

**ALGUNOS ASPECTOS DE LAS VARIACIONES DE PROTEINAS
Y AMINOACIDOS LIBRES TOTALES
DEL LIQUIDO INTRACAPSULAR
EN RELACION AL DESARROLLO EMBRIONARIO
EN *ADELOMELON BRASILIANA* (LAMARCK, 1811)
(GASTROPODA, PROSOBRANCHIA, VOLUTIDAE). (1)**

por

Genoveva C. de Mahieu, Pablo E. Penchaszadeh y Alicia B. Casal
Institute de Biologia Marina, Mar del Plata, Argentina.

Résumé

Quelques données sur les variations des protéines et des aminoacides libres totaux du liquide intracapsulaire, en relation avec le développement embryonnaire chez *Adelomelon brasiliana* (Lamarck, 1811) (Gastropoda, Prosobranchia, Volutidae).

La ponte d'*Adelomelon brasiliana* (Gastropoda, Volutidae) consiste en quelques œufs contenus dans une capsule ovoïde, d'une taille considérable. Le volume de chaque capsule est en moyenne de 77 ml et contient de 9 à 33 embryons (en moyenne, 22). Ces embryons atteignent leur métamorphose complète dans la capsule, se nourrissant de substances extraembryonnaires dissoutes dans le liquide intracapsulaire.

La composition protéinique du liquide intracapsulaire reste identique pendant tous les stades du développement embryonnaire, avec deux bandes constantes dans la séparation électrophorétique. La concentration en protéines et en aminoacides libres varie au cours des différents stades. Parmi les aminoacides, on trouve en permanence les acides glutamique, aspartique et la phénylalanine. Les changements observés au stade précédant l'éclosion prouvent que l'ouverture de la capsule, qui se produit dans un endroit prédéterminé, est essentiellement un processus chimique.

Introducción

Adelomelon brasiliana es un gasterópodo muy común, que habita fondos arenosos poco profundos desde Rio Grande do Sul (Brasil) hasta Rio Negro (Argentina).

Sus peculiares capsulas ovigeras libres, que encierran volúmenes a menudo superiores a 100 ml, en las que se desarrollan unos pocos

(1) Contribución del Instituto de Biologia Marina n° 228.

embriones, brindan un material sumamente noble para el estudio de la relación entre la composición y propiedades del líquido intracapsular y el desarrollo embrionario. Las proteínas del líquido intracapsular constituyen en *A. brasiliensis*, la fuente principal de alimento para el embrión ; de un huevo de 240 μ de diámetro se desarrolla un embrión cuya longitud a la eclosión alcanza los 10 mm. En relación a los diferentes estadios de desarrollo embrionario se efectuó la separación y dosaje de proteínas en el líquido intracapsular y se determinaron aminoácidos libres totales, algunos de los cuales fueron identificados.

Material y métodos

Se analizaron en total 150 ovicápsulas de *A. brasiliensis*, obtenidas en el puerto de Mar del Plata, provenientes de la pesca costera de arrastre y de material de descarte destinado a la industria de reducción. Las muestras se tomaron desde fines de diciembre de 1971 hasta abril de 1972.

En cada cápsula se practicó una incisión para extraer el líquido, se midió el volumen ocupado por él y se conservó a -20°C . Asimismo se extrajo la membrana interna de la capsula directamente en contacto con el líquido y se contó el número de embriones, verificándose el estadio de desarrollo de los mismos.

Se efectuaron las siguientes determinaciones en el líquido intracapsular :

Proteína total. Se utilizó el método colorimétrico que pone en juego el reactivo de Biuret, según Gornall et al. (1949), que da una coloración violácea cuya intensidad es función de la concentración protéica. Como testigo se utilizó albúmina bovina de la fracción V Armour (100 mg/ml). Se efectuaron lecturas a 540 m μ en un espectrofotómetro Hilger y Watts.

Electroforesis sobre acetato de celulosa. Se separaron las proteínas del líquido intracapsular utilizando un buffer de barbitol (pH 8,9) y otro de fosfatos (pH 6,891 ; 0,025 M). Como colorante se utilizó Amidoschwartz 10B ; el tiempo de corrida fue de 15 minutos, a 250 V, a 18°C . Para separar las proteínas solubles de la membrana interna de la capsula, se la trató con agua destilada, se homogeneizó y centrifugó tomándose luego el sobrenadante. Este se dividió en dos partes, en una se verificó presencia de proteínas con ácido tricloroacético 5 p. 100 y la otra se corrió electroforéticamente.

Aminoácidos libres totales. Se procedió de acuerdo al método de Lee y Takahashi (1966) usando como reactivo una mezcla de solución de ninhidrina 1 p. 100 en buffer citrato (pH 5,5), glicerina y buffer citrato (pH 5,5) en proporción volumétrica 0,5 : 1,2 : 0,2. La precipitación de proteínas se efectuó con tricloroacético ; hasta una concentración final del 5 p. 100. Se leyó en espectrofotómetro a 540 m μ .

El método da como resultado una relación lineal entre concentración de aminoácidos y densidad óptica. Para trazar la recta de trabajos de rutina se toman 2 puntos ; 0 μg y 2 μg de aminoácido.



G. DE MAHIEU, P.E. PEXCHASZADEH Y A.B. CASAI.

LAMINA 1

Ovicâpsula de *Adelomelon brasiliana* ; 3/4 del tamaño natural.
(Fotogr. M. A. Scelzo)

Separación cualitativa de algunos aminoácidos libres. Mediante cromatografía sobre Silicagel G, usando técnica bidimensional ascendente. Los sistemas de solventes usados fueron fenol-agua (75-25 w/w) y butanol-acético-agua (60 : 20 : 20) usando como revelador solución de ninhidrina en butanol-acético. Para la precipitación de proteínas y polisacáridos, se utilizó etanol, se centrifugó, y el sobrenadante se llevó a sequedad a vacío, a no más de 50 °C. El residuo se redisolvió en 0,01 ml de etanol y se sembró en la placa.

Salinidad : Se determinó según el método de Mohr, con solución NO_3Ag (27,25 g/l) usando como indicador solución CrO_4K_2 (80 g/l).

pH. Se determinó con un pHímetro Metrohm, en muestras de líquido intracapsular conservadas a — 20 °C.

RESULTADOS

En *A. brasiliana* los embriones completan su desarrollo y total metamorfosis dentro de la ovicapsula alimentándose de sustancias extravitelinas disueltas en el líquido intracapsular. Las cápsulas son de forma ovoide, con un largo (diámetro mayor) entre 40 y 80 mm, y un ancho (diámetro menor) que varía entre 35 y 65 mm (Lamina 1). El número de embriones por cápsula varía entre 9 y 33, existiendo una correlación positiva entre el tamaño de la cápsula y el número de embriones.

Se han establecido arbitrariamente ocho diferentes estadios de desarrollo embrionario a saber (Fig. 1) :

Estadio 0 : Desde el momento de la puesta, la segmentación del huevo, la larva veliger intracapsular, comprendiendo también las primeras etapas del crecimiento en tamaño y transformación de la vesícula cefálica.

Estadio I : Estadio de crecimiento ; presentan una longitud media de 4,5 mm ; no realizan movimientos ni natatorios ni reptadores.

Estadio II : Finalizan los procesos de crecimiento anterior a la formación de la conchilla ; no se desplazan y alcanzan una longitud media de 6 mm.

Estadio III : Se desarrolla el pie, realizando desplazamientos reptadores por la pared capsular. Comienza a desarrollarse la conchilla (completamente orgánica) ; el organismo ha crecido en grosor.

Estadio IV : Se ha conformado la conchilla, que es muy delgada ; presenta una media de 7,5 mm de longitud y 5,0 mm de ancho.

Estadio V : De crecimiento y calcificación ; longitud media de 8,5 mm y ancho de 6,0 mm.

Estadio VI : De crecimiento y calcificación ; longitud media de 9,5 mm y ancho de 6,0 mm.

Estadio VII : De la eclosión, con una longitud media de 10,5 mm y ancho de 6,5 mm.

TABLA 1
 Análisis de las muestras en porcentajes de estadios embrionarios representados

Fecha	Estadios de desarrollo embrionario							
	0	I	II	III	IV	V	VI	VII
30 dic. 1971	9,5	38,0	23,8	4,7	14,2	9,5	—	—
8-20 en. 1972	17,4	20,6	15,8	33,3	9,5	3,1	—	—
13 mar. 1972	7,4	7,4	14,8	14,8	—	14,8	29,3	11,1
20 abr. 1972	18,7	7,8	15,6	—	—	3,1	20,3	34,3

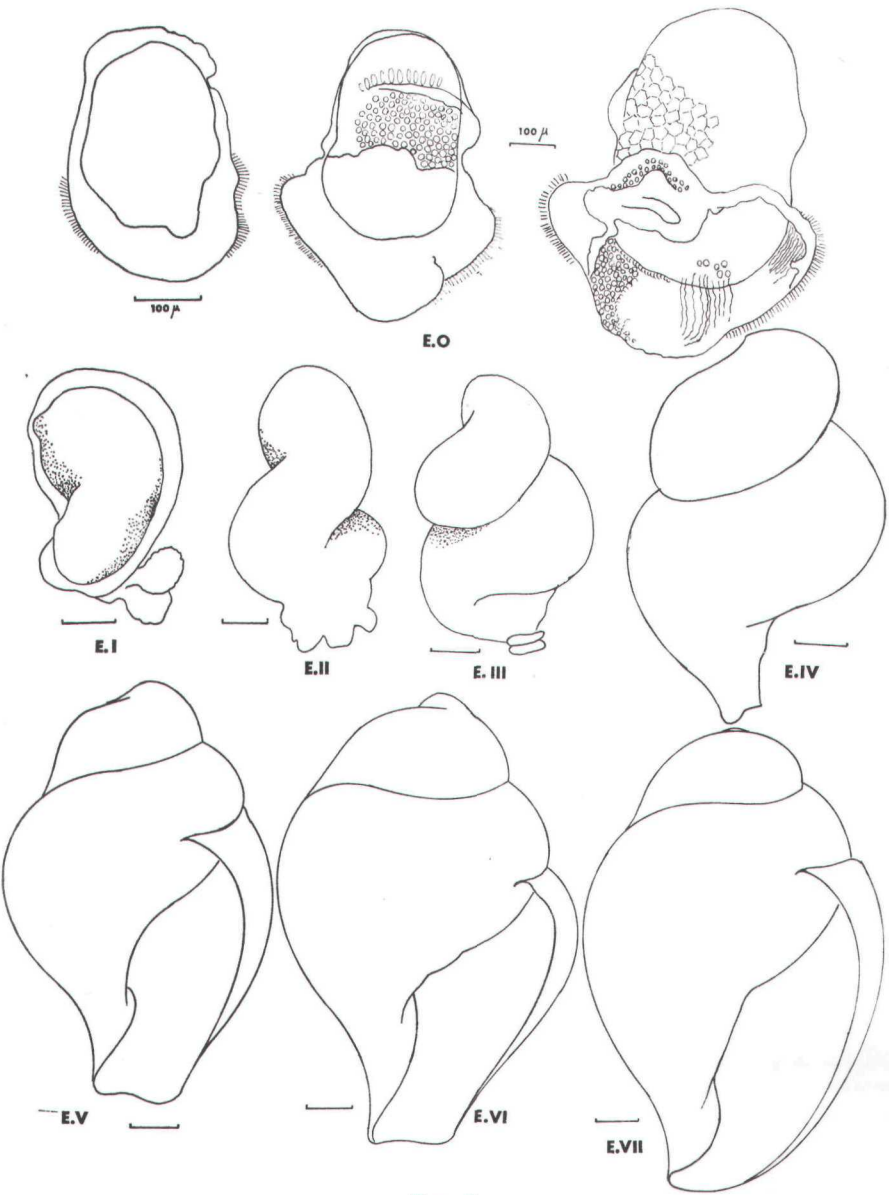


FIG. 1
 Estadios de desarrollo embrionario considerados ; explicación en el texto.

De la Tabla 1 se desprende que teniendo en cuenta la frecuencia de estadios en cada muestra y la presencia a partir de marzo de ovicápsulas en estadios VI y VII, el tiempo que transcurre entre la puesta y la eclosión sería de alrededor de los tres meses.

TABLA 2

Valores medios de volumen, salinidad, pH, aminoácidos y proteínas totales y relación $\frac{\text{Proteína total}}{\text{Aminoác. totales}}$ en el líquido intracapsular para cada estadio embrionario considerado.

Estadio	Volumen (ml)	Salinidad (p. 1000)	pH	aminoácidos totales (μm)	Protéina total (mg)	Proteína total media
						Aminoácidos totales medios (mg/ μm)
0	83	32,91	7,18	122,53	1 506,72	12,29
I	73	32,86	7,20	170,93	1 818,52	10,63
II	75	33,15	7,20	44,48	1 314,64	29,55
III	77	32,55	7,21	281,74	1 509,09	5,35
IV	78	33,93	7,20	173,64	1 486,35	8,55
V	78	33,45	6,81	65,90	1 281,36	19,44
VI	71	33,36	6,93	3,75	873,42	234,31
VII	82	33,56	6,90	11,16	1 204,44	107,92

En la Tabla 2 se encuentran los valores medios de algunos componentes y propiedades del líquido intracapsular en relación a los distintos estadios de desarrollo embrionario.

Las medias de aminoácidos libres totales y de proteínas totales son fluctuantes (Fig. 2a) ; presentan dos picos máximos, uno correspondiente al estadio I y otro al III. Los aminoácidos están presentes en el estadio III en un valor que excede en más del doble al inicial (estadio 0) en tanto que las proteínas presentan valores similares para ambos estadios. Los valores de ambos componentes tienen una caída lineal entre los estadios III y IV, alcanzando un mínimo al llegar al estadio VI, para luego anotar un pequeño incremento al pasar de VI á VII.

Los valores medios de salinidad presentan dos picos : el primero en II y el segundo en IV. Coincidiendo con lo hallado para aminoácidos y proteínas también se anota un ligero aumento al pasar de estadio VI á VII (Fig. 2b).

El pH es ligeramente básico (7,18-7,21) a partir del estadio 0 hasta el IV, presentando valores levemente ácidos (6,81 - 6,90) desde V á VII.

Existen dos etapas en las que paulatinamente aumenta la relación de proteínas totales a aminoácidos libres totales del líquido intracapsular ; la primera es desde el estadio 0 al II, en que el aumento no es muy pronunciado, y la segunda es desde III a VI, en la que se produce un aumento exponencial (Fig. 2c).

Para distintos volúmenes capsulares se encuentra un número diferente de embriones y una variación en la cantidad de aminoácidos libres y proteínas totales en el líquido intracapsular. La variación de

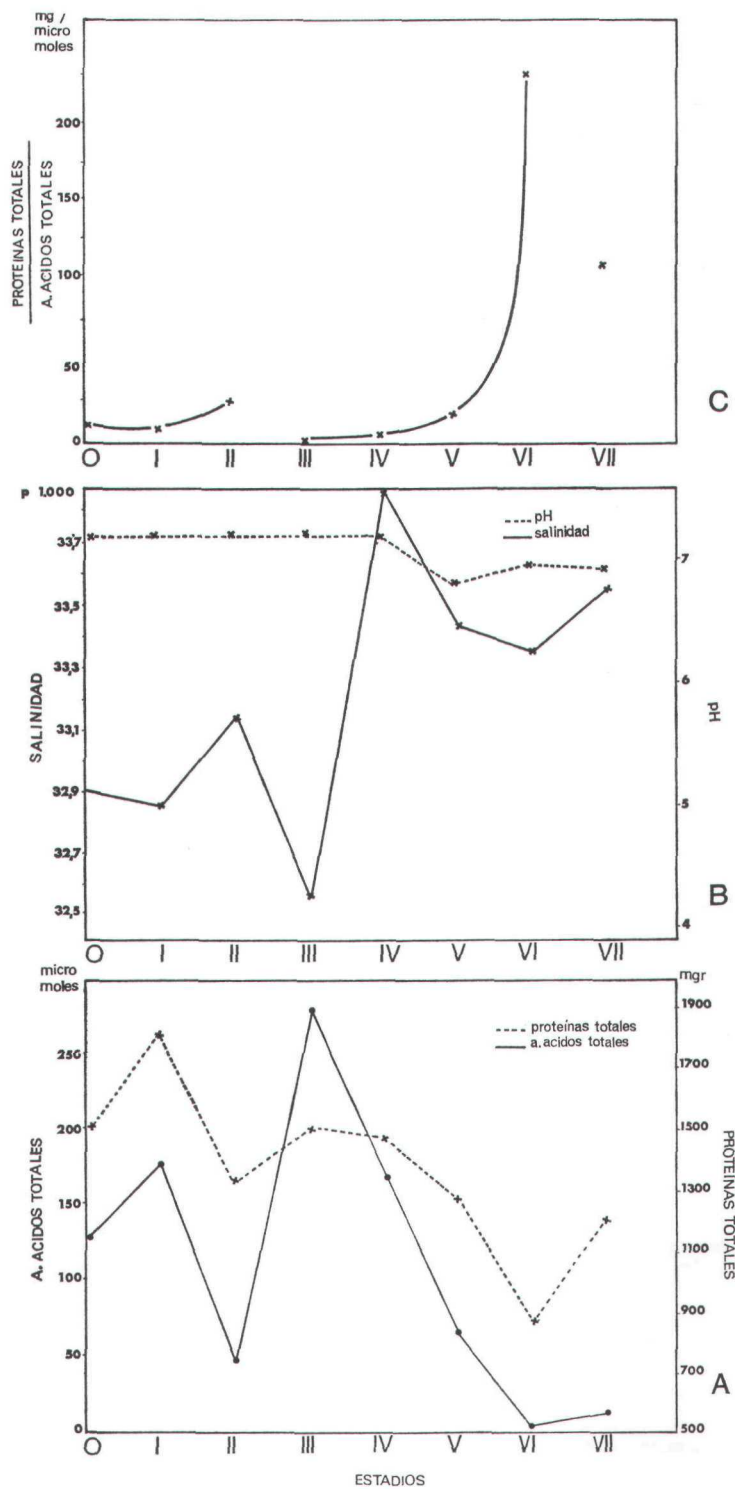


FIG. 2

Proteínas y aminoácidos libres totales, pH y salinidad del líquido intracapsular en los diferentes estadios embrionarios considerados.
Salinidad p. 1000.

la media del número de embriones en relación a la media del volumen capsular resulta una curva sigmoidea (Fig. 3). En valores medios, el número de embriones para grandes volúmenes es de 22 embriones/

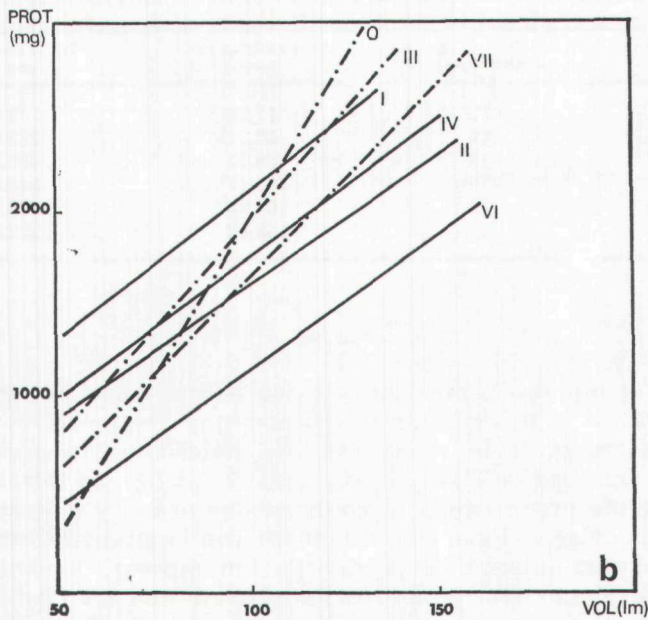
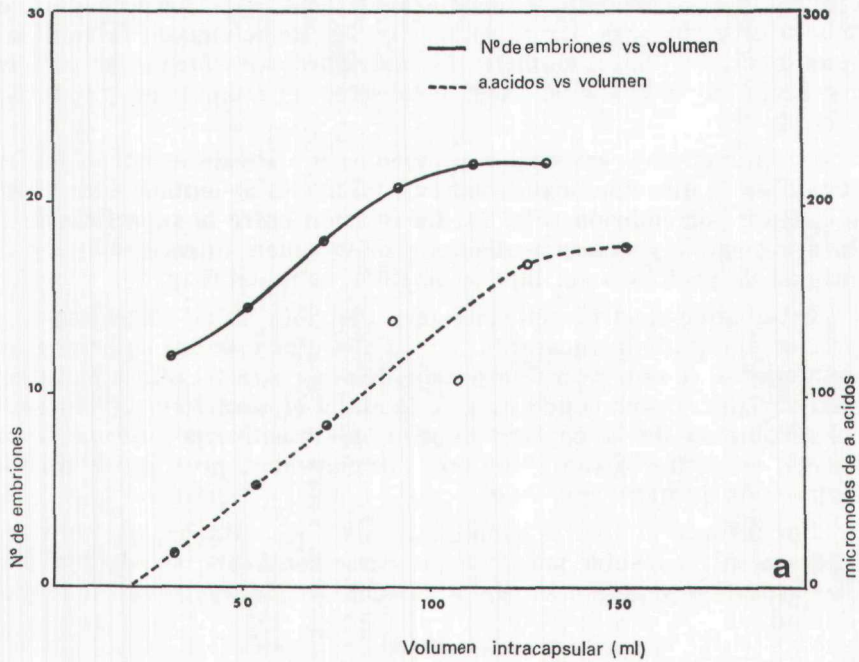


FIG. 3

a : variación de la media del número de embriones y aminoácidos libres totales en relación a volúmenes medios del líquido intracapsular.

b : variación de la cantidad de proteína total del líquido intracapsular en relación al volumen y para cada estadio de desarrollo embrionario.

cápsula, siendo el máximo absoluto registrado 33 embriones en una cápsula de 122 ml de volumen, en estadio III (Tabla 3).

La relación entre la cantidad de aminoácidos libres totales y el volumen varía con una tendencia semejante a la hallada para el número de embriones por cápsula (Fig. 3). Relacionando la cantidad de aminoácidos con el número de embriones por cápsula se obtiene una recta cuya ecuación (por cuadrados mínimos) es $y = 9,16x - 71,14$.

(x : número de embriones promedio; y : μm de aminoácidos en promedio), lo que significa un incremento medio de aminoácidos libres de 9,16 μm por embrión (Fig. 4). La relación entre la superficie de la cápsula ovígera y consecuentemente el volumen intracapsular, y la cantidad de proteínas del líquido también es lineal (Fig. 5).

Estudiando electroforéticamente la distribución de fracciones proteicas en el líquido intracapsular en los distintos estadios embrionarios considerados, se observan siempre dos bandas características de intensidad variable, dependiendo ésta de la etapa del desarrollo involucrado y del volumen de la cápsula ovígera. La membrana interna de la cápsula, en contacto con el líquido intracapsular, presenta la misma composición proteica que éste.

Por último, la composición cualitativa de aminoácidos libres en el líquido intracapsular parece mantenerse constante, siendo fenilalanina, aspártico y glutámico los aminoácidos que aparecen en mayor cantidad.

TABLA 3

Media de aminoácidos libres totales, proteínas totales y número de embriones en el líquido intracapsular extravitelino para los distintos intervalos de volumen.

Volumen (ml)	Número de embriones	Aminoácidos tot. (μm)	Proteínas tot. (mg)
21-40	12	19,20	569,40
41-60	14	53,51	775,03
61-80	18	86,25	1 208,10
81-100	20	139,41	1 544,88
101-120	22	108,95	2 497,55
121-140	22	158,62	2 282,95

Discusion

Tanto el líquido intracapsular extravitelino como la membrana más interna de la ovicápsula mantienen una composición proteica constante a través de todos los estadios embrionarios considerados. Además, la cantidad de proteínas disponibles del líquido intracapsular es directamente proporcional al volumen que ocupa y a la superficie de la cápsula ovígera. Esto, conjuntamente con la gradual disminución de la membrana interna de la cápsula (en espesor) a medida que transcurre el desarrollo, permitiría interpretar que las proteínas del líquido intracapsular provendrían en parte de la disolución de la membrana más interna de la ovicápsula.

Observando la Fig. 3 (b) vemos que la relación proteínas totales—volumen para cada estadio es lineal. El hecho de que las pendientes

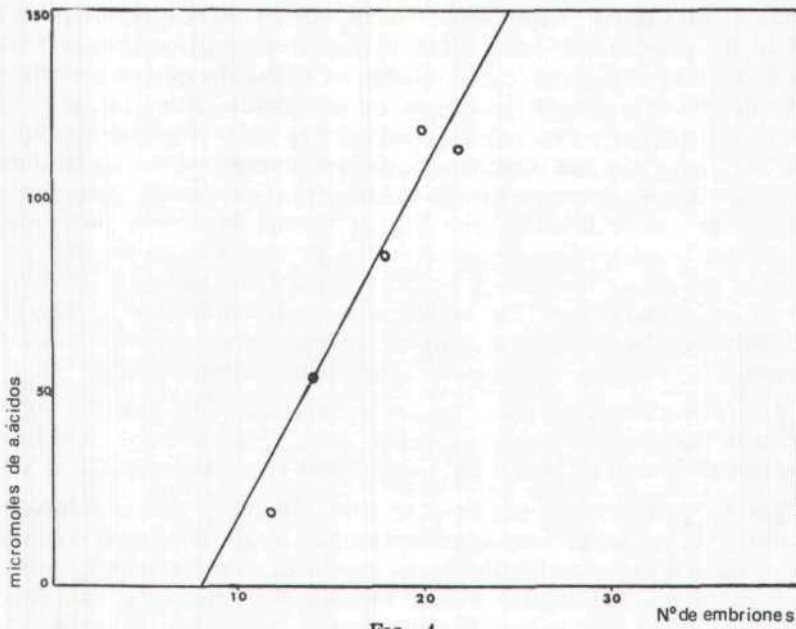


FIG. 4

Relación entre el número de embriones por cápsula y la cantidad de aminoácidos libres en el líquido intracapsular (en valores promedios).

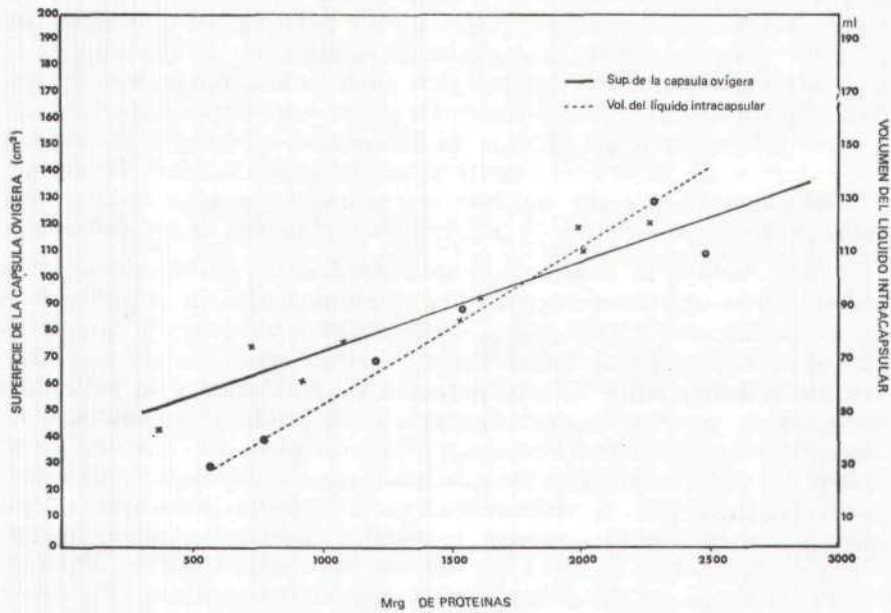


FIG. 5

Relación entre la superficie de la ovicapsula y el volumen intracapsular con la cantidad de proteínas totales.

varíen, indica que para cada estadio hay una movilización protéica diferente. Si tenemos en cuenta la constancia en la composición protéica en contraste con todos los cambios que se producen desde el

estadio O al VII en el líquido intracapsular, vemos que las proteínas de éste no pueden ser las causantes de reacciones, sino que simplemente están suministrando una fuente de alimento que es incorporado según las necesidades del embrión en desarrollo. Nuestros resultados no nos permiten precisar si las variaciones en concentración de proteína a través de los distintos estadios corresponden solamente a distintos ritmos de ingestión ó también a excreción protéica. Sin embargo se puede afirmar que por lo menos la mayor parte de las variaciones se deben principalmente al primer factor ya que en los procesos de diferenciación y crecimiento existe siempre predominio de procesos anabólicos. En la etapa de diferenciación ya existe un predominio de procesos regidos por enzimas que se manifiesta en un aumento de proteína citoplásmica (Davidson y Leslie, 1950).

Las dos etapas en las que los embriones incorporan más proteínas (en las que se produce descenso de la proteína total en el líquido intracapsular) son al pasar del estadio I al II y luego del III al VI.

En la primera se produce el crecimiento y diferenciación de órganos y la segunda corresponde fundamentalmente a la formación y calcificación de la conchilla. Varios autores han llamado la atención sobre la formación de la matriz orgánica previa a la calcificación (Hammen y Wilbur, 1959 ; Wilbur, 1960 ; Wilbur y Watabe, 1963 ; Kobayashi, 1964 ; etc.) proceso que entrañaría una gran movilización protéica. Al propio tiempo, en las dos etapas señaladas existe un predominio de proteínas en relación a los aminoácidos libres. La interconversión sería imperceptible de ser positiva, ya que existe un perfecto sincronismo en el aumento y disminución de los valores de ambos constituyentes, lo que por otra parte indica que ambos responden conjuntamente a las necesidades de los embriones. El hecho de que la composición del líquido intracapsular en lo que respecta a aminoácidos libres sea constante y exista una cantidad de aminoácidos libres para cada embrión en promedio, podría indicar que estos provendrían también de la actividad metabólica de los embriones.

En cuanto a la función que desempeñan los aminoácidos libres Meenakshi et al. (1969) encontraron 15 aminoácidos en el periostraco de 27 especies de gasterópodos, especialmente aspártico y glutámico en las formas marinas. Según los mismos autores existiría una interesante relación entre la incorporación de glutámico y la salinidad, encontrando que un aumento en la última produce un aumento de concentración del aminoácido en el periostraco. En nuestro caso, podría tal vez explicarse el asincronismo observado entre la salinidad y la concentración de aminoácidos en el líquido intracapsular, ya que un aumento de la salinidad produciría una incorporación instantánea de aminoácidos libres, ya que según Wood (1965) y Woods y Webb (1966) puede haber ingestión o absorción de aminoácidos libres a nivel celular. Por otra parte Wilbur (1964) indica como componentes importantes para la fijación del CO_2 en el manto la presencia de aspártico, glutámico y alanina. A partir del estadio IV, en que se calcifica la conchilla es cuando existiría una mayor retención de aminoácidos libres (entre ellos aspártico y glutámico).

En cuanto a la eclosión, Davis (1968) cita tres posibles mecanismos : mecánico, enzimático y osmótico.

Eclosión puramente mecánica no ha sido descripta para ningún Prosobranquio. De nuestras observaciones no aparece como probable el primer tipo de mecanismo, ya que en acuario sin perturbaciones otra que el aireador, se observa que la eclosión se produce por una zona predeterminada de la cápsula, opalescente y más delgada, de alrededor de un centímetro de diámetro, que se disuelve ; los embriones salen exclusivamente por esa zona, sin que la cápsula sea sometida a ningún tipo de acción mecánica.

En cuanto a los mecanismos enzimáticos podemos observar que : a medida que avanzan los estadios de desarrollo se va produciendo una disolución gradual de la membrana en contacto con el líquido intracapsular ; al pasar del estadio VI al VII se produce un aumento de la concentración en aminoácidos libres totales y también un aumento en la concentración de proteínas totales, que podría relacionarse con una postrera disolución de la membrana, previa a la eclosión ; al propio tiempo la salinidad es máxima y el pH es mínimo en VII, y la relación proteína total aminoácidos libres totales descendiende. Es también de hacer notar que en marzo, mes en el que comienza la eclosión masiva de los huevos puestos en diciembre-enero, es cuando se registra la mayor temperatura en las aguas costeras de Mar del Plata (20 °C ; Carreto, 1968). Todos estos cambios podrían, de alguna manera, permitir la acción de una ó más enzimas que hasta entonces carecían de condiciones óptimas para actuar. D'Asaro (1969) postula que la apertura de la cápsula en *Bursa* y *Distorsio* es probablemente la resultante de una acción enzimática controlada por el embrión. En nuestro caso, no se han detectado cambios en la composición protéica del líquido intracapsular, lo que descartaría la hipótesis de creación de enzimas y secreción al medio por parte de los embriones, por lo menos en nuestro actual estado de conocimientos. Un futuro análisis de las membranas de la cápsula permitiría elucidar las transformaciones que se producen en ésta.

Por último, consideramos que debe descartarse un mecanismo osmótico de eclosión, primero por todas las evidencias anteriormente mencionadas, y segundo, por que si bien se produce un ligero aumento de la salinidad al pasar del estadio VI al VII, ésta sigue siendo menor a la del medio externo (33,98 p. 1000 ; Carrero, 1968). Otras posibilidades, como por ejemplo digestión microbiana de la cápsula no han sido investigadas, pero parecen poco probables.

Conclusiones

Existen dos fracciones protéicas como componentes constantes del líquido intracapsular, que provendrían en parte de la disolución de la membrana más interna de la cápsula. La incorporación de proteína del líquido intracapsular por los embriones se hace más significativa en dos momentos importantes : crecimiento sin conchilla y calcificación de ésta.

La disolución de la pared capsular en un sitio predeterminado se produciría cuando los cambios que se operan en el estadio previo a la

eclosión (VII), en el líquido intracapsular, permitiesen la acción de una ó más enzimas, no existiendo acción mecánica ni osmótica involucradas.

Agradecemos al Dr. Karl M. Wilbur de la Universidad de Duke la lectura del manuscrito y sus múltiples sugerencias.

Summary

Some aspects on the variation of intra-capsular liquid total free protein and aminoacids, related to embryonary development in *Adelomelon brasiliana* (Lamarck, 1811) (Gastropoda, Prosobranchia, Volutidae).

The spawn of *Adelomelon brasiliana* (Gastropoda, volutidae) consists on few eggs contained in a great size, ovoid shape capsule. The mean volume is 77 ml and the number of embryos per capsule varies from 9 to 33 (mean 22). Those embryos have a direct development, feeding on dissolved extra-vitelline substances.

The protein composition of the intra-capsular liquid is uniform in all stages of the embryos development, with two constant bands in the electrophoresis strips. The proteins and free aminoacids concentration varies with the different stages. Among the aminoacids we found glutamic, aspartic and phenylalanine as constant components.

The changes observed in the pre-hatching stage suggests that the capsule's opening is essentially a chemical process.

Resumen

La puesta de *Adelomelon brasiliana* consiste en unos pocos huevos encerrados en una ovicápsula de considerable tamaño, de forma ovoide. El volumen de cada cápsula es, en promedio, de 77 ml y contiene entre 9 y 33 embriones (con una media de 22). Estos embriones completan su total desarrollo y metamorfosis dentro de la ovicápsula, alimentándose de sustancias extravitelinas disueltas en el líquido intracapsular.

La composición en proteínas del líquido intracapsular es uniforme a través de todos los estadios de desarrollo embrionario, con la presencia de dos bandas constantes en la corrida electroforética. Sin embargo la concentración de proteínas así como la de aminoácidos libres varían según las distintas etapas. Entre los aminoácidos se encuentran glutámico, aspártico y fenilalanina como componentes constantes. Los cambios que se observan en el desarrollo en el estadio previo a la eclosión indican que la apertura de la cápsula, que se produce en un sitio predeterminado, es esencialmente un proceso químico.

BIBLIOGRAFIA

- BAYNE, C.J., 1968. — Histochemical studies on the eggs capsules of eight gastropods molluscs. *Proc. Malac. Soc. London*, 38, pp. 199-212.
- CARRETO, J.I., 1968. — Variaciones de la biomasa fitoplanctónica en aguas costeras de Mar del Plata. *Carpas*, IV. Río de Janeiro.
- D'ASARO, CH. N., 1969. — The comparative embryogenesis and early organogenesis of *Bursa corrugata* Perry and *Distorsio clathrata* (Gastropoda. Prosobranchia). *Malacología* 9 (2), pp. 349-389.
- DAVIDSON, J.N. y LESLIE, I., 1950. — A new approach in the biochemistry of growth and development. *Nature* 165, pp. 49-53.
- DAVIS, CH. c., 1967. — Emergence of veliger larvae from eggs in gelatinous masses laid by some jamaican marine gastropods. *Malacologia* 5(2), pp. 299-309.
- DAVIS, CH. C., 1968. — Mechanisms of hatching in aquatic invertebrate eggs. *Ocean. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 6, pp. 325-376.
- GORNALL, A.G, BARDAWILL, CH.J. and DAVID, M.M., 1949. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, pp. 751-766.

- HAMMEN, C.S. y K.M. WILBUR, 1959. — Carbon dioxide fixation in marine invertebrates. I. The main pathway in the oyster. *J. Biol. Chem.* 234, pp. 1268-1271.
- KOBAYASHI, S., 1969. — Studies on shell formations. A study of the proteins of the extrapallial fluid in some molluscan species. *Biol. Bull.* 126 (3), pp. 414-422.
- LEE, Y.p. y T. TAKAHASHI, 1966. — An improved colorimetric determination of aminoacids with the use of ninhydrin. *Annal. Biochem.* 14, pp. 71-77.
- LYNCH, M.p. y L. WOOD, 1966. — Effects of environmental salinity on free aminoacids of *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 19, pp. 773-790.
- MEENAKSHI, V.R., P.E. HARE, N. WATABE y K.M. WILBUR, 1969. — The chemical composition of the periostracum of the molluscan shell. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29, pp. 611-620.
- RANGARAO, K., 1963. — The composition of egg capsules of the pulmonate snail *Atriophanta ligulata*. *Curr. Sci.* 32, pp. 213-214.
- RANGARAO, K., 1963. — The polysaccharids of the reproductive system of the land snail *Atriophanta ligulata* in the formation of egg capsules. *J. Ann. Morph. Physiol.* 10, pp. 158-163.
- STAHL, E., 1965. — Thin layer Chromatography. Academic Press, London, pp. 395-409.
- WILBUR, K.M., 1960. — Shell structure and mineralization in molluscs. Calcification in Biological Systems. *Am. Ass. Adv. Sci.* Washington D.C. (R.F. Sognaes, ed.), pp. 15-40.
- WILBUR, K.M. y NWATABE, 1963. — Experimental studies on calcification in molluscs and the alga *Coccolithus huxlegi*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 109, pp. 82-112.
- WILBUR, K.M. y CM. YONGE, 1964. — Physiology of Molluscs. Vol. I.; Academic Press. London, 473 pp.
- WOODS, L. y WEBB, 1966. — Determination of free aminoacid in oceanic and estuarine waters. 2nd. *Inst. Ocean. Congr.*, Moscow, pp. 397-398.