavelmente uma das estratégias mais importantes para orientar o movimento da maioria dos gastrópodes aquáticos (WYETH, 2019).

Os gastrópodes aquáticos utilizam variadas estratégias de navegação para se mover em direção à (ou para longe de) uma fonte emissora de odor. Essas estratégias dependem da substância química envolvida, dos níveis de concentração e do padrão espacial e temporal da concentração (WEBSTER & WEISSBURG, 2009). Uma das principais estratégias de navegação utilizada por organismos quimiorreceptores é a quimiotaxia. A quimiotaxia é definida como resultado de um movimento orientado em relação ao gradiente crescente de concentração de odor (WEBSTER & WEISSBURG, 2009). A quimiotaxia positiva refere-se à atração de um organismo em direção a um estímulo químico. A quimiotaxia negativa refere-se ao afastamento do organismo da fonte emissora. Em ensaios em laboratório, utilizando aquários em formato Y ou T, é possível verificar a resposta positiva quando os

gastrópodes escolhem com mais frequência o lado com a fonte emissora do odor. Já a resposta negativa é observada quando os gastrópodes movem-se em direção ao lado oposto, ou seja, sem a presença do odor (WYETH, 2019).

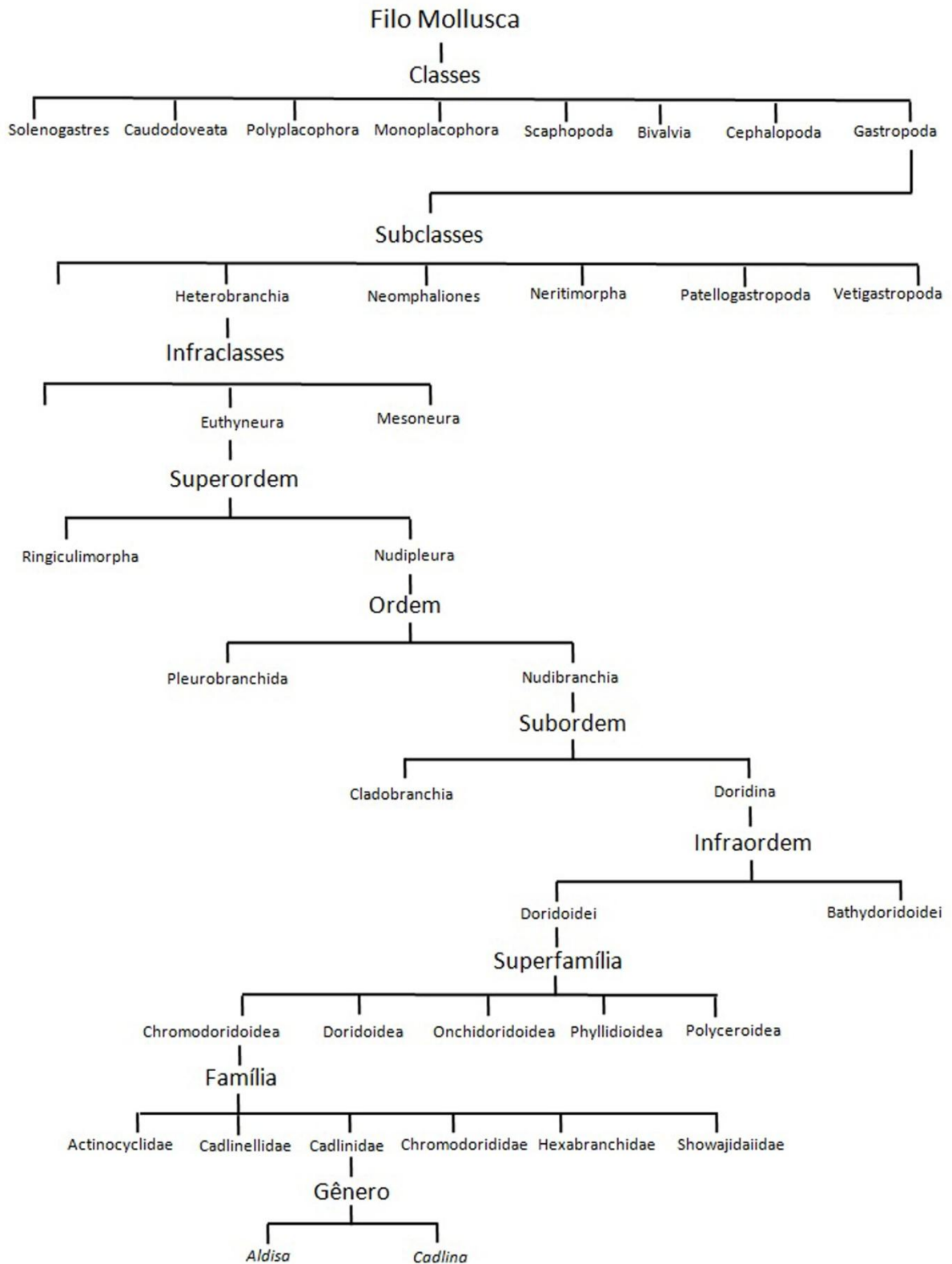
### **Introdução à Ordem Nudibranchia (Mollusca, Gastropoda)**

O Filo Mollusca é o segundo maior filo do reino animal, com aproximadamente 130.000 espécies descritas (BRUSCA, 2018). Atualmente, a classificação de Mollusca, feita através de análises moleculares, agrupa o filo em dois clados, Aculifera e Conchifera (SMITH et al., 2011). O táxon Aculifera compreende espécies sem concha verdadeira e o táxon Conchifera é composto por moluscos com concha em pelo menos algum estágio da vida, incluindo, entre outras, a Classe Gastropoda Cuvier, 1795 (SMITH et al., 2011).

Com aproximadamente 100.000 espécies, Gastropoda é a classe com maior riqueza de espécies (AKTIPIS et al., 2008). A história da classificação das espécies da Classe Gastropoda tem passado por alterações constantes entre os malacologistas. Por exemplo, Henri Milne Edwards (1848) reconheceu os grupos Prosobranchia, Pulmonata e Opisthobranchia. Por outro lado, Johann Wilhelm Spengel (1881) dividiu os gastrópodes em Streptoneura (equivaliam aos Prosobranchia) e Euthyneura (incluíam os Pulmonata e Opisthobranchia) (HASZPRUNAR, 1985). Posteriormente, alguns estudos moleculares questionaram a monofilia das subclasses Pulmonata e Opisthobranchia, sendo proposta a inclusão desses dois grupos na subclasse Heterobranchia (WÄGELE & KLUSSMANN-KOLB, 2005; JÖRGER et al., 2010; WÄGELE et al., 2014).

Atualmente, os heterobrânquios incluem além de alguns indivíduos chamados “*Lower Heterobranchia*” ou heterobrânquios basais, o grupo Euthyneura (anteriormente pertencentes às subclasses Pulmonata e Opisthobranchia) (JÖRGER et al., 2010). Um dos táxons incluídos na infraclasse Euthyneura é a superordem Nudipleura Wägele & William, 2000, em que se agrupam as ordens Pleurobranchida Pelseneer, 1906 e Nudibranchia Cuvier, 1817 (WÄGELE et al., 2014; BOUCHET et al., 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Classificação atual da Ordem Nudibranchia.



Legenda: Classificação dos nudibrânquios até o gênero *Cadlina*, dentro do Filo Mollusca, segundo Bouchet *et al.* 2017.

Fonte: modificado de Behrens, 2005

## **Características gerais dos nudibrânquios**

A ordem Nudibranchia compreende gastrópodes marinhos e estuarinos caracterizados pela ausência completa da concha na fase adulta (PADULA, 2007). Eles recebem esse nome por apresentarem as brânquias “nuas”, ou seja, os órgãos respiratórios ficam expostos ao ambiente marinho realizando as trocas gasosas (BEHRENS, 2005). Os nudibrânquios possuem sistema reprodutor hermafrodita e apresentam um par de tentáculos orais e um par de estruturas sensoriais, chamadas rinóforos, exclusivas dos heterobrânquios (WÄGELE & WILLIAN, 2000).

Os rinóforos são importantes órgãos sensoriais localizados na região da cabeça dos nudibrânquios e são essenciais na sua orientação e locomoção no meio aquático (WYETH & WILLOWS, 2006b). Através dessas estruturas, os nudibrânquios podem perceber os sinais químicos dispersos na água, principalmente para encontrar o alimento e buscar por parceiros sexuais (MURPHY & HADFIELD, 1997). As características morfológicas dos rinóforos incluem o número e a forma de suas lamelas e a forma do ápice. Os principais tipos de rinóforos são os lamelares, anelados ou lisos (Figura 2) (BEHERENS, 2005). Algumas espécies conseguem retrair os rinóforos e guardá-los em uma espécie de ‘cavidade’ logo abaixo da epiderme. Essa contração muscular é realizada através das terminações nervosas localizadas na região interna dos rinóforos e ligadas diretamente ao sistema nervoso central dos nudibrânquios, coordenando também seus movimentos e sua orientação (GOBBELER & KLUSSMANN-KOLB, 2007).

Os nudibrânquios são um dos grupos mais diversos e coloridos entre os invertebrados marinhos, sendo a cor um importante carácter usado na identificação de espécies (PADULA, 2014). De fato, a morfologia externa e padrões de coloração são as características mais comuns usadas para identificar as espécies (VALDÉS et al., 2006). Além destes dois caracteres, o estudo taxonômico de nudibrânquios baseia-se também na morfologia da rádula, dos rinóforos e do sistema reprodutor (PADULA, 2014) somando-se ainda a utilização de ferramentas moleculares em uma abordagem taxonômica integrativa (PADULA et al., 2016).

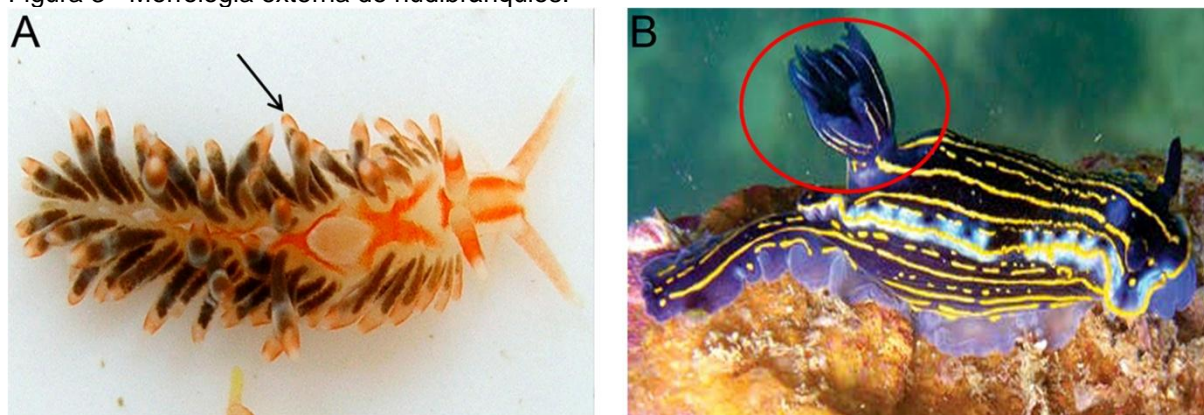
Figura 2 –Estruturas externas dos rinóforos.



Legenda: A. Rinóforos lamelares; B. Rinóforos anelares; C. Rinóforos lisos  
 Fonte: Moro *et al.* 2010.

A classificação dos principais grupos de Nudibranchia vem sofrendo modificações constantes ao longo do tempo (WÄGELE & WILLIAN, 2000; WÄGELE *et al.*, 2008). Segundo a revisão de Bouchet *et al.* (2017), a ordem Nudibranchia é dividida em dois grandes grupos: a subordem Cladobranchia (Figura 1) com representantes que não possuem brânquias “verdadeiras” e a subordem Doridina (Figura 1) com representantes que possuem uma brânquia exposta na região dorsal do corpo (Figura 3 B) (WÄGELE, 2004). Os nudibrânquios da subordem Cladobranchia apresentam ceratas, que são projeções alongadas que se estendem para fora do corpo desses moluscos (Figura 3 A). As ceratas são estruturas especializadas que desempenham a função de respiração, armazenamento de cnidócitos (proveniente da alimentação em cnidários) e também função digestiva (BEHERENS, 2005).

Figura 3 - Morfologia externa de nudibrânquios.



Legenda: A. Nudibrânquio cladobrânquio, com ausência de brânquias “verdadeiras” e presença de ceratas. Animal com aproximadamente 1,7 cm de comprimento ; B. Nudibrânquio doridáceo com cerca de 3,0 cm de comprimento evidenciando brânquias expostas em arranjo de plumas (círculo vermelho).

Fonte: A. Padula *et al.* 2011; B. Padula, 2014.

Nudibrânquios são carnívoros e importantes consumidores nas comunidades bentônicas, alimentando-se principalmente de organismos sésseis (BEHRENS, 2005). Espécies da subordem Cladobranchia se alimentam principalmente de cnidários, como hidrozoários e anêmonas (WÄGELE, 2004). Já a subordem Doridina é amplamente conhecida por moluscos especializados no consumo de esponjas (WÄGELE, 2004; RUDMAN & BERGQUIST, 2007; BELMONTE *et al.* 2015).

Os nudibrânquios são conhecidos por suas defesas químicas obtidas diretamente de suas dietas alimentares (BEHRENS, 2005). A eficiência dessas defesas químicas é evidenciada pelo pequeno número de predadores conhecidos, ou ao menos pela escassez de registros de predação sobre os nudibrânquios (ANKER & IVANOV, 2020). Entre os predadores de nudibrânquios estão outras lesmas marinhas dos gêneros *Navanax* e *Roboastrea* (BEHRENS, 2005), picnogônidos (ROGERS *et al.*, 2000) e caranguejos braquiúros (ANKER & IVANOV, 2020).

De uma maneira geral, os nudibrânquios possuem entre poucos milímetros e poucos centímetros de comprimento. O grupo apresenta ampla distribuição geográfica, desde águas tropicais até regiões polares (WÄGELE & KLUSSMAN-KOLB, 2005). Os nudibrânquios habitam fundos de substrato consolidado de águas rasas com hábito críptico (BEHRENS, 2005), porém, sua distribuição pode variar desde a faixa entremarés até o mar profundo (MOLES *et al.*, 2016).

## Ecologia química e potencial biotecnológico de nudibrânquios

Nudibrânquios doridáceos (subordem Doridina) são o grupo mais diverso dentre os heterobrânquios reunindo aproximadamente 2.000 espécies descritas (VALDÉS, 2004). A infraordem Doridoidei é representada, entre outras, por duas superfamílias consideradas as mais específicas no consumo de esponjas, as superfamílias Chromodoridoidea Bergh, 1891 e Doridoidea Rafinesque, 1815. Algumas espécies dessas famílias possuem dietas extremamente específicas (RUDMAN & BERGQUIST, 2007). Essas superfamílias são as mais estudadas em termos de sistemática e sobre a presença de metabólitos secundários (DEAN & PRINSEP, 2017). Por esta razão, os nudibrânquios doridáceos são considerados o grupo chave para o estudo sobre a evolução das defesas químicas e especialização alimentar no ambiente marinho (FAULKNER & GHISELIN, 1983; CIMINO & GHISELIN, 1999; RUDMAN & BERGQUIST, 2007; CIMINO & GHISELIN, 2009).

Em decorrência da ausência de concha (defesa física), o corpo dos nudibrânquios pode ser protegido por diferentes estratégias como as defesas ecológicas, comportamentais e químicas (FAULKNER & GHISELIN, 1983; CIMINO & GHISELIN, 1999, 2009). Um exemplo de defesa ecológica é a coloração aposemática, em que algumas espécies de nudibrânquios apresentam cores chamativas que transmitem sinais de alerta aos seus predadores. De uma maneira geral, espécies aposemáticas são tóxicas ou não palatáveis e, evolutivamente, os predadores aprenderam a evitar o consumo desses organismos (HABER et al., 2010). Exemplos de defesa comportamental são hábito noturno para deposição dos ovos (BIERMANN et al., 1992) e a fuga por natação, como ocorre com a espécie *Hexabranhus sanguineus* (Rüppell & Leuckart, 1830) do Indo-Pacífico, a mais conhecida a realizar este comportamento (BEHRENS, 2005).

A defesa química é considerada a principal estratégia defensiva utilizada pelos nudibrânquios. O uso da defesa química antipredação tem extrema importância evolutiva para os nudibrânquios, pois é considerada uma pré-adaptação que permitiu a esses moluscos sobreviverem sem a concha (FAULKNER & GHISELIN, 1983). De acordo com Faulkner & Ghiselin (1983), ao utilizar os metabólitos secundários provenientes da dieta, os nudibrânquios obtêm uma proteção sem gastos na produção, com custo apenas no armazenamento.

A defesa química dos nudibrânquios deve-se, em maior parte, à capacidade

desses moluscos sequestrarem e acumularem metabólitos secundários provenientes de suas presas, armazenando-os em seus corpos e utilizando-os como própria defesa em caso de ataque de predadores (FAULKNER & GHISELIN, 1983; CIMINO & SODANO, 1993; CIMINO & GHISELIN, 2009; CHENEY et al., 2016).

A revisão de Bornancin et al. (2017), sobre mediação química envolvendo gastrópodes marinhos, fornece uma ampla visão sobre a obtenção, a destoxificação e a biotransformação de metabólitos secundários advindos de dieta alimentar, assim como a importância deles como mediadores químicos em interações gastrópodes-presas.

Por se alimentarem de organismos quimicamente defendidos, os nudibrânquios desenvolveram métodos de destoxificação, que os permitiu consumir essas presas e levou-os a uma especialização alimentar (CIMINO & GHISELIN, 2009). No entanto, a especialização alimentar levou a uma dependência de determinados tipos de presas. Em termos evolutivos, algumas espécies exibiram a capacidade de realizar a biossíntese *de novo* dos metabólitos secundários, o que libertou os nudibrânquios de uma especificidade alimentar (CIMINO & SODANO, 1993; AVILA & PAUL, 1997).

A habilidade dos nudibrânquios em acumularem diretamente ou biossintetizarem *de novo* metabólitos secundários de suas presas está relacionada com a adaptação evolutiva de cada espécie (ÁVILA, 1995; CIMINO & SODANO, 1993; 1994; CIMINO & GHISELIN, 2009).

Os nudibrânquios constantemente são alvos de pesquisas sobre produtos naturais marinhos devido a descoberta de metabólitos bioativos (DEAN & PRINSEP, 2017). Os metabólitos secundários isolados dos nudibrânquios são amplamente documentados, em particular os terpenos e sesquiterpenos são os principais metabólitos encontrados (DEAN & PRINSEP, 2017).

Estes moluscos estão entre os principais alvos de pesquisas que buscam metabólitos com propriedades farmacológicas. Algumas substâncias com atividade citotóxica contra células tumorais humanas já foram descritas (ÁVILA, 1992; GRANATO et al., 2005; CARBONE et al., 2010). Recentemente, os microrganismos associados aos nudibrânquios também vêm sendo estudados. Bactérias gram-positivas encontradas no dorso dos nudibrânquios demonstraram ser uma fonte potencial de substâncias bioativas em testes antimicrobianos e antitumorais (ABDELRAHMAN et al., 2021).



A origem dos metabólitos secundários dos nudibrânquios e seu microbioma (BÖHRINGER et al., 2017) é interessante não somente do ponto de vista químico, mas também é primordial do ponto de vista ecológico para demonstrar a relação presa-predador, na qual os produtos naturais são derivados da dieta alimentar (ÁVILA, 1992).

### **Família Cadlinidae Bergh, 1891**

A família Cadlinidae Bergh, 1891, pertencente a superfamília Chromodoridoidea, é uma das famílias que possuem doridáceos predadores especialistas de esponjas (RUDMAN & BERGQUIST, 2007). Cadlinidae inclui dois gêneros, *Aldisa* Bergh, 1878 e *Cadlina* Bergh, 1879 (JOHNSON, 2010; DO et al., 2022), e seus metabólitos secundários têm sido amplamente estudados, principalmente em relação às espécies que realizam a síntese *de novo* (DEAN & PRINSEP, 2017).

O gênero *Cadlina* compreende nudibrânquios com o formato do corpo oval, levemente achatado e espículas presentes no dorso (CIMINO & GHISELIN, 2009). As espécies do gênero *Cadlina* apresentam menor especialização alimentar, consumindo uma variedade de esponjas espiculadas e não espiculadas (RUDMAN & BERGQUIST, 2007; BELMONTE et al. 2015). A eurifagia no consumo de esponjas do gênero *Cadlina* (CIMINO & GHISELIN, 2009) é sustentada por estudos químicos que apresentaram a variedade de metabólitos secundários encontrados nessas espécies (CIMINO & GHISELIN, 1999).

A espécie *Cadlina luteomarginata* MacFarland, 1966, comumente encontrada na costa Pacífica da América do Norte, é a espécie mais estudada dentro do gênero (DEAN & PRINSEP, 2017). *Cadlina luteomarginata* é uma das poucas espécies conhecidas por realizar tanto o sequestro direto de metabólitos secundários de esponjas (THOMPSON et al., 1982), como a biossíntese de seus próprios produtos naturais (KUBANEK et al., 2000). Este nudibrânquio se alimenta sobre várias espécies de esponjas (PENNEY, 2013), mas armazena em seus tecidos somente os metabólitos que irão lhe trazer benefícios contra os predadores (THOMPSON et al., 1982).

O gênero *Cadlina* inclui atualmente 28 espécies descritas ao redor do mundo (MolluscaBase, 2023), sendo a espécie *Cadlina rumia* Er. Marcus, 1955 a única

representante do gênero encontrada no litoral brasileiro (GARCÍA et al., 2008). *Cadlina rumia* foi descrita pela primeira vez pelo zoólogo alemão Ernest Marcus, em 1955, sendo encontrada na Ilha de São Sebastião, São Paulo (MARCUS, 1955). Em sua publicação, ele descreveu a espécie com o corpo arredondado e cerca de 1,0 cm de comprimento. A coloração é branca e semitransparente, os rinóforos são amarronzados e a espécie possui pigmentos amarelos ao redor da superfície dorsal do corpo (Figura 4) (MARCUS, 1955).

Figura 4 – Espécie *Cadlina rumia* no habitat natural.



Legenda: Nudibrânquio da espécie *Cadlina rumia* encontrado sob rochas em poça de maré na saída do Canal de Itajurú, Cabo Frio (RJ). Exemplar com aproximadamente 1,0 cm de comprimento.

Fonte: A autora, 2023.

No litoral brasileiro a espécie *C. rumia* foi registrada, até o momento, nos Estados de São Paulo (MARCUS, 1955), Rio de Janeiro (DOMÍNGUEZ et al., 2006), Alagoas (PADULA et al., 2012), Bahia (SALES et al., 2013) e Rio Grande do Norte (DELGADO et al., 2022).

No estado do Rio de Janeiro, *C. rumia* é encontrada preferencialmente embaixo de rochas em regiões entremarés. Esta espécie apresenta uma dieta diversificada alimentando-se de quatro espécies diferentes de esponjas: as espiculadas *Scopalina* sp., *Callyspongia* sp. e *Haliclona* sp. e a esponja não espiculada *Dysidea etheria* de Laubenfels, 1936 (BELMONTE et al., 2015). No município de Cabo Frio (RJ), *C. rumia* é uma espécie relativamente comum e de ocorrência frequente encontrada ao longo do ano (observação pessoal da autora), características estas que corroboraram a sua escolha para as investigações que são objeto de estudo desta tese.

## Estudo sobre nudibrânquios no Brasil

Nudibranchia contém aproximadamente 3.000 espécies descritas ao redor do mundo (WÄGELE & WILLIAN, 2000; WÄGELE & KLUSSMAN-KOLB, 2005). Para o litoral brasileiro estão listadas cerca de 120 espécies, um número considerado baixo comparado ao total de espécies existentes atualmente (DA COSTA et al., 2010; PADULA, 2014). Levando em consideração que a costa brasileira possui 7.637 km de extensão, os números para o Brasil encontram-se subestimados dada a carência de pesquisas em diversas localidades (PADULA, 2015).

A maioria dos estudos sobre espécies brasileiras de nudibrânquios foi realizada pelo casal Ernest Marcus e Eveline Marcus entre os anos de 1955 e 1983. Durante esse período o casal fez sua contribuição substancial sobre o conhecimento da diversidade de espécies brasileiras (PADULA, 2015). A contribuição desses autores possibilitou a descrição da maioria das espécies atualmente conhecidas para o litoral brasileiro, porém, faltavam algumas informações sobre os espécimes *in vivo* e nenhum ou raros dados sobre a biologia das espécies estavam incluídos em seus trabalhos (PADULA, 2015).

A partir da década de 2000, diferentes autores passaram a estudar as espécies de nudibrânquios brasileiras (Tabela 1). A maioria dos trabalhos cita novos registros de ocorrência; descrevem espécies novas e/ou reformulam descrições de espécies existentes e trazem revisões taxonômicas de determinadas famílias. Mais recentemente, artigos sobre filogenética molecular, abordando a taxonomia integrativa, incluíram espécies da Família Chromodorididae, especialistas na predação de esponjas. Em exceção aos trabalhos taxonômicos, existem poucos artigos sobre química de produtos naturais de nudibrânquios (PADULA, 2015).

No Brasil, somente um único trabalho aborda a ecologia das espécies de nudibrânquios (Tabela 1). Belmonte e colaboradores (2015) observaram 94 eventos de predação de 12 espécies de nudibrânquios sobre 13 espécies de esponjas expandindo o conhecimento sobre as interações presa-predador. Em 2014, foram realizados ensaios em laboratórios sobre o comportamento alimentar de nudibrânquios com as espécies *Cadlina rumia* e *Tyrinna evelinae* (Er. Marcus, 1958) a fim de corroborar com as observações no habitat natural (BELMONTE, 2014). A preferência alimentar de *C. rumia* foi avaliada em ensaios de laboratório com esponjas frescas e extrato bruto das esponjas incorporados em alimentos artificiais.

Foi observada uma tendência de preferência pela esponja *Dysidea etheria* em comparação com outras duas espécies oferecidas, *Tedania (Tedania) ignis* (Duchassaing & Michelotti, 1864) e *Callyspongia* sp. (BELMONTE, 2014).

Tais conhecimentos prévios conduziram a proposta desta tese, isto é, a realização de estudos específicos realizados através de ensaios experimentais em laboratório com nudibrânquios. As interações ecológicas, mediadas quimicamente, com outros grupos de organismos, trazem uma abordagem multidisciplinar no âmbito da ecologia química marinha e biologia comportamental.

Tabela 1: Estudos sobre nudibrânquios realizados na costa brasileira a partir do ano 2000.

<b>Aspecto estudado</b>	<b>Local</b>	<b>Referência</b>
Química de produtos naturais	SP	Granato et al. 2000
Descrição de novas espécies	PE	García & Troncoso, 2003
Química de produtos naturais	SP	Granato et al. 2005
Registro de ocorrência	RJ	Padula & Absalão, 2005
Registros de ocorrência	PE, RJ, SP	Padula & Santos, 2006
Descrição de novas espécies	PE, RJ, SP	Dominguez et al. 2006
Registros de ocorrência	Litoral brasileiro	García et al. 2008
Descrição de nova espécie	RN	Padula & Delgado, 2010
Descrição de nova espécie	RJ	DaCosta et al. 2010
Descrição de nova espécie	RJ, SP	Alvim et al. 2011
Registros de ocorrência	RN	Lima & Delgado, 2011
Registros de ocorrência	SC	Padula et al. 2011
Registros de ocorrência	BA, RN	Sales et al. 2011
Química de produtos naturais	RJ	Pereira et al. 2012
Revisão taxonômica	RJ	Alvim & Pimenta, 2013
Registro de ocorrência	BA	Sales et al. 2013
Taxonomia integrativa	CE	Padula et al. 2014
Ecologia	RJ	Belmonte et al. 2015
Registro de ocorrência	CE	Galvão-Filho et al. 2015
Descrição de nova espécie	RJ, SP	Lima & Simone, 2015
Filogenética molecular	Litoral brasileiro	Padula et al. 2016
Registro de ocorrência	SP	Sales et al. 2016
Filogenética molecular	RJ	Ramirez et al. 2017
Revisão taxonômica	RJ	Lima & Simone, 2018
Descrição de espécies	SP	Sales et al. 2019
Registros de ocorrência	RN	Delgado et al. 2022

Fonte: A autora, 2023.

O objetivo desta tese foi avaliar interações ecológicas de uma espécie de nudibrânquio em relações intra- e interespecíficas, com ênfase na biologia comportamental e sinalização química das espécies envolvidas. Foi elencada como espécie-alvo o nudibrânquio *Cadlina rumia*, cujos resultados de pesquisas anteriores sinalizaram uma interação espécie-específica de presa-predador (BELMONTE et al. 2015).

O Capítulo 1 aborda os ensaios experimentais conduzidos em laboratório sobre a capacidade de reconhecimento de pistas químicas do nudibrânquio *C. rumia* Er. Marcus, 1955 em relação a diferentes odores liberados na água do mar.

No Capítulo 2, são apresentados os ensaios sobre a existência de interação tritrófica entre o predador do nudibrânquio e suas presas, as esponjas marinhas, mediada por sinalização química indireta.

## Capítulo 1

### **Attraction and escape: nudibranch *Cadlina rumia* locates prey and conspecific and avoids predator through waterborne chemicals**

Thalita Belmonte<sup>1</sup>, Renato Crespo Pereira<sup>2</sup>, Daniela Bueno Sudatti<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, Rua Kioto, 253 – Praia dos Anjos, 28930-000, Arraial do Cabo, RJ, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal Fluminense, Departamento de Biologia Marinha, Bloco M, Rua Professor Marcos Waldemar de Freitas Reis – São Domingos, 24210-201, Niterói, RJ, Brasil

\*Corresponding author: [dbsudatti@gmail.com](mailto:dbsudatti@gmail.com) (DBS)

#### Abstract

In marine environment, nudibranchs use their olfactory sense to detect chemicals in the water-column to guide their behavior when searching for preys, avoiding predators, or finding potential mates. The dorid nudibranch *Cadlina rumia* is a tropical western Atlantic species commonly found under rocks and that exhibit a trophic relationship with the sponge-prey *Dysidea etheria*, which is chemically defended. We evaluated the ability of *Cadlina rumia* to recognize waterborne chemicals from its prey, predator, and conspecific. Y-maze experiments with two-current choice flume were carried out using different signalized seawater (treatments) obtained from *D. etheria* intact, previously consumed, artificially damaged (simulated predation), from its potential predator, the crab *Pachygrapsus transversus*, and from conspecific nudibranchs. Specimens of *C. rumia* recognized and

discerned the different waterborne chemicals offered to them after a short mean period of 6 minutes. *Cadlina rumia* exhibited positive chemotaxis to chemical cues from its prey *D. etheria* (fresh or previously consumed) and signals from conspecifics, but did not recognize the chemical cues from the sponge artificially damaged. A negative chemotaxis was observed to the chemical cues released from the crab *P. transversus*. The broad ability to detect and discern chemical signals and cues from different sources is likely crucial for the fitness of *C. rumia*, as enables it to identify its primary prey sponge (*D. etheria*), locate potential mates, suitable place for egg laying and food resources (conspecifics), and avoid predators (crab *P. transversus*).

## **Introduction**

In the marine environment, several organisms utilize conspecific and heterospecific chemicals released into the seawater in various ecological contexts, such as foraging strategies, food choice, seeking shelter and mating partners, and predator avoidance (Hay 2009; Kamio & Derby 2017, 2020). For example, many aquatic gastropods use their olfactory sense to react to waterborne chemicals to guide their navigation behavior, including that for detecting preys or avoiding predators based on kairomones, or finding potential mates using pheromones (Wyeth 2019, Derby 2020). The aquatic chemical ecology studies usually involve just the understanding how different organisms perceive and respond to different chemical cues and signals in their natural environment (Jutfelt et al. 2017). However, one of the major challenges or difficulties in this area is distinguishing between evolved functions (signals) and incidental effects (cues) (Otte, 1974; Weiss et al. 2013). Chemical signals are released intentionally by the sender, but receivers also react to chemicals released unintentionally, which are defined as chemical cues (Steiger et al. 2011).

Chemically mediated interactions among organisms provide insights into ecology and evolution of marine communities (Hay 2009; Zimmer et al. 2017), and have resulted in

several co-evolutionary evidences between nudibranchs and its preys (Becerro et al. 2003; Cheney et al. 2016). For example, dorid nudibranchs marine gastropods are known for their dietary specialization on sponges and some species may eat only one kind of prey (Wägele 2004, Rudman & Bergquist 2007; Penney 2013). Marine sponges are recognized as one of the rich sources of secondary metabolites, contributing to about 30% of all these chemicals identified so far for marine organisms (Calcabrini et al. 2017; Lee et al. 2021). Nudibranchs can assimilate secondary metabolites based on their specialized relationships with their preys, such as sponges, for obtaining of self-chemical defenses against natural enemies (Bornancin et al. 2017; Dean & Prinsep 2017). Since they are devoid of shells, chemical defense is the primary strategy used by nudibranchs to deter predators (Faulkner & Ghiselin 1983; Pawlik 1993, Cimino & Ghiselin 1999, 2009; Dean & Prinsep 2017).

Chemosensory perception of chemical cues and/or signals is a significant strategy for nudibranchs in ecological interactions, particularly due to their relatively underdeveloped visual accuracy (Cheney et al. 2016). Although a very few and rare species can exhibit visually-guided behaviors (Quinlan & Katz 2022), their interaction with the marine environment occurs primarily through chemoperception through the rhinophores, a pair of sensory organs located above the nudibranch heads (Murphy & Hadfield 1997). Some nudibranch species also can even detect different odors in seawater using just a single rhinophore (McCullagh et al. 2014), and this organ is also important and critical structure for orientation with respect to water flow direction (Wyeth & Willows 2006a).

The use of two-current choice flume has proven to be a valuable method for acquiring insights into preference or avoidance responses (Jutfelt et al. 2017), since the orientation behavior in one direction includes finding the source of an odor and moving relative to fluid-dynamic direction (Murray et al. 2006). The tendency of organisms to move towards or away from the water flow is influenced by the presence of chemical attractive



odors released from prey and conspecifics, as well as repellent odors released from potential predators (Zimmer-Faust et al. 1995, 1996; Weissburg et al. 2002; Murray et al. 2006; Wyeth et al. 2006).

The mollusc species *Tritonia tetraquetra* (Pallas, 1788) has been a useful model for studies that promoted a significant progress in understanding the sensory and locomotor systems in nudibranchs. This nudibranch is capable to move in direction to locate prey and conspecifics, as well as to move away or distance from predators in the field (Wyeth et al. 2006; Wyeth & Willows 2006b) and under the laboratory conditions (Wyeth & Willows 2006a). Navigation toward chemical sources often has been investigated with various marine organisms using aqueous extracts of animal tissues (Moore & Atema 1991; Moore & Grills 1999) or, occasionally, live preys (Weissburg & Zimmer-Faust 1993, 1994). However, few studies have been investigated using chemical cues directed released into the water column (but see Lambert & Todd 1994, Nocchi et al. 2017; Santoja et al. 2018), but chemicals are often important for guiding aquatic gastropods, including those detected by either contact chemoreception or chemoreceptors sampling the water (Wyeth 2019).

The dorid nudibranch *Cadlina rumia* Marcus, 1955 is an amphiatlantic species and it is the only species of this genus in the tropical western Atlantic (García et al. 2008; Goodheart et al. 2016). This species is commonly found under rocks living and on sponges (Goodheart et al. 2016) and it is found throughout the year in Brazilian coast (the author, personal observation). Previous field observations revealed a trophic relationship between *C. rumia* and their prey sponge *Dysidea etheria* (Belmonte et al. 2015), providing key evidence that there is a feeding preference, although *Dysidea* species are recognized rich producers of secondary metabolites exhibiting antifeeding effect (Marin et al. 1998; Becerro et al. 2006).

In the present study, we assessed the ability of *C. rumia* to recognize different indirected chemical cues and signals, using signalized seawater from its usual prey *D.*

*etheria* intact and previously consumed and artificially damaged, its potential crab predator *Pachygrapsus transversus* and conspecific nudibranchs through laboratory Y-maze bioassays.

## **Material and Methods**

### **Collection and maintenance of organisms**

Nudibranch specimens of *C. rumia* ( $1.3 \text{ cm} \pm 0.44$ ), their prey-sponge *D. etheria* ( $\sim 4 \text{ g}$  wet weight) and their potential predator, the crab *P. transversus* ( $2.1 \text{ cm} \pm 0.39$  carapace width), were manually collected from a tidal pool located at the end of Itajurú channel ( $22^{\circ} 53'13''\text{S}$ ;  $42^{\circ} 00'17''\text{W}$ ) in Cabo Frio city, Rio de Janeiro State, Southeastern Brazil. Multiple collections were conducted to carry out laboratory experiments, spanning from March 2018 to March 2020. In laboratory, these organisms were kept in individualized aquariums of 10L (30 x 20 x 20 cm), continuously aerated and filtered (150  $\mu\text{m}$  nylon mesh) seawater, at 23-26  $^{\circ}\text{C}$  and salinity around 35. The seawater was replaced once or twice a week.

Specimens of *C. rumia* were collected a week prior to starting each bioassay, in order to use healthy organisms that had been kept for a short time in the laboratory conditions. They were fed on individuals of the sponge *D. etheria* collected as needed for the maintenance of these molluscs, but they were starved for 24h before being used in the bioassays. The specimens of *P. transversus* were collected just two days before the bioassays, and they were maintained without food. The specimens of *D. etheria* dedicated to bioassays were collected during the week of the bioassays.

### **Bioassay types**

The behavioral responses of *C. rumia* specimens were evaluated in relation to five different signalized seawater (treatments) obtained from: (1) fresh *D. etheria*, in order to analyze the *C. rumia* ability to recognize its prey chemical cues, and to test the hypothesis

that this nudibranch prefers to move towards this sponge; (2) *D. etheria* previously consumed, to determine if *C. rumia* is capable of recognize a natural predation event on its prey, and to test the hypothesis that predation by *C. rumia* potencialize nudibranch recognition; (3) *D. etheria* artificially damaged, to assess the nudibranch's role in a predation event for the emission of a reliable signal; (4) presence of *P. transversus*, to test the rejection behavior of *C. rumia* in relation to their potential predator chemicals, under the hypothesis that *C. rumia* this nudibranch move in the opposite direction to the chemical cues emitted by this crab; and (5) conspecific nudibranchs, to determine if there is orientation of nudibranchs in search for conspecifics and to test the hypothesis that *C. rumia* will move towards the chemical signals released by its conspecifics.

#### **Obtaining of signaled seawater containing chemical cues**

For obtaining treatment and control waters, two beakers (4 L; 17 cm diameter x 25 cm height) were filled with filtered seawater (150 µm nylon mesh to remove larger debris) under continuously aeration (adapted from Peacor 2006) and live organisms were placed in one (considered treatment) and the other remained only with seawater (control). These signaled seawaters were obtained as follows: for fresh *D. etheria* experiments, specimens of this sponge (~ 5 individuals of 2 g each) were placed into the seawater; for *D. etheria* previously consumed, specimens of *C. rumia* (7-8 individuals) were placed into seawater together with the sponge *D. etheria*; for *D. etheria* artificially damaged, we simulated predation by clipping and created lesions on the upper part of their bodies (~4 ind, 2 g each) using a stiletto in order to resemble mollusc radula (adapted from Coleman et al. 2007); for predator presence, 5 individuals of the crab *P. transversus* were placed in the seawater beaker; and for conspecific nudibranch presence, specimens of the nudibranch *C. rumia* (10 individuals) were placed into the seawater. All seawaters were signaled for periods of 1h and 6h, which were used in the Y-maze bioassays immediately after these periods.

### **Y-maze bioassays**

The five bioassay types were performed using aquaria built on the Y-maze model, with two possibilities of choices by nudibranchs: signaling seawater (treatment) and natural seawater (control). As a behavioral response, we analyzed the choice (control or treatment) in each assay and the time spent to *C. rumia* specimens made their choice.

The Y-maze aquarium was 15 cm long, 5 cm wide and 5 cm high. Each Y branch was connected to one 4L becker containing control (only seawater) and treatment conditions (signaling seawater) (see above). Before the bioassays, a preliminary flow test was performed using colored seawater (blue and yellow) to check the green water mixing zone below the Y-branch junction and where the test organisms were positioned at the beginning of the bioassay (S1 Fig 1).

The unidirectional flow system of 18ml/min was maintained by gravity and control and signalized seawaters were simultaneously offered to one individual nudibranch at a time. In each experiment, each individual nudibranch had 10 minutes to make their choices, according to previous study (Nakashima 1995). Animals that did not move were record as no choice. Between each trial, the Y-maze aquarium was whashed with a copious amount freshwater and rinsed with distilled water to ensure no traces of previous treatments remained. Control and treatment waters were offered alternately between the two branches of the Y.

All bioassays were conducted in two separated moments referred to as set 1 and set 2. Each set involved a varying number of *C. rumia* individuals, ranging from 12 to 20, depending on their availability in the laboratory. At least 100 individuals of *C. rumia* were tested during all study and the specimens of sponge, nudibranch and crab used in set 1 were not the same as those used in set 2.

## Statistical analysis

The Chi-square test for goodness to fit was applied to evaluate the behavioral response of *C. rumia* regarding their choices. The null hypothesis ( $H_0$ ) is that there is no difference between choosing of control or treatment options and the alternative hypothesis ( $H_1$ ) is that the nudibranchs would choose waterborne cues from the sponge and signals from conspecific and would repel waterborne cues from predator.

The Mann-Whitney test was employed to identify differences in the time taken by *C. rumia* specimens to make their choice. Prior to this analysis, the normality of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test. The null hypothesis ( $H_0$ ) is that there is no difference between time moving to control or treatment. The alternative hypothesis ( $H_1$ ) is that nudibranchs would move to treatment waterborne cues from sponge (consumed and artificially damaged) and waterborne signals from conspecific and to control in assays with signalized water from predator.

The data analyses were performed using the free *software* Jamovi (Desktop version 2.3.21) and considered significant when  $p < 0.05$ . Nudibranch specimens that did not move to anywhere were not considered in statistical analyses.

## Results

### Responses to waterborne cues from fresh *D. etheria*

Specimens of *C. rumia* preferentially have chosen signalized seawater with fresh *D. etheria* after 1h in both set 1 and set 2 (Fig 1A; Chi-square test:  $p = 0.005$  and  $p < 0.001$ , respectively). However, in the 6h bioassay, no significant preference for control or signalized seawater was evidenced in either set 1 ( $p = 0.059$ ) or set 2 ( $p = 0.074$ ), despite these marginal p-values; Fig 1A).

### Responses to chemical cues from previously consumed *D. etheria*

*C. rumia* recognized chemical cues from the sponge *D. etheria* previously consumed

upon by nudibranchs in almost all experimental conditions: 6h signaled seawater both on set 1 ( $p=0.04$ ) and set 2 ( $p=0.03$ ); and 1h signaled seawater on set 2 ( $p=0.025$ ; Fig 1B).

### **Responses to chemical cues from artificially damaged *D. etheria***

In all bioassays, no preference of *C. rumia* for seawater signaled with chemical cues from artificially damaged *D. etheria* was found (Fig 1C).

### **Responses to chemical cues from the predator *P. transversus***

Specimens of *C. rumia* perceived the chemical cues of *P. transversus* presence as it chose the control seawater in the 1h bioassays in both set 1 ( $p=0.003$ ) and set 2 ( $p=0.002$ ) (Fig 1D). This same behavior was verified on the set 2 ( $p=0.007$ ) in the experiment of 6h (Fig 1D).

### **Responses to chemical signals from the conspecific nudibranchs**

*Cadlina rumia* specimens have chosen the signaled seawater containing chemical signals from conspecific on set 2 in bioassay of 1h ( $p < 0.001$ ) and 6h ( $p < 0.012$ ; Fig 1E). However, this behavior was not observed in set 1 (Fig 1E).

### **Time spent for choice by *C. rumia***

In all bioassays, there was no significant difference on time required for *C. rumia* specimens make their choices between signaled and control seawater. Time spent for choice ranged from 2 to 10 min, with an average of 6 min (Fig 2, A-E). In addition, a reduced number of *C. rumia* specimens exhibited no choice behavior in the bioassays, except in the experiment with *D. etheria* artificially damaged, in which 29% of these nudibranchs remained inactive (Fig 1C). On the other hand, all nudibranchs made a choice when offered chemical cues from the crab *P. transversus* – predator presence (Fig 1D).

## **Discussion**

The Y-maze bioassays revealed that *C. rumia* specimens exhibited mainly a positive chemotaxis behavior, since expressed movement toward the different chemicals from fresh

and consumed *D. etheria* and conspecifics, but not perceived the chemicals of this sponge artificially damaged. Contrary, *C. rumia* exhibited avoidance behavior (negative chemotaxis) to the chemical cues released from its potential predator *P. transversus*. These nudibranch behaviors corroborate prior evidence which found that the nudibranch *Tritonia tetraquetra* (Pallas, 1788), which has been used as a model to understand the neural control of navigation (Murray & Willows, 1996; Wyeth & Willows, 2006a, b). *Tritonia tetraquetra* specimens responded to odor flows coming from partners, prey, and predators, such as positive in relation to its prey, the octocoral *Ptilosarcus gurneyi* (Gray, 1860) and aversion to predator signals, the sea star *Pycnopodia helianthoides* (Brandt, 1835) (Wyeth & Willows, 2006a).

*Cadilina rumia* chose one of the options, control or treatment (signalized seawater) between 5 and 7 minutes after the start of the bioassay. Nakashima (1995), in a Y-maze experimental setup with also 10-minute duration, found no positive chemoataxis toward conspecifics, but did observe positive responses in relation to conspecific mucous trails from *Dendrodoris nigromaculata* (Cockerell, 1905) and *D. nigra* (Stimpson, 1855). However, the choice of the nudibranch *Aeolidia papillosa* (Linnaeus, 1761) to detect the chemicals of its prey, the sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt, 1835), was perceived after much longer time, in a broad ranging from 2 to 120 minutes (Seavy & Muller-Parker 2002). These authors used a large circular arena without barriers connected with two holding boxes containing anemones organisms (treatment) or no organisms (control), the Y-shaped stream of seawater from the two-point sources converged in the center of the arena with ~12 cm and the *A. papillosa* nudibranchs were starved for 72h before trials and was given up 2h to make a choice (Seavy & Muller-Parker 2002). Wyeth & Willows (2006a) tested *T. diomedea*'s ability to navigate relative to odour (prey, conspecific and predator) in a flow tank and reported that the slugs took a similar time to that found in our study to crawl to the odor source (6-7 min). Although, these authors kept slugs celibated and starved during ca. 1 and 2

months, respectively. Long starvation periods can cause stress and alter the animal behavior (Cronin & Hay, 1996) and, for this reason, in our study *C. rumia* was starved only for 24h before the bioassay and had up 10 minutes to cover a 15 cm of distance in a Y-maze aquarium before reaching its choice. Then, differences in methodologies could explain potentially account for the wide variations in choice time observed between studies.

The tests that evidenced the perception of *C. rumia* for their prey *D. etheria*, predator and conspecific were carried out with two time periods of exposition to signalized seawater (1 and 6h) to ensure about the presence and persistence of chemicals in the seawater, since the time for these assay-types is a variable aspect. For example, the cave-dwelling crustaceans *Hemimysis margalefi* and *Palaemon serratus* were strongly attracted to sponge signalized seawater after long period of 16h of experiment (Santoja et al. 2018). On the other hand, the presence of chemical cues decreased with time, through degradation of the order of 2-4 days (Peacor 2006). The degradation time of substances released into the seawater column that play a role in ecological interactions remains inadequately understood. Crambescin compounds have already been studied in this context, and it is known that their activity decreases by 25% after 1 hour of release into the water column, and by more than 60% after 8 h (Ternon et al. 2016). Here, we suppose that the periods of 1 and 6h assured both processes, obtention of response due to presence of chemicals and avoidance of degradation.

*Cadlina rumia* detected chemical cues released from its fresh *D. etheria* prey, since specimens of this moluscs showed positive chemotaxis to signalized seawater in the 1h-experiments, but it was not able to detect the *D. etheria* chemical cues in the 6h experiments. This result reinforces the existence of the known trophic relationship between *C. rumia* and *D. etheria* (Belmonte et. al. 2015). The chemically mediated relationship between *C. rumia* and *D. etheria* is a presumed specialization that allows *C. rumia* specimens to detect one of



their food resources, the sponge *C. etheria*. For gastropods in general, chemically rich diets also provide opportunities to defend themselves against predators, improve their own chemical defenses, chemical communication, prey detection, food preference and interaction with conspecifics (Bornancin et al. 2017), and this trophic relationship has also provided information for the discovery of secondary metabolites (Wu et al. 2021). In general, the specialization implies that most of dorid nudibranchs feed on one or few sponge species, which sometimes result in a overgraze (Knowlton & Highsmith 2005), but we do not know if the density of *C. rumia* is high enough to cause any deleterious effect on *D. etheria*. But since these predators, when in high densities, can regulate populations of prey sponges (Dayton et al. 1974), this is a relevant aspect for future approaches to the *C. rumia* x *D. etheria* relationship.

In the same way as observed for the behavior of *C. rumia* towards fresh *D. etheria*, specimens of this mollusc were also able to recognize chemical cues present in the signalized seawater obtained from this species of sponge preyed upon by conspecifics. Since sponges are known to react to predation through induced chemical defense (Thacker et al. 1998; Richelle-Maurer et al. 2003), perception by *C. rumia* may have been facilitated by this action of conspecifics on *D. etheria* presumably stimulating the production of more chemicals. For examples, this induced chemical defense may occur in response to overgrowth of competitors (Thacker et al. 1998) or predator action (Richelle-Maurer et al. 2003). The chemicals may be store into specialized cells (spherolous) and dispersed into the seawater through sponge exhaling channels, as observed for *Crambe crambe* species (Ternon et al. 2016) and express different ecological roles. The biochemical effect promoted by the predation over *C. rumia* is unknown, but it was enough to produce a signalized seawater that attracted this mollusc in the bioassays carried out in our study.

The nudibranch *C. rumia* was not able to detect the chemicals in signalized seawater

obtained from the artificial damaged *D. etheria*, both 1h and 6h experiments. Several studies that demonstrated facultative or induced chemical defense in marine sponges have been carried out using artificial predation by clipping (e.g. Richelle-Maurer et al. 2003), as in our study. Clipping has also been used as an effective procedure to verify induced defense in seaweeds (Jormalainen & Honkanen 2008). As the tests with fresh or previously consumed *D. etheria* signalized seawater were unequivocal in attesting the *C. rumia* ability to perceive the chemical cues from this sponge, we presumed that clipping may have promoted stress in the sponge that represented an unreliable signal for the nudibranch.

*Cadlina rumia* was able to recognize the signalized seawater with chemical cues from the crab *P. transversus* and moved towards to the opposite side of these signals, or moving preferentially to seawater control in both periods, 1h and 6h experiments. The nudibranch *Tritonia tetraquetra* also showed avoidance behavior relative to chemical cues from their sea star predator *Pycnopodia helianthoides* in its natural habitat (Wyeth et al. 2006). Predators strongly influence preys by altering the foraging behavior, and prey must be able to detect and respond to signals indicating predation risk (Large et al. 2011). Potential predation threat is sensed by organisms and in response to these cues, prey exhibit changes in their morphology, physiology, and behavior (Beattie & Moore, 2018) which are called nonconsumptive predator effects (Kamio et al. 2022). For example, the snail *Nucella lamellosa* (Gmelin, 1791) reduced their soft-tissue mass reflecting a reduction in their feeding activity when exposed to chemical cues from potential crab *Cancer productus* Randall, 1840 (Bourdeau & Padilla, 2019).

Chemical cues released by injured preys (other *Nucella* species) plus the crab induced rapid active avoidance crawling away, while cues from the crab alone elicited prolonged time withdrawn in the shell (passive behavior) (Mach & Bourdeau, 2011). Understand how prey make behavioral decisions under the risk of predation is necessary to clarify how predator-

prey interactions and subsequent effects on population and communities (Mach & Bourdeau, 2011). In their natural habitat, the crab *P. transversus* and the nudibranch *C. rumia* can spend hours coexisting in tidal pools. Therefore, the avoidance behavior exhibited toward the crab in the laboratory suggests that the nudibranch is capable of recognizing a potential threat in its natural environment.

*Cadlina rumia* also detected the chemical signals released by its conspecifics, as it moved preferentially towards the signaled water in the experiments of 1h and 6h. This attraction behavior was also observed for nudibranch *Tritonia tetraquetra* in the direction of signal coming from conspecifics (Wyeth & Willows 2006a, b). The presence of conspecifics can indicate a preferable habitat for avoiding predation, finding food and finding mates (Kamio et al. 2022). Gastropods also used chemoreception as reproductive behavior in response to trail sex pheromones (Derby 2020). In addition, recognize conspecific cues also facilitate the aggregation and to find suitable place for egg laying and resources (Hay 2009).

Nudibranch can occur alone, in small groups and less frequently in mass aggregation. Concentrated grouping of nudibranchs was traditionally believed to be breeding aggregations, but it can also result from a food abundance in a specific area (Behrens, 2005). For example, the nudibranch *Onchidoris bilamellata* aggregate for spawning closer to its major prey species, the barnacle *Semibalanus balanoides* (Claverie & Kamenos, 2008). On the other hand, the nudibranch *Gymnodoris ceylonica* was observed aggregated for mating and spawning in an area with no signs of prey suggesting that these nudibranchs might not have been attracted by food sources (Huang, 2010). Locating a mate has generally been regarded as a precourtship or pre-copulatory process (Ng et al. 2013), but also means protection when intraspecific chemical communication warns marine molluscs about a potential predatory threat (Derby 2007).

Our results revealed that *C. rumia* can detect and differentiate among several nature of

waterborne cues or signals, demonstrating the precision of nudibranch orientation in response to chemicals released directly into the seawater column. Since cues are often precursors of signals that evolve via chemical ritualization (Steiger et al. 2011), recognizing the processes of chemical communication is crucial for understanding the origin and dynamic evolution of chemical information transfer. The detection of chemicals is undeniably a crucial strategy employed by nudibranchs in their ecological interactions, presumably serving to amplify their chances of survival and reproductive success, thereby influencing population dynamics and evolutionary ecology within the species and enhancing their ecological performance.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to Dr. Marcelo Tardelli for his assistance in the collections of organisms in the field. T. B. thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for her Doctoral Degree Fellowship. R. C. thanks Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) for financial support provided by the Scientist of the State Program. D. B. S. thanks Petrobras and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for postdoctoral fellowship.

### **References**

- Beattie MC, Moore PA. Predator recognition of chemical cues in crayfish: diet and experience influence the ability to detect predation threats. *Behaviour* 2018; 155: 505-530.
- Becerro MA, Starmer JA, Paul VJ. Chemical defenses of cryptic and aposematic Gastropod molluscs feeding on their host sponge *Dysidea granulosa*. 2006; *J. Chem. Ecol.* 32:1491-1500.
- Becerro MA, Turon X, Uriz MJ, Templado J. Can a sponge feeder be a herbivore? *Tyrodina perversa* (Gastropoda) feeding on *Aplysina aerophoba* (Demospongiae). *Biol.*

J. Linn. Soc. 2003; 78: 429-438.

Behrens DW. *Nudibranch Behavior*. Jacksonville: New Publications, 2005; 176p.

Belmonte T, Alvim J, Padula V, Muricy G. Spongivory by nudibranchs on the coast of Rio de Janeiro state, southeastern Brazil. *Spixiana* 2015; 38: 187-195.

Bornancin L, Bonnard I, Mills SC, Banaigs B. Chemical mediation as a structuring element in marine gastropod predator-prey interactions. *Nat. Prod. Rep.* 2017; 34: 644.

Bourdeau PE, Padilla DK. Cue specificity of predator-induced phenotype in a marine snail: is a crab just a crab? *Mar. Biol.* 2019; 166: 84.

Calcabrini C, Catanzaro E, Bishayee A, Turrini E, Fimognari C. Marine sponge natural products with anticancer potential: an updated review. *Mar. Drugs* 2017; 15: 310.

Cheney KL, White A, Mudiante IW, Winters AE, Quezada M, Capon RJ, et. al. Choose your weaponry: selective storage of a single toxic compound, Latrunculin A, by closely related nudibranch molluscs. *PLoS One* 2016; 11: e0145134.

Cimino G, Ghiselin MT. Chemical defence and evolutionary trends in biosynthetic capacity among dorid nudibranchs (Mollusca: Gastropoda: Opisthobranchia). *Chemoecology* 1999; 9: 187-207.

Cimino G, Ghiselin MT. Chemical defence and the evolution of opisthobranch gastropods. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 2009; 60: 175-422.

Claverie T, Kamenos NA. Spawning aggregations and mass movements in subtidal *Onchidoris bilamellata* (Mollusca: Opisthobranchia). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 2008; 88: 157-159.

Coleman RA, Ramchunders SJ, Davies KM, Moody AJ, Foggo A. Herbivore-induced infochemicals influence foraging behaviour in two intertidal predators. *Oecologia* 2007; 151: 454-463.

Cronin G, Hay ME. Susceptibility to herbivores depends on recent history of both the plant

and animal. *Ecology* 1996; 77: 1531–1543.

Dayton PK, Robilliard GA, Paine RT, Dayton LB. Biological accommodation in the benthic community at McMurdo Sound, Antarctica. *Ecol. Monogr.* 1974; 44: 105-128.

Dean, LJ, Prinsep MR. The chemical and chemical ecology of nudibranch. *Nat. Prod. Rep.* 2017; 34: 1359.

Derby CD. Escape by inking and secreting: marine molluscs avoid predators through a rich array of chemicals and mechanisms. *Biol. Bull.* 2007; 213: 274-289.

Derby CD. Chemoreception in aquatic invertebrates. In: Fritsch, B. & Meyerhof, W. (Ed.). *The senses: a comprehensive reference*, 3<sup>ed</sup>, Elsevier, Academic Press, 2020; pp. 65-84.

Faulkner DJ, Ghiselin MT. Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1983; 13: 295-301.

Garcia FJG, Domínguez M, Troncoso, J. S. 2008. *Opisthobranchios de Brasil*. Feito SL.

Goodheart JA, Ellingson RA, Vital XG, Galvão-Filho HC, McCarthy JB, Medrano SM, et al. Identification guide to the heterobranch sea slugs (Mollusca: Gastropoda) from Bocas Del Toro, Panama. *Mar. Biodivers. Rec.* 2016; 9: 56

Hay ME. Marine chemical ecology: Chemical signals and cues structure marine populations: communities and ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2009; 1: 193-212.

Huang HD. Field observations of group reproduction in *Gymnodoris ceylonica* (Kelaart, 1858) (Gastropoda: Nudibranchia) at Lanyu (Orchid Is.), Taiwan. *Coll. Res. Libr.* 2010; 23: 37-41.

Jormalainen V, Honkanen T. Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring temperate marine communities. In Amsler CD. *Algal chemical ecology*. 2008. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Jutfelt F, Sundin J, Raby GD, Krang AS, Clark TD. Two-current choice flumes for testing

- avoidance and preference in aquatic animals. *Methods in Ecol. Evol.* 2017; 8: 379-390.
- Kamio M, Derby D. Finding food: How marine invertebrates use chemical cues to track and select food. *Nat. Prod. Rep.* 2017; 34: 514-528.
- Kamio M, Yambe H, Fusetani N. Chemical cues for intraspecific chemical communication and interspecific interactions in aquatic environments: applications for fisheries and aquaculture. *Fish Sci.* 2022; 88: 203–239.
- Knowlton AL, Highsmith RC. Nudibranch-sponge feeding dynamics: Benefits of symbiont-containing sponge to *Archidoris montereyensis* (Cooper, 1862) and recovery of nudibranch feeding scars by *Halichondria panicea* (Pallas, 1766). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2005; 327: 36-46.
- Lambert WJ, Todd CD. Evidence for a water-borne cue inducing metamorphosis in the dorid nudibranch mollusk *Adalaria proxima* (Gastropoda: Nudibranchia). *Mar. Biol.* 1994; 120: 265-271.
- Large SI, Smee DL, Trussell GC. Environmental conditions influence the frequency of prey responses to predation risk. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2011; 422: 41-49.
- Lee Y-J, Cho Y, Tran HNK. Secondary metabolites from the marine sponges of the genus *Petrosia*: A literature review of 43 years of research. *Mar. Drugs* 2021; 19: 122.
- Mach ME, Bourdeau PE. To flee or not to flee? Risk assessment by a marine snail in multiple cue environments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2011; 409: 166-171.
- Marin A, López MD, Esteban MA, Meseguer J, Muñoz J, Fontana A. Anatomical and ultrastructural studies of chemical defence in the sponge *Dysidea fragilis*. *Mar. Biol.* 1998; 131: 639–645.
- McCullagh GB, Bishop CD, Wyeth RC. One rhinophore probably provides sufficient sensory input for odourbased navigation by the nudibranch mollusk *Tritonia diomedea*. *J. Exp. Biol.* 2014; 217: 4149-4158.

Moore PA, Atema, J. Spatial information in the three-dimensional fine structure of an aquatic odor plume. *Biol. Bull.* 1991; 181: 408-418.

Moore PA, Grills JL. Chemical orientation to food by the crayfish *Orconectes rusticus*: influence of hydrodynamics. *Anim. Behav.* 1999; 58: 953-963.

Murray JA, Willows AOD. Function of identified nerves in orientation to water flow in *Tritonia diomedea*. *J. Comp. Physiol. A.* 1996; 178: 201–209. doi.org/10.1007/BF00188162

Murray JA, Estep J, Cain D. Advances in the neural bases of orientation and navigation. *Integr. Comp. Biol.* 2006; 46: 871-879.

Murphy BF, Hadfield MG. Chemoreception in the nudibranch gastropod *Phestilla sibogae*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; 118: 727-735.

Nakashima Y. Mucous trail following in 2 intertidal nudibranchs. *J. Ethol.* 1995. 13: 125-128.

Ng TPT, Saltin SH, Davies MS, Johannesson K, Stafford R, Williams GA. Snails and their trails: the multiple functions of trail-following in gastropods. *Biol. Rev.* 2013. 88: 683-700.

Nocchi N, Soares AR, Souto ML, Fernandez JJ, Martins MN, Pereira RC. Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliana*. *PLoS One* 2017; 12: e0187126.

Otte D. Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Annu Rev Ecol Syst.* 1974; 5: 385-417.

Pawlik JR. Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.* 1993; 93: 1911-1922.

Peacor SD. Behavioural response of bullfrog tadpoles to chemical cues of predation risk are affected by cue age and water source. *Hydrobiologia* 2006; 573: 39-44.

Penney BK. How specialized are the diets of northeastern pacific sponge-eating dorid nudibranchs? *J. Molluscan Stud.* 2013; 79: 64-73.

Quinlan PD, Katz P. S. State-dependent, visually-guided behaviors in the nudibranch *Bergia*



stephanieae. *BioRxIV* preprint version. 2022.

Richelle-Maurer E, de Kluijver MJ, Feio S, Gaudencio S, Gaspar H, Gomez R, Tavares R, van de Vyver G, van Soest RWM. Localization and ecological significance of oroidin and sceptrin in the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2003; 31: 1073-1091.

Rudman WB, Bergquist PR. A review of feeding specificity in the sponge-feeding Chromodorididae (Nudibranchia: Mollusca). *Molluscan Res.* 2007; 27: 60-88.

Santoja M, Greff S, Croller ML, Thomas OP, Pérez T. Distance interaction between marine cave-dwelling sponges and crustaceans. *Mar. Biol.* 2018; 165: 121.

Seavy BE, Muller-Parker G. Chemosensory and feeding responses of the nudibranch *Aeolidia papillosa* to the symbiotic sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Invertebr. Biol.* 2002; 121: 115-125.

Steiger S, Schmitt T, Schaefer HM. The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2011; 278: 970–979. doi: 10.1098/rspb.2010.2285 PMID: 21177681

Ternon, E, Zarate L, Chenesseau S, Croué J, Dumollard R, Suzuki MT, Thomas OP. Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *C. crambe*. *Sci. Rep.* 2016; 6: 29474.

Thacker RW, Becerro MA, Lumbang WA, Paul VJ. Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. *Ecology* 1998; 79: 1740-1750.

Wägele H. Potential key characters in Opisthobranchia (Gastropoda, Mollusca) enhancing adaptive radiation. *Org Div Evol* 2004; 4: 175-188.

Weiss I, Rössler T, Hofferberth J, Brummer M, Ruther J, Stökl J. A nonspecific defensive compound evolves into a competition avoidance cue and a female sex pheromone. *Nature communications.* 2013; 4: 1–11.

Weissburg MJ, Ferner MC, Pisut DP, Smee, DL. Ecological consequences of chemically

mediated prey perception. *J. Chem. Ecol.* 2002; 28: 1953-1970.

Weissburg MJ, Zimmer-Faust RK. Life and death in moving fluids: hydrodynamic effects on olfactory-mediated predation. *Ecology* 1993; 74: 1428–1443.

Weissburg MJ, Zimmer-Faust RK. Odor plumes and how blue crabs use them in finding prey. *J Exp. Biol.* 1994; 197: 349-375.

Wu Q, Li S-W, Voogd NJ, Wang H, Yao L-G, Guo Y-W, Li X-W. Marine alkaloids as the chemical marker for the prey–predator relationship of the sponge *Xestospongia* sp. and the nudibranch *Jorunna funebris*. *Mar. Life sci. Technol.* 2021; 3: 375-381.

Wyeth RC. Olfactory navigation in aquatic gastropods. *J. Exp. Biol.* 2019; 222: jeb 185843.

Wyeth RC, Willows AOD. Odours detected by rhinophores mediate orientation to flow in the nudibranch mollusk, *Tritonia diomedea*. *J. Exp. Biol.* 2006a; 209: 1441-1453.

Wyeth RC, Willows AOD. Field behavior of the nudibranch mollusk *Tritonia diomedea*. *Biol. Bull.* 2006b; 210: 81-96.

Wyeth RC, Woodward OM, Willows AOD. Orientation and navigation relative to water flow, prey, conspecifics, and predators by the nudibranch mollusk *Tritonia diomedea*. *Biol. Bull.* 2006; 210: 97-108.

Zimmer RK, Ferrier GA, Kim SJ, Ogorzalek LRR, Zimmer CA, Loo JA. Keystone predation and molecules of keystone significance. *Ecology* 2017; 98: 1710-1721.

Zimmer-Faust RK, Finelli CM, Pentcheff ND, Wetthey DS. Odor plumes and animal navigation in turbulent water flow: a field study. *Biol. Bull.* 1995; 188: 111-116.

Zimmer-Faust RK, O’neill PBO, Schar DW. The relationship between predator activity state and sensitivity to prey odor. *Biol. Bull.* 1996; 190: 82-87.

## List of figures

**Fig 1. Nudibranch chemotaxis behavior.** Number of choices of *C. rumia* observed during the Y-maze experiments with two-current choice flume. Control refers to natural seawater and treatment to signalized seawater during 1h and 6h. Experiments were carried out in replicate, set 1 and set 2. Individuals without moving after 10 min were not computed in statistical analyses (No choice).

**Fig 2. Time to choice.** Variation on time spent to *C. rumia* specimens to make their choice during the Y-maze experiments with two-current choice flume. Control refers to natural seawater and treatment to signalized seawater during 1h and 6h. Experiments were carried out in replicate, set 1 and set 2.

**S1 Fig 1. Y-maze aquarium.** A. Color mixture zone test in Y-maze aquarium. B. Nudibranch *Cadlina rumia* positioned in the base at the initial point. C. Evolution of the movement of the nudibranch. D. Nudibranch choose a side and entered in the branch. E. Nudibranch reached to the treatment waterborne source.

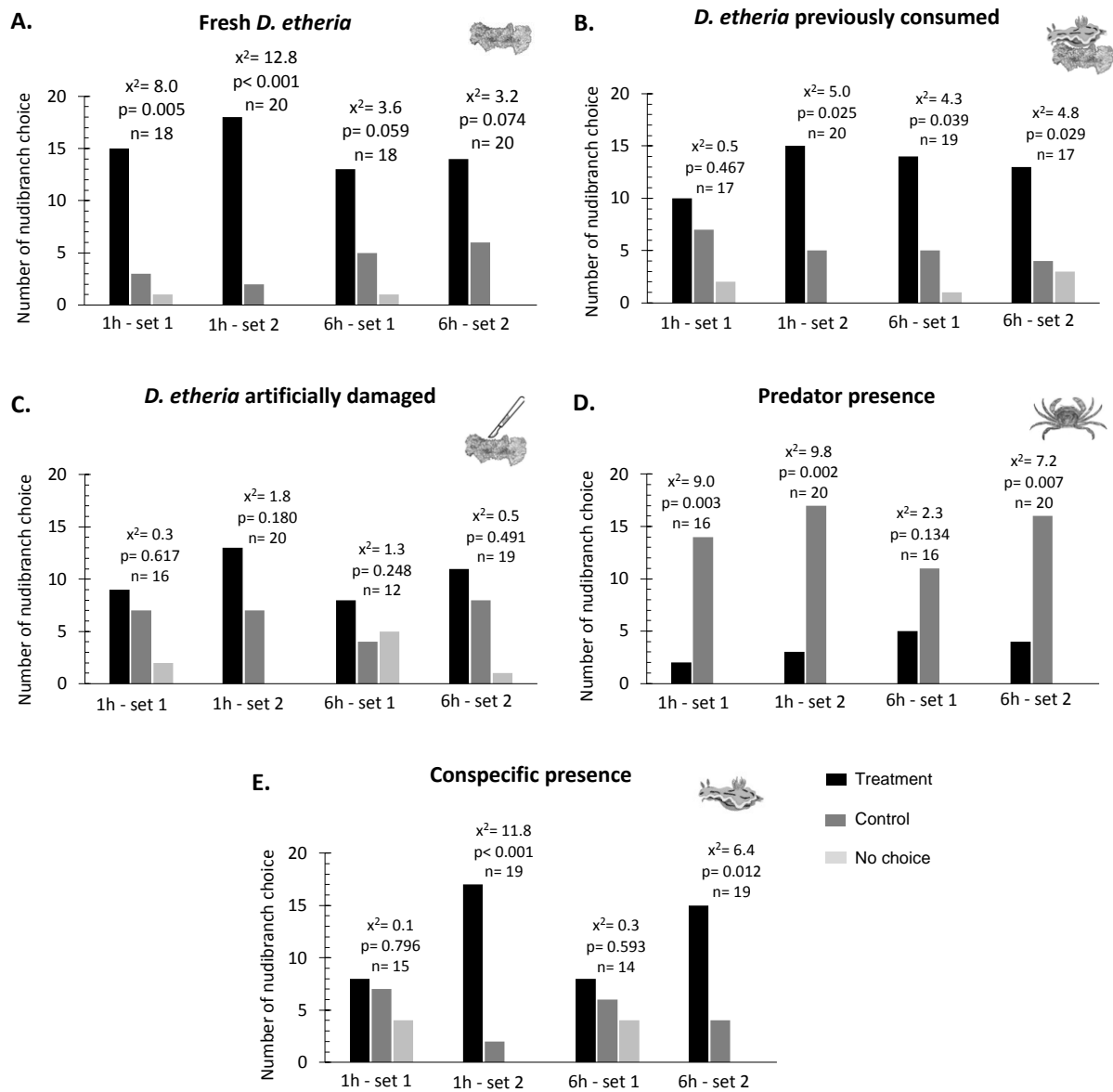


Fig 1.

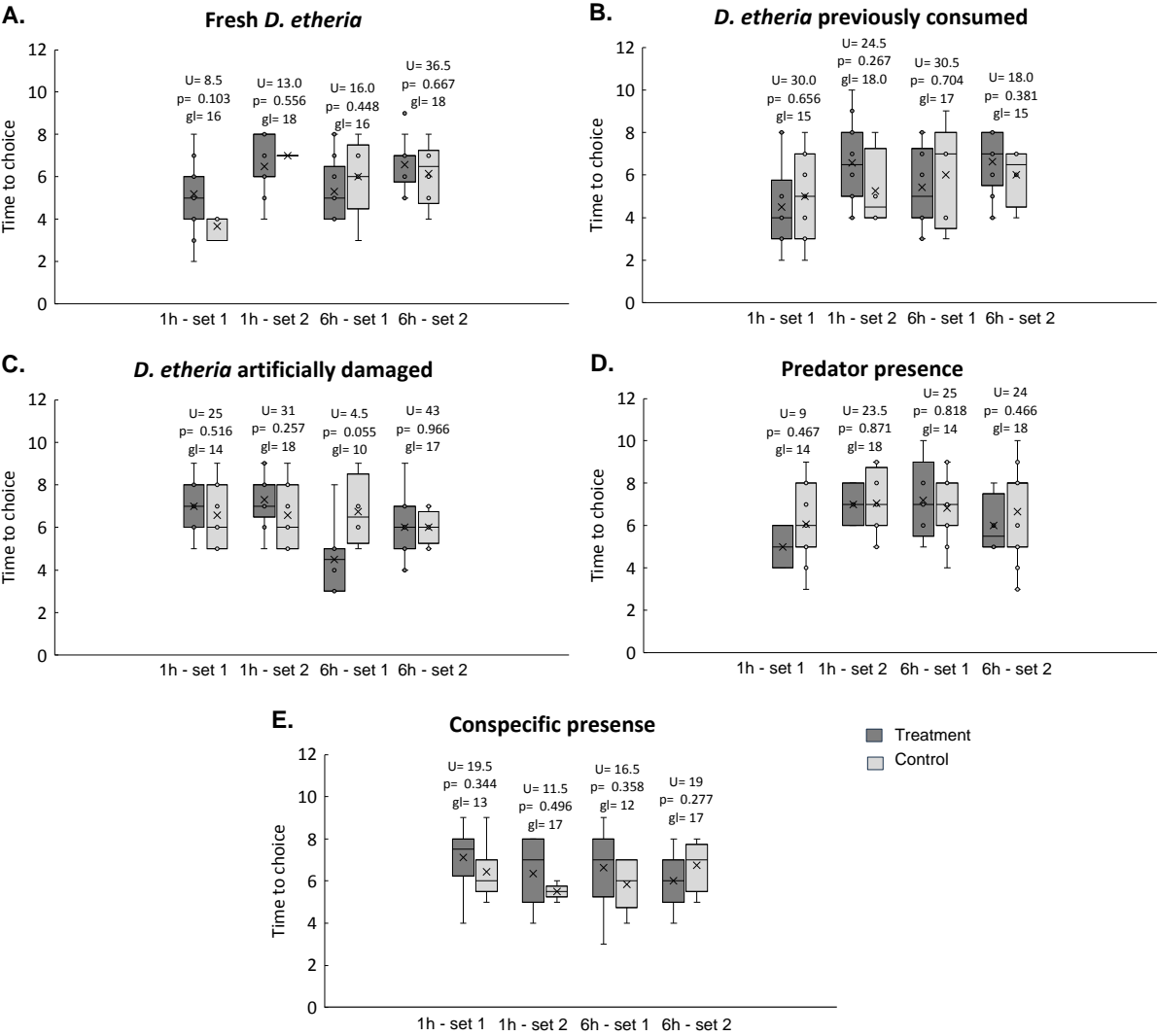
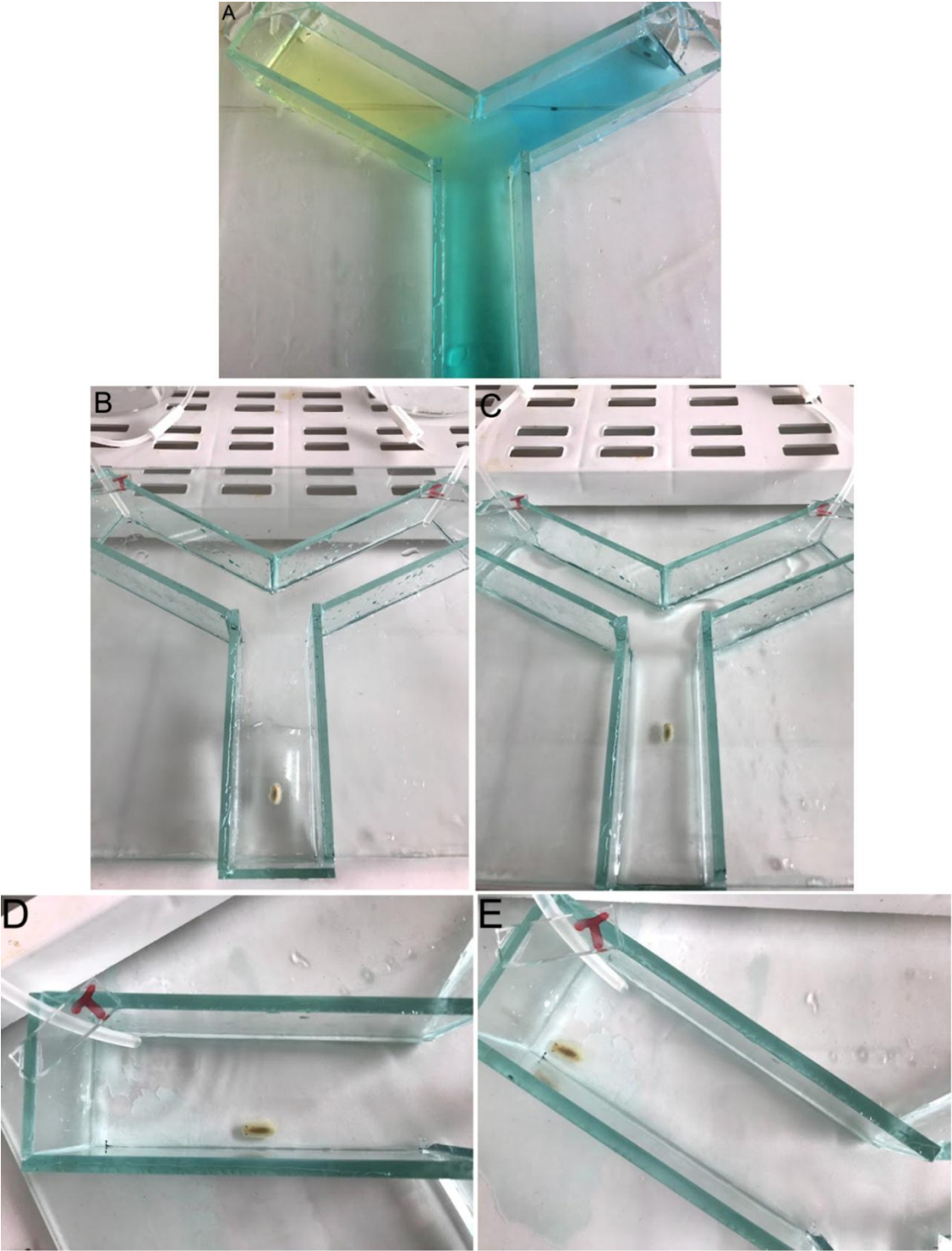


Fig 2.

S1 Fig 1.



## 2 – EFEITOS DAS INTERAÇÕES ENTRE NUDIBRÂNQUIOS, ESPONJAS E O CARANGUEJO PREDADOR *Pachygrapsus transversus*: UM CASO DE INTERAÇÃO TRITRÓFICA?

### 2.1 INTRODUÇÃO

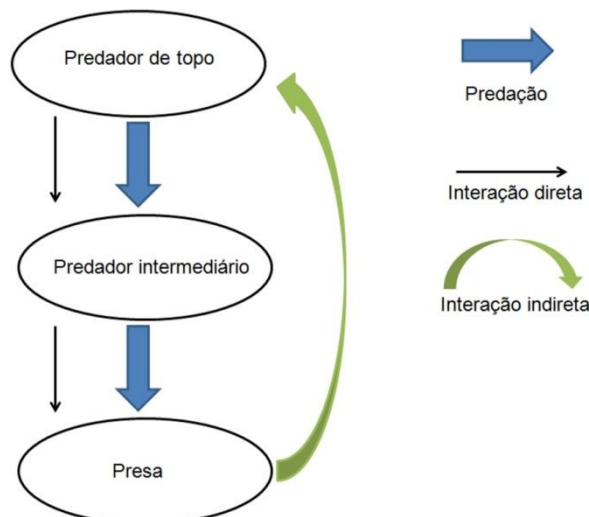
Nos ecossistemas marinhos existem múltiplas interações entre os organismos, e parte dessas interações formam uma teia alimentar com predadores de topo, predadores intermediários e produtores vivendo em um sistema balanceado (HOLLOWELL, 2013). Processos ecológicos e evolutivos sobre as interações das espécies só podem ser totalmente compreendidos após se considerar o sistema multitrófico em que estas estão inseridas (ABDALA-ROBERTS et al., 2019).

As interações entre espécies podem ser diretas ou indiretas, produzindo resultados positivos e negativos (BELL & WILLIAMSON, 2017). Um efeito direto ocorre como resultado de uma interação física entre duas espécies, como a predação (HOLLOWELL, 2013). Efeitos indiretos ocorrem em comunidades com múltiplas espécies, quando a ação de uma espécie causa uma mudança em uma segunda espécie, impactando subsequentemente uma terceira espécie. Este tipo de interação indireta inclui processos como as interações tritróficas (BELL & WILLIAMSON, 2017).

Interações tritróficas ocorrem quando uma mudança em uma característica (densidade, tamanho, comportamento ou a mera presença) da primeira espécie (emissora) causa uma mudança no comportamento da segunda espécie (transmissora), afetando uma terceira espécie (receptora) (VALBUENA-GONZALO, 2019). As interações tritróficas determinam a dinâmica populacional e evolutiva das espécies em todos os níveis tróficos, elucidando aspectos fundamentais sobre a estrutura das comunidades (ABDALA-ROBERTS et al., 2019). A liberação de substâncias químicas após o ataque das espécies de nível trófico intermediário pode fornecer indícios de disponibilidade de alimento para predadores do topo da cadeia, promovendo assim interações multitróficas (COLEMAN et al., 2007). Os efeitos indiretos da atração dos predadores de topo alteram o comportamento dos predadores intermediários, modificando sua interação com a presa, reduzindo

significativamente sua atividade de alimentação e favorecendo os níveis tróficos inferiores (Figura 5) (SAVOCA & NEVITT, 2014).

Figura 5 – Modelo de interações tritróficas.



Legenda: Interações mediadas quimicamente entre os predadores de topo, predadores intermediários e presas. A interação tritrófica ocorre quando a presa emite sinais químicos capazes de atrair os predadores de topo a fim de reduzir a atividade dos predadores intermediários, gerando benefícios às presas. Esta relação entre presas e predadores de topo ocorre através da interação indireta.

Fonte: adaptado de Valbuena-Gonzalo, 2019.

As interações tritróficas têm sido amplamente estudadas em sistemas terrestres envolvendo plantas e insetos (STEINKE et al., 2002). Diversas espécies de plantas interagem com predadores de topo para ganhar proteção frente a herbivoria. Tais interações tritróficas são frequentemente mediadas por substâncias voláteis liberadas pelas plantas em resposta ao consumo dos insetos (DICKE & BALDWIN, 2010). Essas interações são consideradas ‘defesas indiretas’, pois a produção das substâncias voláteis pode não afetar diretamente a herbivoria, mas tornam os insetos mais suscetíveis à predação (DICKE & SABELIS, 1988).

Interações similares também têm sido estudadas nos sistemas marinhos (STEINKE et al., 2002). Pesquisas sobre interações tritróficas têm focado na interação de espécies onde, geralmente, uma macroalga está associada a um herbívoro e este a um predador considerado inimigo natural (ABDALA-ROBERTS et al., 2019). Coleman et al. (2007) demonstraram experimentalmente que pistas químicas, liberadas pela macroalga parda *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis, 1863, transmitidas pela água do mar quando consumidas pelo gastrópode *Littorina obtusata* (Linnaeus, 1758),



atraem o caranguejo predador *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758). Portanto, para o caranguejo, reagir às pistas químicas liberadas pelas macroalgas lesionadas pela herbivoria parece ser mais confiável do que reagir às pistas liberadas pelos gastrópodes (COLEMAN et al., 2007). Por outro lado, ensaios de interações tritróficas no habitat natural, sob condições realistas, mostraram que os sinais químicos provenientes da macroalga parda *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, 1820 e da macroalga verde *Ulva* sp., previamente consumidas por herbívoros, falharam em atrair os predadores de topo (DOLECAL & LONG, 2014).

Devido aos poucos estudos sobre sinalização tritrófica em organismos marinhos, ainda não foi elucidada a maneira como os predadores de topo frequentemente usam estas pistas químicas para encontrar suas presas (herbívoros), especialmente sob um contexto realista, isto é, no ambiente natural (DOLECAL & LONG, 2014). Porém, estas interações devem ocorrer nos oceanos através do forrageamento quimiossensorial. Por exemplo, alguns táxons de macroalgas produzem químicas defensivas induzidas pela herbivoria e percebidas pelos predadores (STEINKE et al., 2002). Essas são consideradas interações indiretas mediadas por mudanças fisiológicas (VALBUENA-GONZALO, 2019).

Predadores marinhos comumente se utilizam de pistas químicas transmitidas pela água para encontrar suas presas. Pistas químicas são altamente persistentes e percorrem longas distâncias, tornando-as uma ferramenta particularmente útil no forrageamento à distância (WEISSBURG, 2012). Essas substâncias químicas, que podem ser percebidas em baixíssimas concentrações, têm um papel importante no ajuste comportamental ou fisiológico dos organismos predadores (DOLECAL & LONG, 2014).

Os nudibrânquios são conhecidos por suas defesas químicas obtidas diretamente de suas dietas alimentares (BEHRENS, 2005; CIMINO & GUISELIN, 2009). Na literatura existem alguns registros de ocorrência da ação de possíveis predadores sobre nudibrânquios (e.g. RUDMAN, 2000), embora muitos desses ataques terminem com a rejeição da presa. Essas rejeições são indicadores de que a predação sobre nudibrânquios é um evento raro (VÁLDES et al., 2013).

No entanto, apesar da eficiência das defesas químicas, alguns predadores conseguem ultrapassar essa barreira e alimentam-se dos nudibrânquios (ANKER e IVANOV, 2020). No habitat natural, tentativas de predação de anêmonas-do-mar sobre nudibrânquios foram observadas em duas regiões distintas, na Malásia (van der MEIJ & REIJNEN, 2012) e na Califórnia (HAYES & SCHULTZ, 2022). No primeiro caso, o nudibrânquio doridáceo *Nembrotha lineolata* Bergh, 1905 conseguiu escapar totalmente da predação pelas anêmonas, deixando para trás um fino rastro de muco (van der MEIJ & REIJNEN, 2012). Já na segunda abordagem, o nudibrânquio *Peltodoris nobilis* (MacFarland, 1905) foi parcialmente digerido pela anêmona *Anthopleura artemisia* (Pickering in Dana, 1846) (HAYES & SCHULTZ, 2022).

Outros eventos de predação confirmados referem-se aos picnogônidos, artrópodes conhecidos como aranhas-do-mar (ROGERS et al., 2000; ARANGO & BRODIE, 2003); moluscos gastrópodes do gênero *Conus* Linnaeus, 1758 (VALDÉS et al., 2013); e outras espécies de nudibrânquios doridáceos como o gênero *Gymnodoris* W. Stimpson, 1855 (NAKANO & HIROSE, 2011) e *Roboastra* Bergh, 1877 (MEGINA & CERVERA, 2003; BEHRENS, 2005). Também foi confirmada a predação *in situ* do nudibrânquio doridáceo *Mexichromis mariei* (Crosse, 1872) por uma espécie de caranguejo da infraordem Brachyura (ANKER & IVANOV, 2020). O nudibrânquio cladobrânquio *Phestilla sibogae* Bergh, 1905 é especialista no consumo de cnidários do gênero *Porites* Link, 1807. Este nudibrânquio é vulnerável à predação por peixes recifais generalistas e caranguejos da infraordem Brachyura que residem dentro das colônias do coral. A predação desses crustáceos sobre o nudibrânquio *P. sibogae* sugere benefícios indiretos às colônias de *Porites* sp. ao remover esses moluscos estabelecidos em seus tecidos (GOCHFELD & AEBY, 1997).

Caranguejos braquiúros também foram observados, experimentalmente, consumindo as desovas de nudibrânquios. Foram analisadas a vulnerabilidade das massas de ovos de duas espécies de nudibrânquios em relação à três tipos de comportamentos de caranguejos generalistas: consumo comprovado, dano encontrado e manipulação observada. Para o nudibrânquio cladobrânquio *Hermisenda crassicornis* (Eschscholtz, 1831) foi confirmada a predação e para o nudibrânquio

doridáceo *Onchidoris bilamellata* (Linnaeus, 1767) foi observada somente a manipulação da massa de ovos (MAYHEW, 2022).

Os crustáceos da infraordem Brachyura são artrópodes decápodos conhecidos como “caranguejos verdadeiros”. Possuem cinco pares de apêndices locomotores, sendo o primeiro deles modificado em forma de garra (quelas) (BRUSCA, 2018). Eles possuem estruturas sensoriais, chamadas sensilas, localizadas em várias partes do corpo, principalmente nas antenas, bocas e quelas (HALLBERG & SKOG, 2011).

Através das sensilas e outras estruturas sensoriais, os caranguejos utilizam-se da quimiopercepção, que é a capacidade dos organismos em detectar e responder à estímulos químicos no ambiente (HALLBERG & SKOG, 2011). De maneira geral, as substâncias químicas presentes na água desempenham importantes papéis em vários estágios da vida dos crustáceos (THIEL & BREITHAUPT, 2011) como, por exemplo, para encontrar seus parceiros sexuais; mostrar sinais de dominância; reconhecer coespecíficos; encontrar alimento e abrigo, e perceber ameaças como a presença de predadores (HAY, 2011).

Os caranguejos decápodos da infraordem Brachyura são considerados excelentes organismos ‘modelo’ para analisar a relação entre a quimiopercepção e o forrageamento sob condições laboratoriais (ZIMMER-FAUST, 1989; ZIMMER-FAUST et al., 1995; 1996; HAY, 2011). Uma das razões é que estes organismos exibem um comportamento claro de resposta na busca por alimento (ZIMMER-FAUST, 1989).

Ao longo da costa sudeste do Brasil, o caranguejo *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850) é provavelmente a espécie de caranguejo braquiúro mais comum nas zonas entremarés de costões rochosos. Além de sua abundância, este crustáceo parece ser uma espécie-chave nessas regiões rochosas devido ao seu hábito alimentar onívoro generalista (FLORES & NEGREIROS-FRANSOZO, 1999; CHRISTOFOLETTI et al., 2010).

Sob condições laboratoriais, *Pachygrapsus transversus* apresentou comportamento alimentar oportunista quando oferecidas macroalgas e invertebrados separadamente. Quando os dois grupos foram oferecidos simultaneamente, o caranguejo apresentou comportamento seletivo para o

consumo de animais. Esta estratégia alimentar onívora de *P. transversus* é um importante comportamento adaptativo desta espécie e explica sua presença em diversos habitats, como costões rochosos, píers e outras estruturas artificiais (CHRISTOFOLETTI et al., 2010).

Na poça de maré localizada na saída do Canal de Itajuru, em Cabo Frio (RJ) o caranguejo *P. transversus* coocorre com nudibrânquios e esponjas. Acredita-se que *P. transversus* é um possível predador do nudibrânquio *Cadlina rumia* e pode ser influenciado na busca por seu alimento por sinais químicos emitidos pela esponja marinha *Dysidea etheria*, quando estas são consumidas pelos nudibrânquios.

## 2.2 OBJETIVO

Avaliar a existência de interação tritrófica entre o caranguejo *Pachygrapsus transversus*, potencial predador do nudibrânquio *Cadlina rumia* e sua presa, a esponja *Dysidea etheria*.

### 2.2.1 Hipótese

Odores liberados pela esponja *Dysidea etheria*, quando predada pelo nudibrânquio *Cadlina rumia*, atuam como pistas químicas para o caranguejo *Pachygrapsus transversus* localizar sua própria presa, o nudibrânquio.

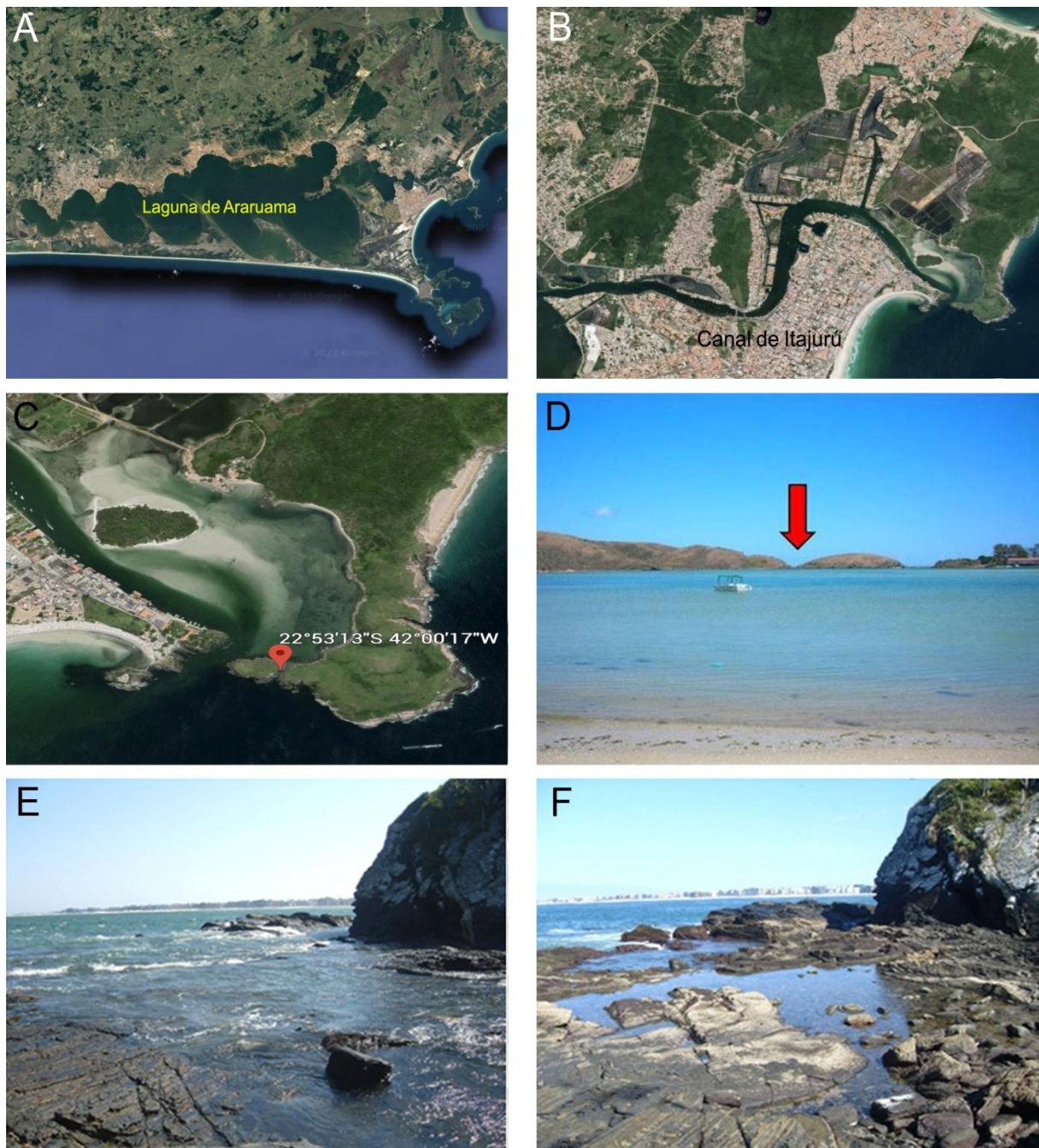
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido em uma poça de maré do Canal de Itajurú, no município de Cabo Frio (22°52'S; 42°01'08"O), no litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. O local escolhido apresenta ecossistema de costão rochoso, colonizado por uma rica fauna de invertebrados bentônicos (PADULA, 2014). Nos últimos anos, a maioria dos trabalhos sobre taxonomia, ecologia, genética e química de produtos naturais envolvendo nudibrânquios no estado do Rio de Janeiro, provém de espécies encontradas na grande região de Cabo Frio (e.g. DACOSTA et al., 2010; ALVIM & PIMENTA, 2013; BELMONTE et al., 2015; RAMIREZ et al., 2017).

O Canal de Itajurú (22°53'1"S; 42°00'1"O) está localizado na extremidade leste da Laguna de Araruama, sendo a única ligação da laguna com o Oceano Atlântico (Figuras 6 A e B) (LESSA, 1991). A área onde os organismos foram observados e coletados é uma região de mesolitoral, localizada na formação rochosa a leste da embocadura do Canal de Itajurú (Figuras 6 C e D). Nesta região formam-se poças de maré, cujo acesso se dá através de uma trilha percorrida a pé, ou pela margem esquerda do canal de aproximadamente 1 km de distância. Quando a maré enche, esta área torna-se batida pela ação das ondas vindas do oceano e todo o local fica submerso (Figura 6 E). Durante a maré baixa o local torna-se calmo e propício para a realização das observações e coletas, pois praticamente todas as rochas ficam expostas ao ar. Os nudibrânquios e as esponjas são encontrados embaixo das rochas (BELMONTE et al., 2015). Os caranguejos também são encontrados próximos às rochas. As observações subaquáticas e as coletas dos organismos foram realizadas durante o período da maré baixa (Figura 6 F).

Figura 6 - Área de estudo no litoral de Cabo Frio.



Legenda: A e B. Imagem de satélite da Laguna de Araruama e do Canal de Itajuru, respectivamente; C. Localização da área amostrada a leste da embocadura do Canal de Itajuru; D. Vista da região entremarés a partir do canal (seta vermelha indica local de coleta); poças de maré durante a preia-mar (E) e baixa-mar (F).

Fonte: A, B e C, Google Earth; D, RIBEIRO, S.; E e F, A autora, 2023.

### 3.2 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS

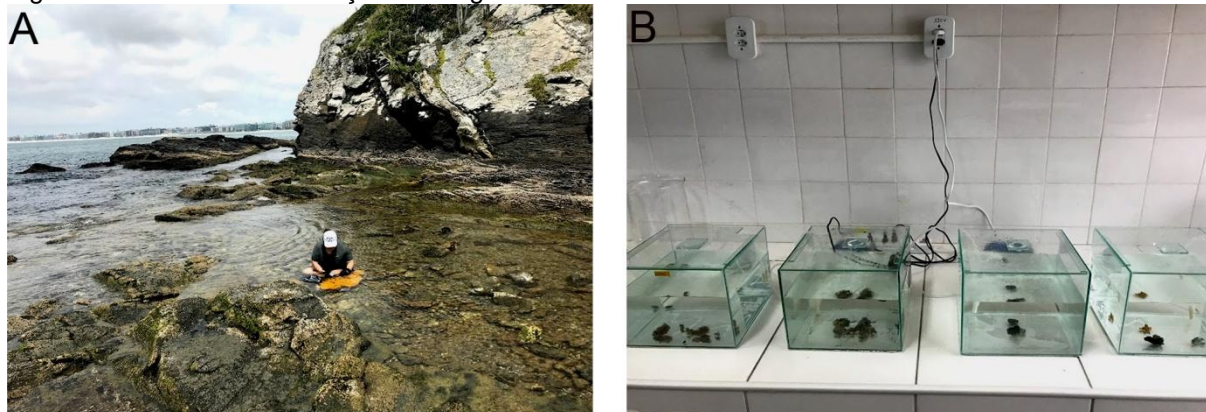
Indivíduos do nudibrânquio *Cadlina rumia*, da esponja *Dysidea etheria* e do caranguejo *Pachygrapsus transversus* foram coletados manualmente usando o auxílio de pinças e facas de mergulho (Figura 7 A). As coletas ocorreram entre os meses de novembro de 2019 até março de 2020, e, posteriormente, em dezembro de 2020. Este intervalo de tempo entre os períodos de coleta foi em razão da paralização das atividades devido à pandemia de Covid-19. Após as coletas, os organismos foram transportados vivos e alocados separados em recipientes contendo água do mar (500 mL). Em seguida, os espécimes foram conduzidos ao Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) para realização dos ensaios de interação tritrófica. As coletas foram realizadas com autorização do Sisbio/ICMBio sob o nº 66886-2.

Os organismos utilizados nos experimentos foram acondicionados e mantidos separados em aquários (10 L) de água do mar com aeração constante (Figura 7 B). A troca de água dos aquários era realizada uma ou duas vezes por semana. Durante a manutenção dos organismos a temperatura da água variou entre 23 °C e 26 °C e a salinidade mantida em 35.

Para a realização dos experimentos, espécimes da esponja *D. etheria* e do caranguejo *P. transversus* foram coletados, preferencialmente, nas semanas que precediam os ensaios a fim de se utilizar sempre organismos potencialmente saudáveis. Os caranguejos foram mantidos em jejum por 48 h antes do início de cada ensaio (metodologia adaptada de WEISSBURG & ZIMMER-FAUST, 1994).

Foram realizados quatro tipos de ensaios para avaliar a capacidade de orientação do caranguejo *P. transversus* em relação às pistas químicas liberadas na água do mar. Os organismos coletados entre novembro de 2019 e março de 2020 foram utilizados nos três primeiros ensaios. Novos organismos coletados em dezembro de 2020 foram utilizados no quarto ensaio.

Figura 7 – Coleta e manutenção dos organismos.



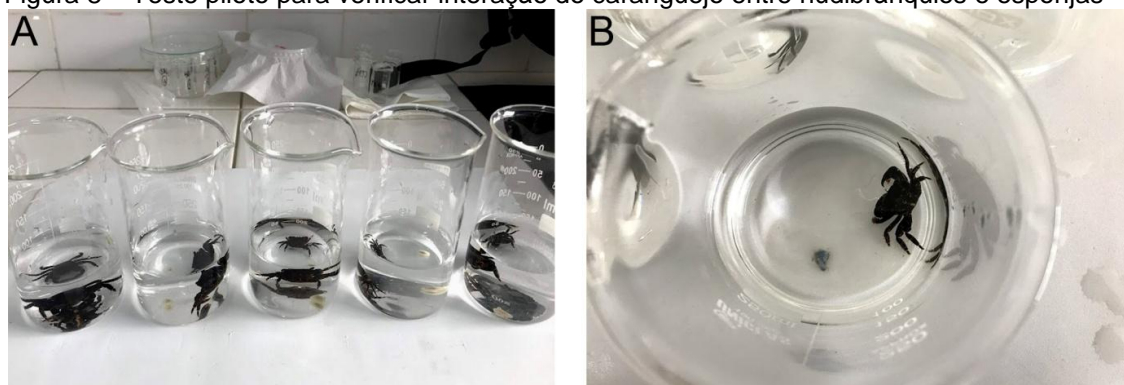
Legenda: A. Coleta manual dos organismos na poça de maré do Canal de Itajurú, Cabo Frio; B. Manutenção dos organismos em aquários (10L, tamanho 30Cx20Ax20L cm) no Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos – IEAPM.

Fonte: A autora, 2023.

### 3.3 TESTE PILOTO SOBRE ESCOLHA DO PREDADOR-CARANGUEJO

Previamente aos ensaios de interação tritrófica, o caranguejo *P. transversus* foi colocado em contato direto com os nudibrânquios para confirmar a escolha desta espécie como possível predador de topo dos gastrópodes. Em um béquer de vidro contendo 100 ml de água do mar foram colocados indivíduos adultos ( $n=5$ ) recém coletados do caranguejo ( $2,1\text{ cm} \pm 0,39$ ) e do nudibrânquio *C. rumia* ( $1,3\text{ cm} \pm 0,44$ ) a fim de confirmar a interação de predador-presa entre as espécies (Figura 8 A). Durante 1 h foi observado o comportamento predatório do caranguejo. O mesmo teste-piloto foi realizado utilizando o caranguejo e a esponja *D. etheria* ( $n=5$ ) para avaliar possíveis interações (Figura 8 B).

Figura 8 – Teste piloto para verificar interação do caranguejo entre nudibrânquios e esponjas



Legenda: Caranguejos (largura média da carapaça de 2,1 cm) em contato direto com nudibrânquios (A) e esponjas (B).

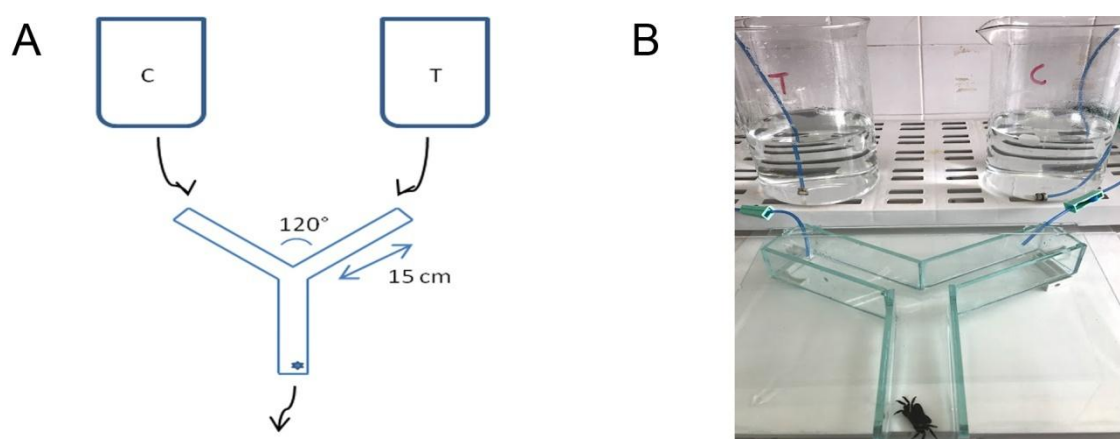
Fonte: A autora, 2023.



### 3.4 ENSAIOS DE INTERAÇÃO TRITRÓFICA

Os ensaios de interação tritrófica foram realizados no aquário de vidro em formato Y, o mesmo utilizado nos ensaios de sinalização química do capítulo 1 (15 cm de comprimento x 5 cm altura x 5 cm largura). O aquário foi conectado a dois béqueres, cada um contendo quatro litros de água do mar, com mangueiras plásticas para passagem do fluxo unidirecional (Figura 9 A). A velocidade do fluxo foi de  $18\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  mantido pela gravidade. Os caranguejos ( $n=10$ ) foram posicionados, um a um, na base do aquário Y, equidistantes e orientados para ambos os lados (Figura 9 B). Dois tipos de água do mar (controle ou tratamento) foram oferecidos simultaneamente aos caranguejos. Cada ensaio foi conduzido com um único espécime e monitorado por um período de 10 minutos (adaptado ZIMMER et al., 1999). Após cada teste o aquário era esvaziado, lavado sob água doce corrente e feito enxágue com água destilada.

Figura 9 – Estrutura para a realização dos ensaios de interação tritrófica.



Legenda: A. Esquema da estrutura com aquário Y conectado a dois estímulos químicos diferentes (controle e tratamento, cada um com 4L de água do mar), \* representa o caranguejo posicionado na base do aquário; B. Observação do comportamento de *P. transversus* em um dos ensaios de interação tritrófica.

Fonte: A autora, 2023.

Antes do início dos ensaios de interação tritrófica, a água do mar foi preparada para ser ofertada aos caranguejos. Para testar a hipótese proposta, foram realizados diferentes ensaios (1 a 4, ver abaixo). Em cada ensaio, para a sinalização da água, os organismos foram acondicionados nos béqueres, com volume total de quatro litros de água do mar, e mantidos com

aeração constante por um período de 1 hora (Figura 10 D) (ZIMMER-FAUST, 1993). Após este período, os organismos foram retirados do recipiente e somente a água do mar sinalizada foi imediatamente oferecida aos caranguejos em ensaios de dupla escolha (controle ou tratamento). Em caso de oferta do controle, a água do mar foi mantida sob as mesmas condições do tratamento, com exceção da presença dos organismos sinalizadores de odores.

#### *Ensaio 1 – Pista química do nudibrânquio*

O Ensaio 1 foi proposto para verificar se os caranguejos seriam atraídos em direção aos odores liberados pelos nudibrânquios. Em um dos lados do aquário em Y foi oferecida água sinalizada com a presença do nudibrânquio *C. rumia* (7-8 indivíduos) (Figura 10 A), condição esta considerada como tratamento. Do lado oposto foi oferecida água do mar sem sinalização (condição controle). Esperava-se que os caranguejos fossem capazes de reconhecer a sua presa, escolhendo o lado da água sinalizada com os nudibrânquios.

#### *Ensaio 2 – Pista química da esponja*

No Ensaio 2, o tratamento consistiu na oferta de água sinalizada com esponjas frescas da espécie *D. etheria* (4 indivíduos ~ 2g cada) (Figura 10 B) e água do mar sem sinalização (controle). Foi testado o reconhecimento do caranguejo em relação aos odores liberados pelas esponjas sem interferência de um evento de predação. A hipótese é que em estado natural as esponjas não emitam sinais químicos que atraiam os predadores de topo.

#### *Ensaio 3 – Pistas químicas dos nudibrânquios vs. esponjas*

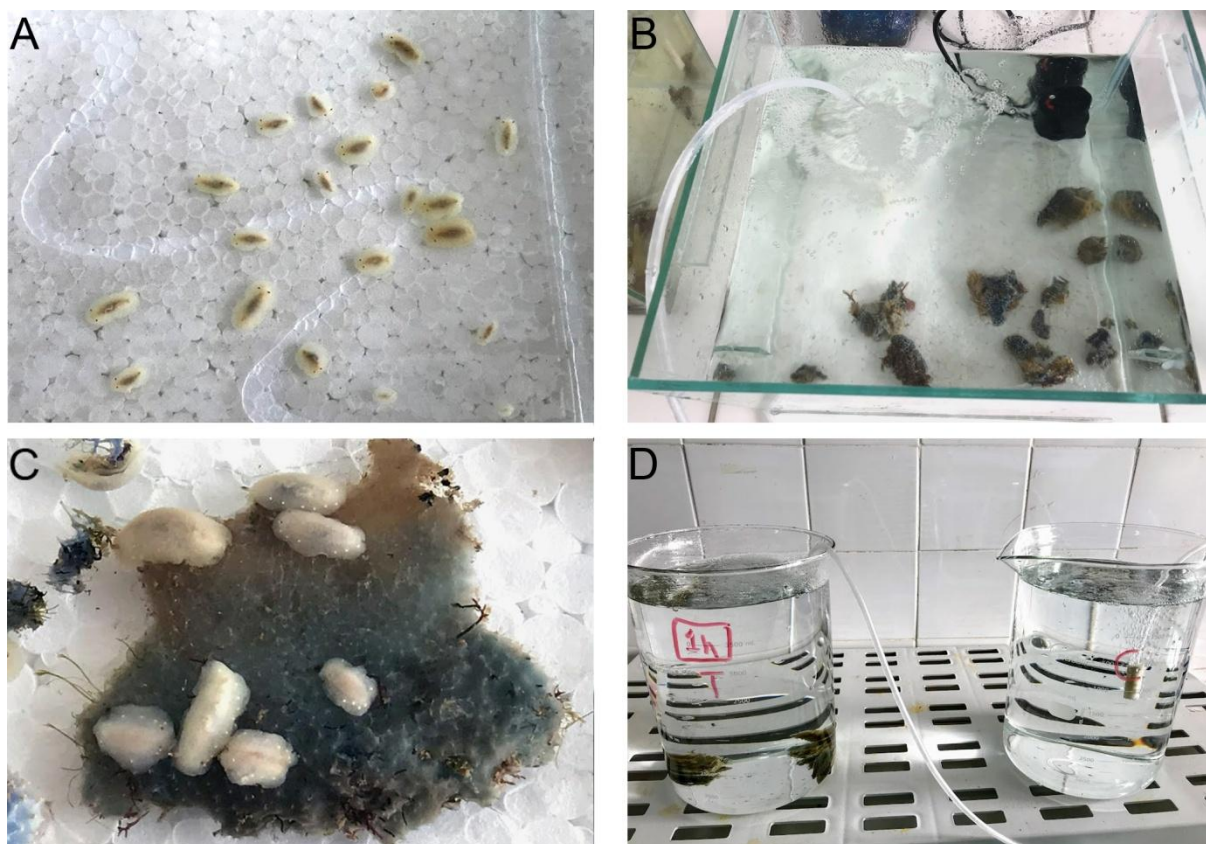
No Ensaio 3, foram oferecidas duas pistas químicas simultaneamente: uma com água sinalizada pela presença de nudibrânquios (6 indivíduos) e outra com esponjas frescas (4-5 indivíduos ~2g cada), a fim de verificar se o caranguejo tem capacidade de distinção entre os dois itens. A hipótese é que o caranguejo possui atração pelo odor emitido pelos nudibrânquios.

#### *Ensaio 4 – Pistas químicas do evento de predação vs. esponjas*

No Ensaio 4, foi avaliada a capacidade de reconhecimento do caranguejo por uma pista química indireta emitida pela esponja previamente predada por nudibrânquios (7 indivíduos) (Figura 10 C). Em um lado do aquário Y foi ofertada água sinalizada por nudibrânquios predando esponjas e, do outro lado, a água do mar sinalizada por esponjas frescas (4 indivíduos, ~2g cada). A hipótese é que o caranguejo se oriente em direção ao sinal químico emitido pela esponja durante o evento de predação.

Avaliou-se quais foram as respostas de escolha dos caranguejos em relação aos diferentes tratamentos oferecidos em cada ensaio e o tempo, em minutos, que os caranguejos levaram para realizar sua primeira escolha (T1). Neste caso, somente a primeira escolha dentro do período de 10 minutos foi computada. A hipótese é que os caranguejos se locomovem em direção à opção tratamento, levando menos tempo em comparação à locomoção para a opção controle.

Figura 10 - Tipos de tratamento utilizados nos ensaios de interação tritrófica.



Legenda: A. Nudibrânquios da espécie *Cadlina rumia* (indivíduos com aproximadamente 1,3 cm); B. esponjas frescas da espécie *Dysidea etheria*; C. esponjas sendo predadas pelos nudibrânquios utilizadas nos ensaios de reconhecimento de pista química indireta; D. água do mar 'tratamento' e controle, com volume total de 4 L, sinalizadas pelo período de 1h.

Fonte: A autora, 2023.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar as escolhas (tratamento vs. controle), em cada ensaio, foi utilizado o teste Qui-quadrado. As variáveis testadas foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

Em relação ao tempo para a escolha (T1), foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para testar a normalidade, e, diante do resultado de distribuição não-normal, para detectar diferenças significativas entre as médias de tempo (considerando  $p < 0,05$ ), utilizou-se o teste Mann-Whitney.

As análises estatísticas foram realizadas no *software* livre Jamovi (versão para desktop 2.3.21).

## 4 RESULTADOS

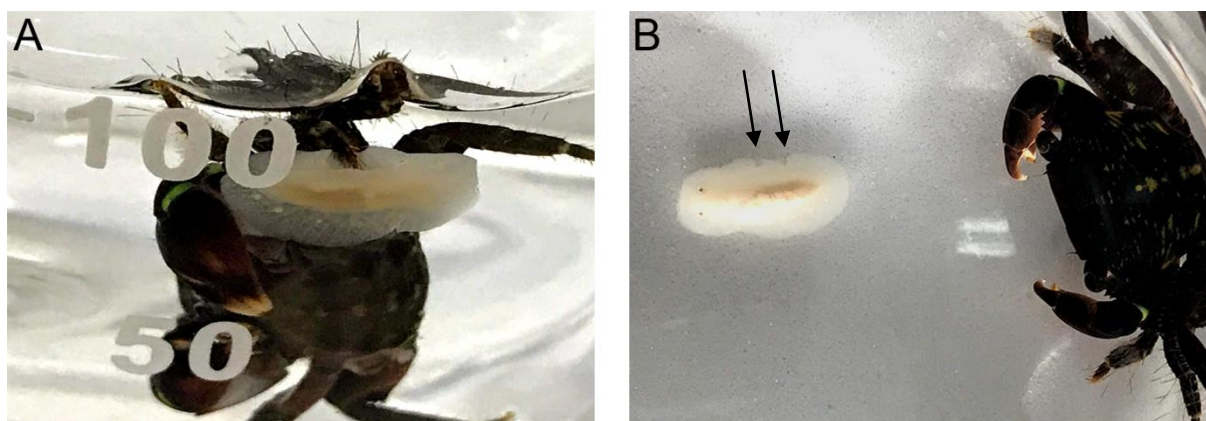
### 4.1 TESTE PILOTO SOBRE ESCOLHA DO PREDADOR-CARANGUEJO

Quando colocado em contato direto com os nudibrânquios, verificou-se que o caranguejo *P. transversus* manipula (Figura 11 A) e é capaz de causar algum dano ao corpo do nudibrânquio *C. rumia* após retirar pequenos fragmentos do dorso com suas quelas (Figura 11 B). Este comportamento foi observado nas cinco réplicas testadas (100%), caracterizando a existência de interação entre estas espécies.

No entanto, quando colocados em contato direto com a esponja *D. etheria*, esses crustáceos não exibiram comportamento atrativo e/ou investigativo em nenhuma das cinco réplicas testadas. Portanto, nenhuma interação entre estes dois grupos foi observada.

Após confirmar a interação direta entre indivíduos de nudibrânquios e caranguejos, os ensaios de interação tritrófica foram iniciados com a espécie escolhida *P. transversus*.

Figura 11 – Comportamento do caranguejo em relação ao nudibrânquio.



Legenda: A. Caranguejo (largura média da carapaça de 2,1 cm) segurando e manipulando o nudibrânquio (cerca de 1,0 cm); B. Detalhes das incisões no nudibrânquio causadas pelo caranguejo.

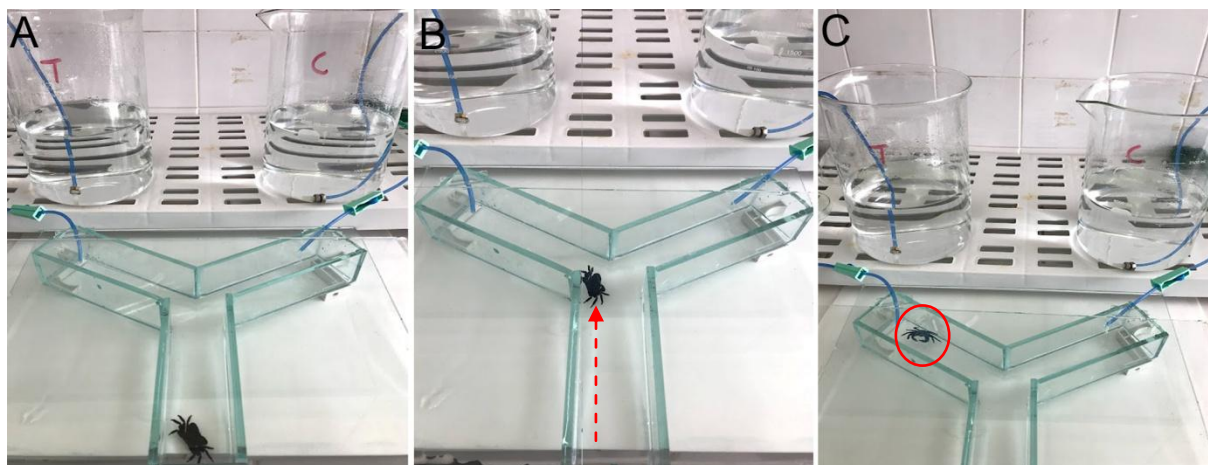
Fonte: A autora, 2023.

### 4.2 ENSAIOS DE INTERAÇÃO TRITRÓFICA

Em todos os quatro tipos de ensaios foi observado o comportamento

de escolha dos caranguejos, não havendo inatividade entre os indivíduos amostrados (Figura 12). Os resultados dos ensaios são apresentados na Figura 13.

Figura 12 – Deslocamento de *Pachygrapsus transversus* em um dos ensaios de interação tritrófica.



Legenda: A. início do experimento com caranguejo posicionado na base do aquário Y (15x5x5 cm - CxAxL); B. evolução do deslocamento do caranguejo (seta vermelha); C. escolha pela opção 'tratamento' (círculo vermelho). Tamanho médio dos caranguejos foi de 2,1 cm.

Fonte: A autora, 2023.

No Ensaio 1, sobre a capacidade de reconhecimento do odor liberado pelos nudibrânquios, o teste qui-quadrado não mostrou resultado estatisticamente significativo (qui-quadrado:  $p= 0,206$ ;  $n= 10$ ) em relação à escolha. Foi observado que 70% dos caranguejos se locomoveram em direção à água sinalizada com a presença dos nudibrânquios (tratamento) (Figura 13 A).

No Ensaio 2, foi verificado que os caranguejos não reconheceram os odores diretamente liberados pela esponja *D. etheria* (qui-quadrado:  $p= 0,527$ ;  $n= 10$ ). Neste ensaio, 40% dos caranguejos se locomoveram em direção ao tratamento (Figura 13 B).

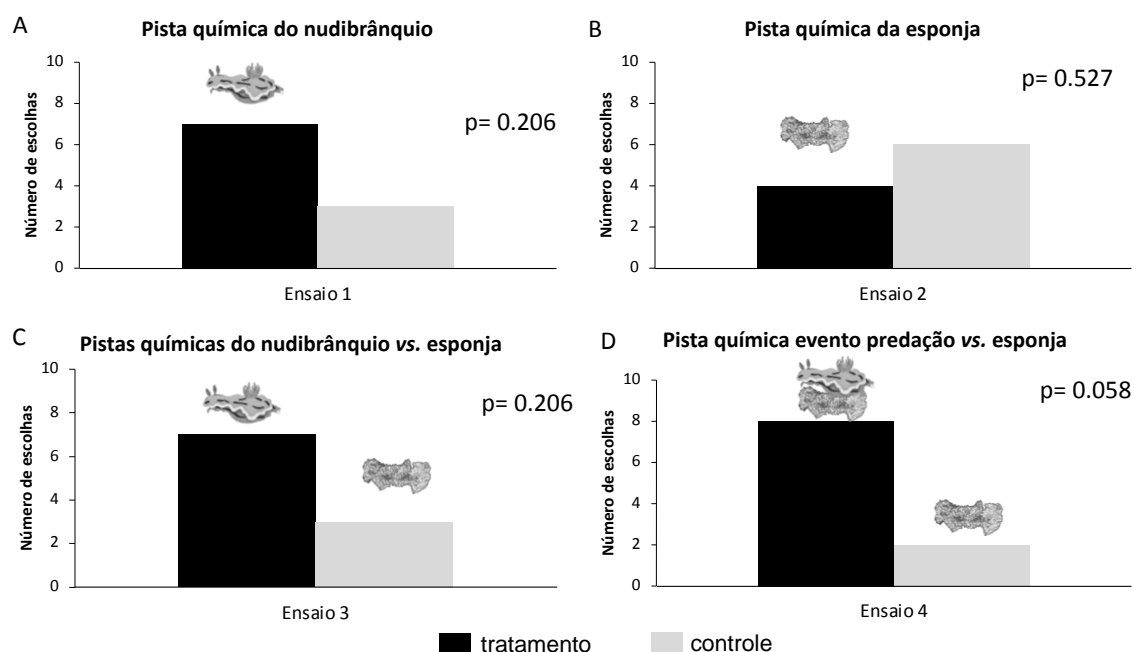
No Ensaio 3, foi avaliada a capacidade de diferenciação e escolha entre os odores liberados pelas esponjas e nudibrânquios. Uma proporção de 70% dos caranguejos foi direcionada à água sinalizada pelos nudibrânquios (tratamento), essa escolha não teve significância estatística (qui-quadrado:  $p= 0,206$ ;  $n= 10$ ; Figura 13 C).

No Ensaio 4, foi avaliada a capacidade do caranguejo em reconhecer

sua presa-nudibrânquio através de pistas químicas indiretas. Neste caso, 80% dos caranguejos se locomoveram em direção à água sinalizada com esponjas predadas pelos nudibrânquios (tratamento) (Figura 13 D). O valor marginal do teste do qui-quadrado mostra uma tendência de escolha pela água sinalizada com a esponja no evento de predação (qui-quadrado:  $p=0,058$ ;  $n=10$ ).

O teste de Mann-Whitney mostrou que os tempos que os caranguejos levaram para fazer suas escolhas entre controle ou tratamento, nos quatro ensaios, foram semelhantes (Figura 14). Os caranguejos levaram, em geral, entre dois a quatro minutos para realizar a primeira escolha.

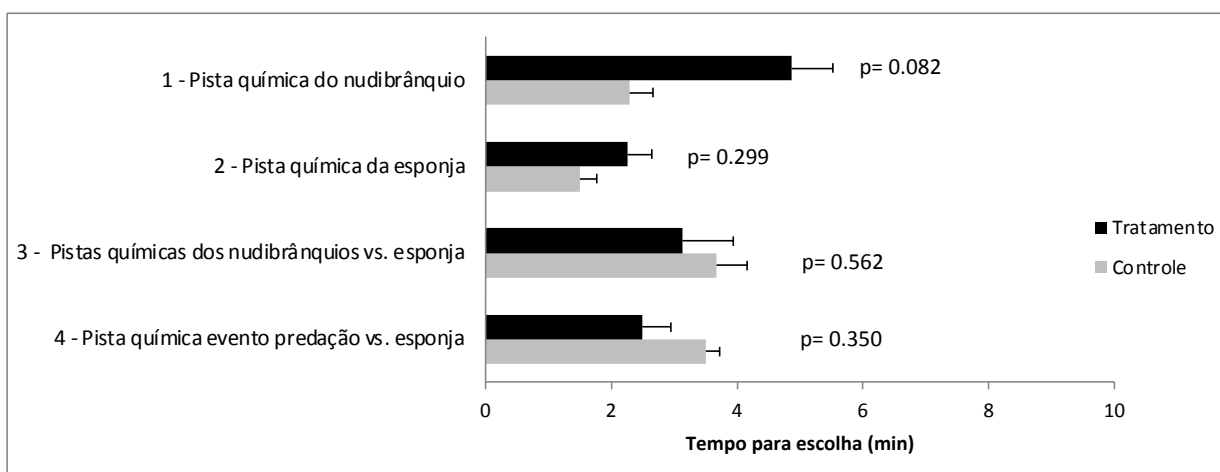
Figura 13 – Comportamento de quimiotaxia do caranguejo *Pachygrapsus transversus*.



Legenda: Número de escolhas dos espécimes de *P. transversus* observado nos ensaios de fluxo conduzidos em aquário do tipo Y-maze. A. Ensaio 1 – nudibrânquios (tratamento) x água do mar (controle); B. Ensaio 2 – esponjas (tratamento) x água do mar (controle); C. Ensaio 3 – nudibrânquios (tratamento) x esponjas (controle); D. Ensaio 4 – nudibrânquios predando esponjas (tratamento) x esponjas (controle).

Fonte: A autora, 2023.

Figura 14 - Tempo médio (min) para os indivíduos de *Pachygrapsus transversus* realizarem a escolha nos ensaios de quimiotaxia.



Legenda: Tempo médio gasto pelo caranguejo *P. transversus* para realizar sua escolha nos ensaios de fluxo conduzidos em aquário do tipo Y-maze. 1. Pista química do nudibrânquio: nudibrânquios (tratamento) x água do mar (controle); 2. Pista química da esponja: esponjas (tratamento) x água do mar (controle); 3. pista química do nudibrânquio vs. esponja – nudibrânquios (tratamento) x esponjas (controle); 4. pista química evento predação vs. esponja – nudibrânquios predando esponjas (tratamento) x esponjas (controle). As barras correspondem ao erro padrão. Foram utilizadas 10 réplicas em cada ensaio.

Fonte: A autora, 2023.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE METODOLÓGICA SOBRE A ESCOLHA DO PREDADOR

Sob condições laboratoriais, a espécie de caranguejo braquiúro *P. transversus* interagiu diretamente com o nudibrânquio doridáceo *C. rumia*. O caranguejo promoveu danos e remoção de biomassa de pequenos fragmentos do manto dorsal dos nudibrânquios que foram levados até a boca destes crustáceos. Apesar do nudibrânquio *C. rumia* e o caranguejo *P. transversus* coexistirem na região de poça de maré em Cabo Frio, não existem registros específicos na literatura científica sobre a interação entre estas duas espécies. A abundância deste predador na área de ocorrência dos nudibrânquios e a manipulação confirmada em laboratório sugerem que a espécie *P. transversus* poderia exercer uma pressão de predação sobre o nudibrânquio *C. rumia*. Adicionalmente, a interação presa-predador



envolvendo nudibrânquios e caranguejos braquiúros de outras espécies já foi relatada em alguns trabalhos (e. g. GOCHFELD & AEBY, 1997; PENNEY, 2004; ANKER & IVANOV, 2020; MAYHEW, 2022).

Penney (2004) avaliou, em laboratório, o consumo de cinco diferentes predadores generalistas sobre o nudibrânquio doridáceo *Cadlina luteomarginata* e observou que os ataques causados por caranguejos braquiúros ao nudibrânquio causaram menos mortalidade do que os ataques advindos dos outros tipos de predadores. Embora os caranguejos tenham cortado ou perfurado o manto dos nudibrânquios com suas quelas, nenhum nudibrânquio morreu após os ataques (PENNEY, 2004). Mayhew (2022) observou que caranguejos braquiúros também manipulam em laboratório, com suas quelas, as desovas do nudibrânquio doridáceo *Onchidoris bilamellata*, embora a predação não tenha sido confirmada.

No presente estudo, o nudibrânquio *C. rumia* não foi totalmente consumido pelo caranguejo *P. transversus*, conforme observações de estudos prévios (PENNEY, 2004; MAYHEW, 2022). Porém, as injúrias causadas pelo caranguejo têm um custo para a sobrevivência dos nudibrânquios e podem conduzir a um comportamento por parte dos moluscos de interrupção de forrageamento e fuga de predador (BOURDEAU & PADILLA, 2019). Estudos sobre interações mediadas por traços indiretos, como as cascatas tritóficas, demonstram que os predadores geralmente exercem efeitos subletais no comportamento, morfologia ou fisiologia das presas (Abrams 1995; Peacor & Werner 1997 *apud* GRAVEM & MORGAN, 2016).

Recentemente, Anker e Ivanov (2020) descreveram a predação *in situ* de um caranguejo braquiúro da espécie *Lambrachaeus ramifer* Alcock, 1895 sobre o nudibrânquio doridáceo *Mexichromis mariei* (Crosse, 1872). Foi observado que o caranguejo segurava firmemente sua presa com uma das garras enquanto com a outra passava pequenos pedaços do corpo do nudibrânquio até sua boca. Ainda que não tenha sido observado o consumo inteiro do indivíduo, os autores avaliaram que provavelmente o nudibrânquio não tenha sobrevivido devido ao grau substancial de danos aparentes (ANKER & IVANOV, 2020). Comportamento semelhante, claro de manipulação (Figura 10 A) e injúrias (Figura 10 B), também foi observado no presente trabalho.

Embora os nudibrânquios apresentem uma ampla variedade de defesas químicas (CIMINO & GHISELIN, 2009), os registros de predação são observados no habitat natural (e.g. ROGERS et al., 2000; MEGINA & CERVERA, 2003; NAKANO & HIROSE, 2011; VALDÉS et al., 2013; ANKER & IVANOV, 2020), ainda que algumas espécies de predadores não logrem êxito em todas as tentativas (van der MEIJ & REIJNEN, 2012; HAYES & SCHULTZ, 2021).

A predação é uma relação ecológica interespecífica desarmônica onde a energia é transferida entre dois organismos baseada no comportamento de captura e morte da presa antes do consumo pelo predador (FATH, 2018). Os predadores afetam diretamente suas presas quando as consomem, perseguem ou intimidam, sendo que a maneira mais direta que um predador pode interagir com sua presa é consumindo-a (HOLLOWELL, 2013). Quando o predador cria injúrias nas presas, ou as consomem parcialmente, é considerado uma predação subletal. Tais injúrias ou perda de biomassa podem influenciar o comportamento, crescimento, reprodução e a sobrevivência da presa (LINDSAY, 2023). Alguns invertebrados marinhos são capazes de regenerar seus tecidos decorrentes de injúrias, porém, a regeneração pode gerar um custo ao próprio indivíduo além de impactar suas populações e comunidades (LINDSAY, 2010).

Bourdeau e Padilla (2019) observaram que o gastrópode *Nucella lamellosa* (Gmelin, 1791) quando exposto às pistas químicas emitidas por caranguejos predadores (como o braquiúro *Cancer productus* Randall, 1840) e não-predadores, apresentaram uma redução da massa visceral decorrente da redução da sua atividade de alimentação. Já a presença do predador específico, além de afetar o comportamento do animal, promove o espessamento da abertura da concha do gastrópode, uma resposta associada diretamente ao valor adaptativo, pois a mudança morfofisiológica diminui as chances de sucesso do evento de predação (BOURDEAU & PADILLA, 2019).

*Pachygrapsus transversus* é provavelmente a espécie de caranguejo braquiúro mais comum ocorrendo em regiões costeiras do sudeste do Brasil (FLORES & NEGREIROS-FRANSOZO, 1999), apresentando dieta onívora, ora seletiva ou oportunista (CHRISTOFOLETTI et al., 2010). Embora *P.*

*transversus* seja considerado um predador generalista, é plausível supor sua ação de predação sobre *C. rumia*. Ainda que, no presente estudo, os caranguejos não mataram e consumiram o nudibrânquio inteiramente, seu contato direto (ou liberação de pista química, ver capítulo 1) e sua manipulação em laboratório podem ser considerados uma ameaça predatória à vida dos nudibrânquios.

## 5.2 ENSAIOS DE INTERAÇÃO TRITRÓFICA

Este estudo apresenta os resultados dos primeiros ensaios laboratoriais sobre interações tritróficas envolvendo espécies de nudibrânquios, esponjas e caranguejos. Por não possuir precedentes e serem extremamente raros na literatura, os ensaios de interação tritrófica com nudibrânquios foram adaptados aos métodos existentes na literatura aplicados a outros grupos.

Pesquisas sobre interações tritróficas marinhas frequentemente avaliam as relações entre espécies de macroalgas-herbívoros e estes a predadores naturais (ABDALA-ROBERTS et al., 2019). Um exemplo é a relação tritrófica observada entre a macroalga *Ascophyllum nodosum*, o herbívoro gastrópode *Littorina obtusata* e o caranguejo braquiúro *Carcinus maenas*, onde foi confirmado, pela primeira vez, que os odores emitidos pelas macroalgas previamente consumidas pelos herbívoros podem modificar o comportamento dos predadores (COLEMAN et al., 2007). Também foi observada, em uma poça de maré, a interação tritrófica entre o gastrópode herbívoro *Tegula funebris* (A. Adams, 1855) que, na presença da estrela-do-mar *Leptasterias* sp., reduziu sua atividade de herbivoria sobre macroalgas e levou a sua fuga da poça de maré (GRAVEM & MORGAN, 2016).

De maneira geral, os moluscos heterobrânquios, popularmente conhecidos como lesmas-marinhas, são amplamente citados na literatura como predadores ao invés de presas (MEHROTRA et al., 2019), principalmente devido ao seu potencial químico defensivo (CIMINO & GHISELIN, 2009). Porém, um número crescente de eventos em que os heterobrânquios são observados como ‘presas’, vem sendo registrados (MEHROTRA et al., 2019).

A relação presa-predador envolvendo o consumo da esponja *D. etheria* pelo nudibrânquio doridáceo *C. rumia* já era conhecida na literatura (BELMONTE et al., 2015). Neste trabalho, buscou-se compreender como essa relação afeta outros consumidores da teia trófica, mais especificamente, se pode afetar o comportamento de um dos possíveis predadores do nudibrânquio, o caranguejo *P. transversus*.

No Ensaio 1, embora 70% dos espécimes de *P. transversus* tenham migrado para a sinal químico emitido pelo o nudibrânquio *C. rumia*, este resultado não foi estatisticamente significativo. Portanto, a hipótese que *P. transversus* iria se locomover em direção à água sinalizada com a presença do nudibrânquio foi rejeitada. Segundo Coleman et al (2007), a evidência de um dano alimentar recente do gastrópode *L. obtusata* sobre a macroalga parece ser uma pista química mais confiável e, possivelmente, mais detectável para o caranguejo *C. maenas* do que a própria presa. As pistas químicas derivadas de macroalgas 'lesionadas' se dispersam por maiores distâncias e são mais persistentes na água do mar, do que pistas químicas emitidas pela presa (gastrópode). Assim, os caranguejos parecem ter sido selecionados para utilizar este tipo de pista química indireta durante o seu forrageamento (COLEMAN et al. 2007). Comportamento similar pode justificar os resultados obtidos para a relação de *P. transversus* e *C. rumia*.

No Ensaio 2, quando oferecida a água sinalizada pela esponja *D. etheria*, o caranguejo *P. transversus* não foi capaz de reconhecer o sinal químico emitido pela esponja em estado natural. Esse resultado corrobora a nossa hipótese de que as esponjas não são o alvo para o consumo do caranguejo, portanto estas não são interpretadas como presas. Dessa forma, o desinteresse por predação a esponja viabiliza a hipótese de interação tritrófica entre estes organismos. Seria vantajoso para a esponja (emissor) e caranguejo (receptor) coevoluírem em uma interação benéfica para ambos. Ao atrair o caranguejo, a esponja reduziria os seus próprios riscos de predação, uma vez que o nudibrânquio seria o alvo do caranguejo.

No Ensaio 3, mais uma vez, 70% dos espécimes de *P. transversus* migraram em direção ao sinal químico de *C. rumia*. No entanto, esse resultado não teve significância estatística, indicando que o caranguejo não é capaz de distinguir entre os sinais químicos do nudibrânquio e a esponja *D.*

*etheria*. Os resultados sugerem que os caranguejos não encontram sinais confiáveis de reconhecimento tanto em relação aos nudibrânquios quanto em relação as esponjas.

Já no Ensaio 4, quando se testou a possibilidade de *P. transversus* reconhecer sua presa-nudibrânquio através de pistas químicas indiretas emitidas pela esponja predada, houve uma tendência de comportamento de atração do caranguejo, visto que oito dentre dez indivíduos (Teste Qui-quadrado  $p=0.058$ ) se deslocaram em direção ao odor emitido pelas esponjas durante o evento de predação. Assim como exposto por Coleman e colaboradores (2007), presas lesionadas podem sinalizar com maior confiabilidade e determinar o comportamento de forrageamento dos predadores. A presença do caranguejo pode trazer benefícios às esponjas, diminuindo a pressão de predação que os nudibrânquios exercem sobre elas. Um tipo de relação semelhante foi descrito com algumas espécies de caranguejos braquiúros sendo atraídos para o coral *Porites compressa* Dana, 1846 para predar o nudibrânquio cladobrânquio *Phestilla sibogae* (que se alimenta exclusivamente do coral). A presença dos caranguejos reduz os níveis de predação do nudibrânquio sobre os corais *P. compressa* tanto em experimentos em laboratório, como no habitat natural (GOCHFELD & AEBY, 1997). A predação dos nudibrânquios sobre as esponjas poderia ser interpretada da mesma forma, um sinal confiável de fonte de alimento para o caranguejo.

De maneira geral, o tempo médio que o caranguejo braquiúro *P. transversus* levou para fazer suas escolhas, entre as diferentes pistas químicas de nudibrânquios e esponjas, variou entre dois e quatro minutos, dentro do período concedido de 10 minutos. Resultados similares foram observados em relação ao tempo de escolha do caranguejo braquiúro *Cancer irroratus* Say, 1817 em ensaios de forrageamento (ZHOU e REBACH, 1999). Quando ofertada a pista química de indivíduos vivos do mexilhão *Geukensia demissa* (Dillwyn, 1817), o caranguejo levou, em média, 2,15 a 3,17 minutos para se locomover em direção à fonte emissora do odor em ensaios com 60 minutos de duração (ZHOU & REBACH, 1999). Estes resultados atestam que os caranguejos braquiúros exibem um comportamento claro e decidido em resposta à busca alimentar (ZIMMER-FAUST, 1989).

Sabe-se que os crustáceos utilizam a quimiopercepção durante o forrageamento (HAY, 2011), porém, a maneira como este comportamento ocorre parece não seguir um padrão fixo. Zhou e Rebach (1999) sugerem que na ausência de algum odor químico específico, o comportamento de orientação/navegação parece ser “mover-se na direção contra o fluxo de água, investigar se existem odores presentes, e, em seguida, alternar para um padrão de busca”. Neste trabalho, os caranguejos apresentaram um comportamento claro de locomoção em direção aos estímulos apresentados e nenhuma réplica foi descartada por inatividade. Estes resultados reforçam a habilidade de quimiopercepção do caranguejo *P. transversus*.

Ressalta-se que o teste do qui-quadrado, embora seja uma ferramenta valiosa para a análise de associação entre variáveis categóricas, assim como qualquer outro teste estatístico, tem limitações. Dentre elas, sabe-se que o teste é bastante sensível ao tamanho da amostra. Com amostras pequenas, o teste pode não ter poder estatístico suficiente para detectar associações reais. Assim, seria desejável que o número de réplicas utilizadas nos ensaios de tritrofia fosse maior, similar ao proposto no Capítulo 1. No entanto, as imposições geradas pela pandemia de COVID-19, limitaram a execução de ensaios mais robustos.

A quimiopercepção do nudibrânquio *C. rumia* em relação a presença do caranguejo *P. transversus* (ver Capítulo 1) corrobora a hipótese de ameaça de um predador, podendo induzir alterações na dinâmica de forrageamento dos nudibrânquios e promover um comportamento de evitação com consequências fisiológicas, como a redução de massa corpórea já verificada em outros gastrópodes (BOURDEAU & PADILLA, 2019). Por outro lado, a sugestão do reconhecimento de pistas químicas indiretas, advindas do evento de predação dos nudibrânquios sobre as esponjas, indicam uma vantagem ao caranguejo para localizar o nudibrânquio e a própria esponja, que tem a pressão de predação diminuída. Considerando que os organismos envolvidos ocorrem em poça de marés e, portanto, podem passar longos períodos confinados em um pequeno espaço físico, as alterações comportamentais devido a quimiopercepção presa-predador certamente são de grande importância na dinâmica de populações de *C. rumia* e *D. etheria* e nos processos adaptativos e contraadaptativos das espécies envolvidas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo elucidar interações ecológicas envolvendo os nudibrânquios, suas presas e seus predadores. Utilizou-se a espécie de nudibrânquio *Cadlina rumia* como modelo devido ao conhecimento prévio da sua relação trófica com *D. etheria* (Belmonte et al., 2015), sua frequência regular e abundância na área de estudo, além da experiência prévia em manter tais organismos em condições laboratoriais, que permitiram a execução dos diversos ensaios propostos na tese.

Os resultados comprovam a capacidade dos nudibrânquios em reconhecer diferentes tipos de odores transmitidos pela água do mar, sem a necessidade de contato direto ou orientação visual. Tal habilidade é de grande importância em diversos tipos de interações ecológicas, pois tratam de animais com baixa acuidade visual que lidam com a percepção quimiosensorial no meio aquático utilizando os rinóforos. Estas estruturas são fundamentais na capacidade de orientação e habilidade de navegação dos nudibrânquios.

Os nudibrânquios foram capazes de reconhecer suas presas e seus coespecíficos. Estes comportamentos, mediados por sinalização química, no ambiente natural podem trazer vantagens ecológicas. Através do reconhecimento de sua presa, a esponja *D. etheria*, o nudibrânquio pode minimizar o tempo de forrageamento. O reconhecimento de coespecíficos favorece o encontro de parceiros sexuais para reprodução; o encontro de áreas propícias com abundância de alimento e para a deposição dos ovos; o assentamento e metamorfose das larvas próximas ou sobre o alimento preferido, entre outros.

Assim, estes pequenos gastrópodes possuem um arsenal de defesas químicas conhecidas e habilidades de quimiopercepção acuradas, que os permitem interagir com os outros organismos de maneira bastante ajustada no ambiente marinho. Porém, a engrenagem da evolução também direciona às contra-adaptações no ambiente. Neste contexto, a busca pela identificação dos predadores naturais e possíveis interações multitróficas são áreas a serem exploradas nos estudos de ecologia de nudibrânquios.

Os resultados aqui apresentados buscaram comprovar a interação

entre o predador de topo, *Pachygrapsus transversus*, provavelmente a espécie de caranguejo braquiúro mais comum e abundante na área de ocorrência do nudibrânquio *C. rumia*, alvo deste estudo, e sua presa específica, a esponja *D. etheria*. Embora não conclusivos, os resultados apresentados sinalizam uma possível interação tritrófica entre as espécies citadas, uma vez que os sinais químicos das esponjas sendo predadas pelo nudibrânquio mostraram uma tendência a serem reconhecidos pelo caranguejo.

Conclui-se que *Cadlina rumia* reconhece diferentes pistas químicas, sendo uma importante resposta comportamental para suas interações ecológicas no ambiente natural. Diante dos raros registros de predação sobre nudibrânquios, os resultados de interação tritrófica fortemente encorajam que novos estudos sejam realizados sobre a temática a fim de avaliar os possíveis efeitos no comportamento das espécies de nudibrânquios e o entendimento de suas populações.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA-ROBERTS, L.; PUENTES, A.; FINKE, D. L.; MARQUIS, R. J.; MONTSERRAT, M.; POELMAN, E. H.; RASMANN, S.; SENTIS, A.; VAN DAM, N. M.; WIMP, G.; MOONEY, K.; BJÖRKMAN, C. Tri-trophic interactions: bridging species, communities and ecosystems. **Ecology Letters**, v. 22, p. 2151-2167, 2019.

ABDELRAHMAN, S. M.; PATIN, N. V.; HANORAS, A.; ABOSEIDAH, A.; DESOKY, S.; DESOKY, S. G.; STEWART, F. J.; LOPANIK, N. B. The natural product biosynthetic potential of Red Sea nudibranch microbiomes. **PeerJ**, v. 9: e10525, 2021.

AKTIPIS, S. H.; GIRIBET, G.; LINDBERG, D. R.; PONDER, W. F. Gastropod Phylogeny: an Overview and Analysis. In: PONDER, W. F.; LINDBERG, D. R. (Ed.). **Phylogeny and Evolution of the Mollusca**. Berkeley: University of California Press, 2008. p. 199–236.

ALVIM, J.; PADULA, V.; PIMENTA, A. D. First record of the genus *Onchidoris* (Gastropoda: Nudibranchia: Onchidorididae) from the South Atlantic Ocean, with the description of a new species from Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 91, p. 505-511, 2011.

ALVIM, J.; PIMENTA, A. D. Taxonomic review of the family Discodorididae (Mollusca: Gastropoda: Nudibranchia) from Brazil, with descriptions of two new species. **Zootaxa**, v. 3745, n. 2, p. 152-198, 2013.

ANKER, A.; IVANOV, Y. First record of the predation upon sea slugs (Cephalaspidea and Nudibranchia) by the peculiar elbow crab *Lambrachaeus ramifer* Alcock, 1895 (Decapoda: Parthenopidae). **Marine Biodiversity**, v. 50, n. 24, p. 1-6, 2020.

ARANGO, C. P.; BRODIE, G. Observations of predation on the tropical nudibranch *Okenia* sp. by the sea spider *Anoplodactylus longiceps* Williams (Arthropoda: Pycnogonida). **The Veliger**, v. 46, n. 1, p. 99-101, 2003.

ÁVILA, C. A preliminary catalogue of natural substances of opisthobranch molluscs from western Mediterranean and near Atlantic. **Scientia Marina**, v. 56, n. 4, p. 373-382, 1992.

ÁVILA, C. Natural products of opisthobranch molluscs: a biological review. **Oceanography and Marine Biology**, v. 33, p. 487-559, 1995.

ÁVILA, C.; PAUL, V. J. Chemical ecology of the nudibranch *Glossodoris pallida*: is the location of diet-derived metabolites important for defense? **Marine Ecology Progress Series**, v. 150, p. 171-180, 1997.

BEHRENS, D. W. **Nudibranch Behaviour**. Jacksonville: New Publications, 2005. 176p.

- BELL, J. E.; WILLIAMSON, J. E. Positive indirect interactions in marine herbivores and algae. In: SHIELDS, V. D. C. (Ed.). **Herbivores**. London: IntechOpen Limited, 2017. p. 135-153.
- BELMONTE, T. **Comportamento alimentar de nudibrânquios no litoral do Rio de Janeiro (Gastropoda, Nudibranchia, Doridacea)**. 2014. 146p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- BELMONTE, T.; ALVIM, J.; PADULA, V.; MURICY, G. Spongivory by nudibranchs on the coast of Rio de Janeiro state, southeastern Brazil. **Spixiana**, v. 38, n. 2, p. 187-195.
- BIERMANN, C. H.; SCHINNER, G. O.; STRATHMANN, R. R. Influence of solar radiation, microalgal fouling, and current on deposition site and survival of embryos of a dorid nudibranch gastropod. **Marine Ecology Progress Series**, v. 86, p. 205-215, 1992.
- BÖHRINGER, N.; FISCH, K. M.; SCHILLO, D.; BARA, R.; HERTZER, C.; GREIN, F.; EISENBARTH, J.-H.; KALIGIS, F.; SCHNEIDER, T.; WÄGELE, H.; KÖNIG, G. M.; SCHÄBERLE, T. F. Antimicrobial potential of bacteria associated with marine sea slugs from north Sulawesi, Indonesia. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n.1092, 2017.
- BORNANCIN, L.; BONNARD, I.; MILLS, S. C.; BANAIGS, B. Chemical mediation as a structuring element in marine gastropod predator-prey interactions. **Natural Product Reports**, v. 34, p. 644-676, 2017.
- BOUCHET, P.; ROCROI, J.-P.; HAUSDORF, B.; KAIM, A.; KANO, Y.; NÜTZEL, A.; PARKHAEV, P.; SCHRÖDL, M.; STRONG, E. E. Revised classification, nomenclator and typification of gastropod and monoplacophoran families. **Malacologia**, v. 61, n. 1-2, p. 1-526, 2017.
- BOURDEAU, P. E.; PADILLA, D. K. Cue specificity of predator-induced phenotype in a marine snail: is a crab just a crab? **Marine Biology**, v. 166, n. 84, 2019.
- BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados**. 3 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 1252p.
- CARBONE, M.; IRACE, C.; COSTAGLIOLA, F.; CASTELLUCCIO, F.; VILLANI, G.; CALADO, G.; PADULA, V.; CIMINO, G.; CERVERA, J. L.; SANTAMARIA, R.; GAVAGNIN, M. A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch *Tambja ceutae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 2668-2670, 2010.
- CHENEY, K. L.; WHITE, A. MUDIANTA, I. W.; WINTERS, A. E.; QUEZADA, M.; CAPON, R. J.; MOLLO, E.; GARSON, M. J. Choose your weaponry: selective storage of a single toxic compound, Latrunculin A, by closely related nudibranch molluscs. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, e0145134, 2016.

CHRISTOFOLETTI, R. A.; MURAKAMI, V. A.; OLIVEIRA, D. N.; BARRETO, R. E.; FLORES, A. A. V. Foraging by the omnivorous crab *Pachygrapsus transversus* affects the structure of assemblages on sub-tropical rocky shores. **Marine Ecology Progress Series**, v. 420, p. 125-134, 2010.

CIMINO, G.; GHISELIN, M. T. Chemical defence and evolutionary trends in biosynthetic capacity among dorid nudibranchs (Mollusca: Gastropoda: Opisthobranchia). **Chemoecology**, v. 9, p. 187-207, 1999.

CIMINO, G.; GHISELIN, M. T. Chemical defense and the evolution of opisthobranch gastropods. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 60, n. 10, p. 175-422, 2009.

CIMINO, G.; SODANO, G. Biosynthesis of secondary metabolites in marine molluscs. **Topics in Current Chemistry**, v. 167, p. 77-115, 1993.

CIMINO, G.; SODANO, G. Transfer of sponge secondary metabolites to predators. In: VAN SOEST, R. W. M.; VAN KEMPEN, T. M. G.; BRAEKMAN, J. C. (Ed.). **Sponges in Time and Space: Biology, Chemistry, Paleontology**. Rotterdam: A.A. Balkema, 1994. p. 459-472.

COLEMAN, R. A.; RAMCHUNDER, S. J.; DAVIES, K. M.; MOODY, A. J.; FOGGO, A. Herbivore-induced infochemicals influence foraging behaviour in two intertidal predators. **Oecologia**, v. 151, p. 454-463, 2007.

DACOSTA, S.; PADULA, V.; SCHRÖDL, M. A new species of *Hypselodoris* and a redescription of *Hypselodoris picta lajensis* (Nudibranchia: Chromodorididae) from Brazil. **The Veliger**, v. 51, n.1, p. 15-25, 2010.

DEAN, L. J.; PRINSEP, M. R. The chemistry and chemical ecology of nudibranchs. **Natural Product Reports**, v. 34, p. 1359-1390, 2017.

DELGADO, M.; FREIRE, F. A. M.; MEIRELLES, C. A. O.; D'OLIVEIRA, R. G.; PADULA, V.; BAHIA, J.; BRANDÃO, S. N. Sea slugs (Gastropoda: Heterobranchia) from Rio Grande do Norte, northeastern Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, v. 62, p. e202262063, 2022.

DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 3, p. 167-175, 2010.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? **Functional Ecology**, v. 2, n. 2, p. 131 – 139, 1988.

DO, T. D.; JUNG, D-W.; KIM, C-B. Molecular phylogeny of selected dorid nudibranchs based on complete mitochondrial genome. **Nature Scientific Reports**, v. 12, 18797, 2022.

- DOLECAL, R. E.; LONG, J. D. Chemically mediated foraging by subtidal marine predators: a field test of tritrophic cues. **Marine Ecology Progress Series**, v. 498, p. 161-171, 2014.
- DOMINGUÉZ, M.; GARCÍA, F. J.; TRONCOSO, J. Some aspects of the family Chromodorididae (Opisthobranchia: Nudibranchia) from Brazil, with description of a new species. **Scientia Marina**, v. 70, n. 4, p. 621-634, 2006.
- FATH, B. D. **Encyclopedia of Ecology**. Elsevier, 2018. 2780p.
- FAULKNER, D. J.; GHISELIN, M. T. Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods. **Marine Ecology Progress Series**, v. 13, p. 295-301, 1983.
- FLORES, A. A. V.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. On the population biology of the mottled shore crab *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850) (Brachyura, Grapsidae) in a subtropical area. **Bulletin of Marine Science**, v. 65, n. 1, p. 59-73, 1999.
- GARCÍA, F. J.; ÁLVAREZ, M. D.; TRONCOSO, J. S. **Opistobrânquios de Brasil**. 2008. 215p.
- GARCÍA, F. J.; TRONCOSO, J. S. Two unknown species of Mollusca Gastropoda from the archipelago Fernando de Noronha (Brazil), with description of a new species belonging to the genus *Phidiana* Gray, 1850 and a new record of *Dendrodoris senegalensis* Bouchet, 1975. **Scientia Marina**, v. 67, n. 2, p. 159-166, 2003.
- GALVÃO FILHO, H. C.; ARAÚJO, A. K.; SILVA, F. V.; AZEVEDO, V. M. S.; MEIRELLES, C. A. O.; MATTHEWS-CASCON, H. Sea slugs (Gastropoda: Heterobranchia) from a poorly known area in North-east Brazil: filling gaps in Atlantic distributions. **Marine Biodiversity Records**, v. 8, p. e115, 2015.
- GÖBBELER, K.; KLUSSMANN-KOLB, A. A comparative ultrastructural investigation of the cephalic sensory organs in Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda). **Tissue and Cell**, v. 39, p. 399-414, 2007.
- GOCHFELD, D. J.; AEBY, G. S. Control of populations of the coral-feeding nudibranch *Phestilla sibogae* by fish and crustacean predators. **Marine Biology**, v. 130, p. 63-69, 1997.
- GRANATO, A. C.; BERLINCK, R. G. S.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER, A. B.; FERREIRA, A. G.; DE SANCTIS, B.; DE FREITAS, J. C.; HAJDU, E.; MIGOTTO, A. E. Produtos naturais das esponjas marinhas *Aaptos* spp., *Hymeniacidon* aff. *heliophila*, e do nudibrânquio *Doris* aff. *verrucosa*. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 594-599, 2000.
- GRANATO, A. C.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; SELEGHIM, M. H. R.; BERLINCK, R. G. S.; MACEDO, M. L.; FERREIRA, A. G.; ROCHA, R. M.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.

Produtos naturais da ascídia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja elioara*, da costa do Brasil. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 192-198, 2005.

GRAVEM, S. A.; MORGAN, S. G. Prey state alters trait-mediated indirect interactions in rocky tide pools. **Functional Ecology**, v. 30, p. 1574-1582, 2016.

HABER, M.; CERFEDA, S.; CARBONE, M.; CALADO, G.; GASPAR, H.; NEVES, R.; MAHARAJAN, V.; CIMINO, G.; GAVAGNIN, M.; GHISELIN, M. T.; MOLLO, E. Coloration and defense in the nudibranch gastropod *Hypselodoris fontandraui*. **The Biological Bulletin**, v. 218, n. 2, p. 181-188, 2010.

HALLBERG, E.; SKOG, M. Chemosensory Sensilla in Crustaceans. In: BREITHAUPT, T.; THIEL, M. (Ed.). **Chemical Communication in Crustaceans**, 1ed, New York: Springer, 2011. p. 103-121.

HASZPRUNAR, G. The Heterobranchia - a new concept of the phylogeny of the higher Gastropoda. **Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung**, v. 23, p.15-37, 1985.

HAY, M. E. Marine chemical ecology: what's known and what's next? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 200, p. 103-134, 1996.

HAY, M. E. Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. **Annual Review of Marine Science**, v. 1, p. 193-212, 2009.

HAY, M. E. Crustaceans as powerful models in aquatic chemical ecology. In: BREITHAUPT, T.; THIEL, M. (Ed.). **Chemical Communication in Crustaceans**, 1ed, New York: Springer, 2011. p. 41-62.

HAYES, F. E.; SCHULTZ, S. S. Attempted predation of the nudibranch *Peltodoris nobilis* by the sea anemone *Anthopleura Artemisia*. **The Southwestern Naturalist**, v. 66, n. 3. p. 265-266, 2022.

HOLLOWELL, K. C. **A review of predator-prey interactions within marine ecosystems with a focus on top predator influences on ecosystem stability and fisheries management implications**. 2013. 38p. Dissertação (Mestrado) – Nova Southeastern University, Florida, 2013.

JOHNSON, R. Breaking family ties: taxon sampling and molecular phylogeny of chromodorid nudibranchs (Mollusca, Gastropoda). **Zoologica Scripta**, v. 40, p. 137-157, 2010.

JÖRGER, K.; STÖGER, I.; KANO, Y.; FUKUDA, H.; KNEBELSBERGER, T.; SCHRÖDL, M. On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia. **Bio Med Central Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 323, 2010.

- KUBANEK, J.; FAULKNER, D. J.; ANDERSEN, R. J. Geographic variation and tissue distribution of endogenous terpenoids in the Northeastern Pacific Ocean dorid nudibranch *Cadlina luteomarginata*: implications for the regulation of the novo biosynthesis. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 2, p. 377-389, 2000.
- LESSA, G. C. Dinâmica de maré e transporte de sedimentos no Canal de Itajuru – Laguna de Araruama (RJ). **Revista Brasileira de Geociências**, v. 21, n. 4, p. 378-386, 1991.
- LIMA, P. O. V.; DELGADO, M. First occurrence of *Crosslandia daedali* (Nudibranchia: Dendronotacea) in the South Atlantic, Northeast Brazil. **Strombus (São Paulo)**, v. 18, p. 13-14, 2011.
- LIMA, P. O. V.; SIMONE, L. R. L. Anatomical review of *Doris verrucosa* and redescription of *Doris januarii* (Gastropoda, Nudibranchia) based on comparative morphology. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 95, p. 1-18, 2015.
- LIMA, P. O. V.; SIMONE, L. R. L. Complementary anatomy of *Actinocyclus verrucosus* (Nudibranchia, Doridoidea, Actinocyclusidae) from Indo-Pacific. **Zoosystematics and Evolution**, v. 94, p. 237-246, 2018.
- LINDSAY, S. M. Frequency of injury and the ecology of regeneration in Marine Benthic Invertebrates. **Integrative and Comparative Biology**, v. 50, p. 479-493, 2010.
- LINDSAY, S. M. Sublethal predation. *Ecology*, 2023.  
doi:10.1093/obo/9780199830060-0247
- MARCUS, ER. Opisthobranchia from Brazil. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo. Zoology**, v. 20, p. 89–261, 1955.
- MAYHEW, G. M. **Predator-induced hatching plasticity of northeastern Pacific Coast nudibranchs**. 2022. 88p. Dissertação (Mestrado) – Western Washington University, Washington, 2022.
- MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. **Marine Chemical Ecology**. Flórida: CRC Press, 2001. 214p.
- MEGINA, C.; CERVERA, J. L. Diet, prey selection and cannibalism in the hunter opisthobranch *Roboastra europaea*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 83, n. 3, p. 489-495, 2003.
- MEHROTRA, R.; MONCHANIN, C.; SCOTT, C. M.; PHONGSUWAN, N.; CABALLER-GUTIERREZ, M.; CHAVANICH, S.; HOEKSEMA, B. W. Selective consumption of sacoglossan sea slugs (Mollusca: Gastropoda) by scleractinian corals (Cnidaria: Anthozoa). **Plos One**, v. 14, n. 4, e0215063, 2019.

MOLES, J.; WÄGELE, H.; BALLESTEROS, M.; PUJALS, Á.; UHL, G.; AVILA, C. The end of the cold loneliness: 3D comparison between *Doto antarctica* and a new sympatric species of *Doto* (Heterobranchia: Nudibranchia). **Plos ONE**, vol. 11, n. 7, e0157941, 2016.

MOLLUSCABASE (2023). MolluscaBase. *Cadlina rumia* Er. Marcus, 1955. Disponível em: World Register of Marine Species <<http://www.marinespecies.org.php?p=taxdetails&id=532477>>. Acesso em: 10 maio 2023.

MORO, L.; BACALLADO, J. J.; ORTEA, J. Babosas marinas de lãs islãs Canarias. **Actas VI Semana Científica Telesforo Bravo**, DOI: 10.13140/RG.2.1.1168.2009, 2010.

MURPHY, B.F.; HADFIELD, M. G. Chemoreception in the nudibranch gastropod *Phestilla sibogae*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 727-735, 1997.

NAKANO, R.; HIROSE, E. Field experiments on the feeding of the nudibranch *Gymnodoris* spp. (Nudibranchia: Doridina: Gymnodorididae) in Japan. **The Veliger**, v. 51, n. 2, p. 66-75, 2011.

PADULA, V. **Caracterização taxonômica das espécies da subordem Aeolidina (Mollusca, Gastropoda, Nudibranchia) da Praia das Conchas, Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil**. 2007. 69p. Monografia (Bacharelado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

PADULA, V. Nudibrânquios: taxonomia e diversidade na costa brasileira. **Informativo Sociedade Brasileira de Zoologia**, n. 109, p. 5–7, 2014.

PADULA, V. **Testing traditional concepts: biodiversity and integrative taxonomy of Brazilian opisthobranchs (Mollusca, Heterobranchia)**. 2015. 269p. Tese (Doutorado) – Universität München, München, 2015.

PADULA, V.; ABSALÃO, R. S. Primeiro registro de *Babakina festiva* (Roller, 1972) (Mollusca: Nudibranchia) no Atlântico Sul. **Biociências (Porto Alegre)**, Porto Alegre, v. 13, n. 1, p. 99-101, 2005.

PADULA, V.; ARAUJO, A. K.; MATTHEWS-CASCON, H.; SCHRÖDL, M. Is the Mediterranean nudibranch *Cratena peregrina* (Gmelin, 1791) present in the Brazilian coast? Integrative species delimitation and description of *Cratena minor* n.sp. **Journal of Molluscan Studies**, v. 80, p. 575-584, 2014.

PADULA, V.; BAHIA, J.; CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI, H. H. New records of opisthobranchs (Mollusca: Gastropoda) from Alagoas, northeastern Brazil. **Marine Biodiversity Records**, v. 5, p. e 57, 2012.

PADULA, V.; BAHIA, J.; STÖGER, I.; CAMACHO-GARCÍA, Y.; MALAQUIAS, M. A. E.; CERVERA, J. L.; SCHRÖDL, M. A test of color-based taxonomy in nudibranchs: Molecular phylogeny and species delimitation of the *Felimida clenchi* (Mollusca: Chromodorididae) species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 103, p. 215-229, 2016.

PADULA, V.; BAHIA, J.; VARGAS, C.; LINDNER, A. Mollusca, Nudibranchia: New records and southward range extensions in Santa Catarina, southern Brazil. **Check list**, v. 7, n. 6, p. 806-808, 2011.

PADULA, V.; DELGADO, M. A new species of *Cerberilla* (Gastropoda: Nudibranchia: Aeolidiidae) from northeastern Brazil. **The Nautilus** (Philadelphia), v. 124, n. 4, p. 175-180, 2010.

PADULA, V.; SANTOS, F. N. Three new records of Nudibranchia (Mollusca, Gastropoda) - additions on the Brazilian biodiversity. **Biociências** (Porto Alegre), v. 14, n. 2, p. 214-220, 2006.

PAUL, V. J.; RITSON-WILLIAMS, R. Marine chemical ecology. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 4, p. 662-695, 2008.

PAWLIK, J. R. Marine invertebrate chemical defenses. **Chemical Review**, v. 93, p. 1911-1922, 1993.

PENNEY, B. K. Individual selection and the evolution of chemical defence in nudibranchs: experiments with whole *Cadlina luteomarginata* (Nudibranchia: Doridina). **Journal of Molluscan Studies**, v. 70, n. 4, p. 399-402, 2004.

PENNEY, B. K. How specialized are the diets of northeastern pacific sponge-eating dorid nudibranchs? **Journal of Molluscan Studies**, v. 79, p. 64-73, 2013.

PEREIRA, F. R.; BERLINCK, R. G. S.; RODRIGUES-FILHO, E.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G. PADULA, V. Metabólitos secundários dos nudibrânquios *Tambja stegosauriformis*, *Hypselodoris lajensis* e *Okenia zoobotryon* e dos briozoários *Zoobotryon verticillatum* e *Bugula dentata* da costa do Brasil. **Química Nova**, vol. 35, p. 2194-2201, 2012.

PEREIRA, R. C. Ecologia Química Marinha. In: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. (Ed.). **Biologia Marinha**. 2ed, Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2009. p. 473-504.

PUGLISI, M. P.; SNEED, J. M.; SHARP, K. H.; RITSON-WILLIAMS, R.; PAUL, V. J. Marine chemical ecology in benthic environments. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1510-1553, 2014.

RAMIREZ, M. C. A.; WILLIAMS, D. E.; GUBIANI, J. R.; PARRA, L. L. L.; SANTOS, M. F. C.; FERREIRA, D. D.; MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; FERREIRA, A. G.; PADULA, V.; HAJDU, E.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Rearranged terpenoids from the marine sponge *Darwinella* cf. *oxeata*



and its predator, the nudibranch *Felimida graham*. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 720-725, 2017.

ROGERS, C. N.; NYS, R.; STEINBERG, P. D. Predation on juvenile *Aplysia parvula* and other small anaspidean, ascoglossan, and nudibranch gastropods by pycnogonids. **The Veliger**, v. 43, n. 4, p. 330-337, 2000.

RUDMAN, W. B. (2000). *What eats sea slugs?* Disponível em: Sea Slug Forum <<http://www.seaslugforum.net/factsheet/predrecord>>. Acesso em: 23 maio 2023.

RUDMAN, W. B.; BERGQUIST, P. R. A review of feeding specificity in the spongefeeding Chromodorididae (Nudibranchia: Mollusca). **Molluscan Research**, v. 27, n. 2, p. 60-88, 2007.

SALES, L.; DELGADO, M.; QUEIROZ, V.; PADULA, V.; SAMPAIO, C. L.; JOHNSON, R. First Record of *Flabellina dana* Millen and Hamann, 2006 (Mollusca: Nudibranchia) in the South Atlantic Ocean. **Check List** (São Paulo), v. 7, p. 880-882, 2011.

SALES, L.; MIGOTTO, A. E.; BARONI, S.; CUNHA, C. M. Taxonomic reassessment and redescription of *Okenia polycerelloides* (Ortea & Bouchet, 1983) (Nudibranchia: Goniodorididae) based on morphological and molecular data. **Marine Biodiversity**, v. 1, p. 1-18, 2019.

SALES, L.; QUEIROZ, V.; MIGOTTO, A. E. Rediscovery of *Okenia impexa* Marcus 1957 (Mollusca: Nudibranchia) on the Brazilian coast: the first image of a living specimen from Brazil. **Spixiana**, v. 39, p. 203-204, 2016.

SALES, L.; QUEIROZ, V.; PADULA, V.; NEVES, E. G.; JOHNSON, R. New records of nudibranchs (Mollusca: Gastropoda) from Bahia state, northeastern Brazil. **Check List** (São Paulo), v. 9, p. 689-691, 2013.

SAVOCA, M. S.; NEVITT, G. A. Evidence that dimethyl sulfide facilitates a tritrophic mutualism between marine primary producers and top predators. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 11, p. 4157-4161, 2014.

SCHRÖDL, M.; JÖRGER, K. M.; KLUSSMANN-KOLB, A.; WILSON, N. G. Bye bye "Opisthobranchia"! A review on the contribution of mesopsammic sea slugs to euthyneuran systematic. **Thalassas: An International Journal of Marine Sciences**, v. 27, n. 2, p. 101-112, 2011.

SMITH, S. A.; WILSON, N. G.; GOETZ, F. E.; FEEHERY, C.; ANDRADE, S. C. S.; ROUSE, G. W.; GIRIBET, G.; DUNN, C. W. Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. **Nature**, v. 480, p. 364-367, 2011.

STEINKE, M.; MALIN, G.; LISS, P. S. Trophic interactions in the sea: an ecological role for climate relevant volatiles? **Journal of Phycology**, v. 38, p. 630-638, 2002.

THAKUR, N. L.; SINGH, A. Chemical ecology of marine sponges. In: PALLELA, R.; EHRLICH, H. (Ed.). **Chemicobiological and Biomedical Applications**. 1ed, India: Springer, 2016. p. 37-52.

THIEL, M.; BREITHAUPT, T. Chemical communication in Crustaceans: Research challenges for the twenty-first century. In: BREITHAUPT, T.; THIEL, M. (Ed.). **Chemical Communication in Crustaceans**, 1ed, New York: Springer, 2011. p. 3-22.

THOMPSON, J. E.; WALKER, R. P.; WRATTEN, S. J.; FAULKNER, D. J. A chemical defense mechanism for the nudibranch *Cadlina luteomarginata*. **Tetrahedron**, v. 38, n. 13, p. 1865-1873, 1982.

VALBUENA-GONZALO, C. **The importance of trait mediated indirect interactions in marine ecosystems**. 2019. 25p. Monografia (Bacharelado) - Umeå University, Umeå, 2019.

VALDÉS, Á. Phylogeography and phyloecology of dorid nudibranchs (Mollusca, Gastropoda). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 83, p. 551-559, 2004.

VALDÉS, Á.; BLANCHARD, L.; MARTI, W. Caught naked: First report a nudibranch sea slug attacked by a cone snail. **American Malacological Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 337-338, 2013.

VALDÉS, Á.; HAMANN, J.; BEHRENS, D.W.; DUPONT, A. **Caribbean sea slugs**: A field guide to the opisthobranch mollusks from the tropical northwestern Atlantic. Gig Harbor : Sea Challengers Natural History Books, 2006. 289p.

van der MEIJ, S. E. T.; REIJNEN, B. T. First observations of attempted nudibranch predation by sea anemones. **Marine Biodiversity**, v. 42, p. 281-283, 2012.

WÄGELE, H. Potential key characters in Opisthobranchia (Gastropoda, Mollusca) enhancing adaptive radiation. **Organisms Diversity e Evolution**, v. 4, n. 3, p. 175-188, 2004.

WÄGELE, H.; KLUSSMAN-KOLB, A. Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda) more than just slimy slugs. Shell reduction and its implications on defence and foraging. **Frontiers in Zoology**, v. 2, n. 3, p. 1-18, 2005.

WÄGELE, H.; KLUSSMANN-KOLB, A.; VERBEEK, E.; SCHRÖDL, M. Flashback and foreshadowing - a review of the taxon Opisthobranchia. **Organisms Diversity and Evolution**, v. 14, p. 133-149, 2014.

WÄGELE, H.; KLUSSMAN-KOLB, A.; VONNEMANN, V.; MEDINA, M. Heterobranchia I: the Opisthobranchia. In: PONDER, W. F.; LINDBERG, D. R. (Ed.). **Phylogeny and Evolution of the Mollusca**. Berkeley e Los Angeles: University of California Press, 2008. p. 385-408.

WÄGELE, H.; WILLAN, R. C. Phylogeny of the Nudibranchia. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 130, p. 83-181, 2000.

WEBSTER, D. R.; WEISSBURG, M. J. The hydrodynamics of chemical cues among aquatic organisms. **The Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 41, p. 73-90, 2009.

WEISSBURG, M. Death from downstream: chemosensory navigation and predator-prey process. In: BRONMARK, C.; HANSSON, L.A. (Ed.). **Chemical ecology in aquatic systems**. Oxford University Press Inc, New York, 2012. p. 96-110.

WEISSBURG, M. J.; ZIMMER-FAUST, R. K. Odor plumes and how blue crabs use them in finding prey. **Journal of Experimental Biology**, v. 197, n. 1, p. 349-375, 1994.

Wyeth, R.C. Olfactory navigation in aquatic gastropods. **Journal of Experimental Biology**, 222: jeb 185843, 2019.

ZHOU, T.; REBACH, S. Chemosensory orientation of the rock crab *Cancer irroratus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 2. p. 315-329, 1999.

ZIMMER-FAUST, R. K. The relationship between chemoreception and foraging behavior in crustaceans. **Limnology and Oceanography**, v. 34, n. 7, p. 1367-1374, 1989.

ZIMMER-FAUST, R. K. ATP: A potent prey attractant evoking carnivory. **Limnology and Oceanography**, v. 38, n. 6, p. 1271-1275, 1993.

ZIMMER, R. K.; COMMINS, J. E.; BROWNE, K. A. Regulatory effects of environmental chemical signals on search behavior and foraging success. **Ecology**, v. 80, n. 4, p. 1432-1446, 1999.

ZIMMER-FAUST, R. K.; FINELLI, C. M.; PENTCHEFF, N. D.; WETHEY, D. S. Odor plumes and animal navigation in turbulent water flow: a field study. **Biology Bulletin**, v. 188, p. 111-116, 1995.

ZIMMER-FAUST, R. K.; O'NEILL, P. B. O.; SCHAR, D. W. The relationship between predator activity state and sensitivity to prey odor. **Biology Bulletin**, v. 190, p. 82-87, 1996.