

TOXINA TETÂNICA: PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA INDUSTRIAL

Fernando FRATELLI*
Sally Müller Affonso PRADO*
Mary Dalva Caparroz VANCETTO*
José Marcos de OLIVEIRA*
Hisako Gondo HIGASHI**

RESUMO: A obtenção de toxina tetânica purificada em grandes volumes é um passo fundamental para a produção de Toxóide Tetânico. A utilização de vapor para a esterilização do meio de cultura para a produção desta toxina apresentava títulos baixos de toxina tetânica. O emprego da filtração convencional teve como consequência índices insatisfatórios de pureza ($Lf/mgNP$) e de rendimento (%) do processo. Com o objetivo de encontrar soluções para estas etapas do processo produtivo, foi utilizada a esterilização por cartuchos para o meio de cultura e a filtração tangencial através de um sistema Prostak, associado à ultrafiltração molecular em 30Kd para a toxina tetânica. A nova metodologia trouxe aumentos significativos em pureza ($Lf/mgNP$) e em rendimento (%). A tecnologia empregada e a comparação dos resultados obtidos nos diferentes processos são apresentadas neste trabalho.

UNITERMOS: Filtração tangencial, esterilização, toxina tetânica, toxóide tetânico.

INTRODUÇÃO

O Instituto Butantan vem produzindo toxina tetânica em larga escala para a preparação de Toxóide Tetânico (TT) e vacinas associadas Diftérica-Tetânica adulto (dT), Diftérica-Tetânica infantil (DT) e Diftérica-Pertussis-Tetânica (DPT), como também para a imunização de eqüinos soroprodutores.

* Seção de Vacinas Anaeróbicas do Instituto Butantan

** Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1.500, CEP 05503-900 — São Paulo, SP — Brasil.
Recebido para publicação em 27.04.93 e aceito em 16.06.93.

A metodologia convencionalmente utilizada baseava-se na obtenção de toxina tetânica por processo fermentativo de *Clostridium tetani* em meio de Müller modificado por Latham¹, esterilizado por vapor no próprio tanque de fermentação. Após o período de crescimento bacteriano, as células eram separadas por filtros de profundidade e a toxina concentrada por ultrafiltração molecular em cartuchos de 10.000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit), destoxicificada pela ação conjunta de formaldeído e calor e purificada por gel filtração.³

Com esta metodologia, o título da toxina bem como os índices de pureza e de rendimento não eram satisfatório, além de obrigar a um consumo de mão-de-obra relativamente elevado.

Face a esses resultados mencionados, foi desenvolvida uma metodologia produtiva de toxina tetânica mais adequada que, basicamente, consistiu em: substituir a esterilização a quente do meio de cultura por filtração, introdução de sistema tangencial de filtração para eliminação das células bacterianas e, concentração da toxina por ultrafiltração em membrana de 30.000 NMWL.

O objetivo deste trabalho é de relatar detalhadamente as técnicas utilizadas e demonstrar, comparativamente, os resultados que podem ser obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de toxina tetânica: lotes semanais de 360 litros em fermentador "Bilthoven — Unit System — Tetano Paljas" empregando o meio de cultura Müller modificado por Latham¹ e a cepa *Clostridium tetani* Harvard. Tempo de incubação de 5 dias com temperatura de crescimento de 35°C e pH 7,0.

Processos de esterilização do meio de cultura:

Esterilização convencional: o meio de cultura era preparado no tanque do fermentador, esterilizado por vapor a 118°C/35min. e resfriado com água corrente até a temperatura de 36°C para posterior inoculação.

Esterilização por filtração: o meio de cultura era preparado em um tanque auxiliar e pressurizado para filtração através de cartuchos clarificante e esterilizante da Millipore, catálogo nº CP03 01 TP3 e CVGL 03 TP3, respectivamente. Este meio era recolhido no tanque do fermentador previamente esterilizado (vazio) com vapor e procedia-se então à semeadura.

Processos de filtração da toxina tetânica:

Filtração convencional: a toxina tetânica era separada da massa bacteriana através do sistema de filtração CUNO, contendo 3 cartuchos clarificantes (Zeta-Plus ZP 30S) e 3 cartuchos esterilizantes (Zeta-Plus ZP 90S), todos de 12 polegadas. A toxina tetânica era em seguida recolhida em um tanque de 300 litros para ser concentrada simultaneamente em cartuchos de 10.000 NMWL. Após a filtração, os cartuchos eram esterilizados por vapor a 120°C/60 min. e, desprezados (Fig. 1).

Filtração tangencial: utilização de sistema Prostak Millipore Process System PSK 1MF — MSP005172, 67120 Molsheim-France, de 4,65m² de área filtrante, com módulos de 0,22μm, interligado ao fermentador. A suspensão de células (360 litros) era concentrada no equipamento mencionado até um volume de 20 litros. Esta massa celular era lavada 5 vezes com porções de 25 litros de solução fisiológica 0,85%. O filtrado, ou seja, a toxina tetânica era recolhida em um tanque intermediário para concentração por ultrafiltração molecular. Utilizávamos neste

processo, cartuchos de 10.000 NMWL que posteriormente foram substituídos por outros de 30.000 NMWL.

Após a lavagem da massa celular, o sistema Prostak era drenado e lavado com 3 porções de 25 litros de solução fisiológica 0,85% para a remoção de resíduos de células do sistema.

Todo o material contaminado, após a sua drenagem, era acondicionado em recipientes de 40 litros e esterilizado por autoclavagem a 120°C/90 min.

O sistema Prostak era desinfectado com 50 litros de solução de hipoclorito de sódio (1.000 ppm) durante 60 min. à temperatura ambiente. Após a desinfecção e limpeza do sistema, o hipoclorito de sódio era removido com aproximadamente 400 litros de água destilada.

A limpeza efetiva das membranas era comprovada através de medição do "clean water flux" ("fluxo com água limpa"), restabelecendo-se o fluxo antes de cada processo por passagem de água limpa, até que o mesmo tenha a vazão normal (35,5 litros/m²/hora).

A integridade das membranas era comprovada após cada processo através de testes indicados pelo fabricante.

Após os processos de filtração descritos acima, o tanque de fermentação era esterilizado à 120°C/45min. para permitir segurança na limpeza e preparo do mesmo para o próximo lote do processo de produção (Fig. 2).

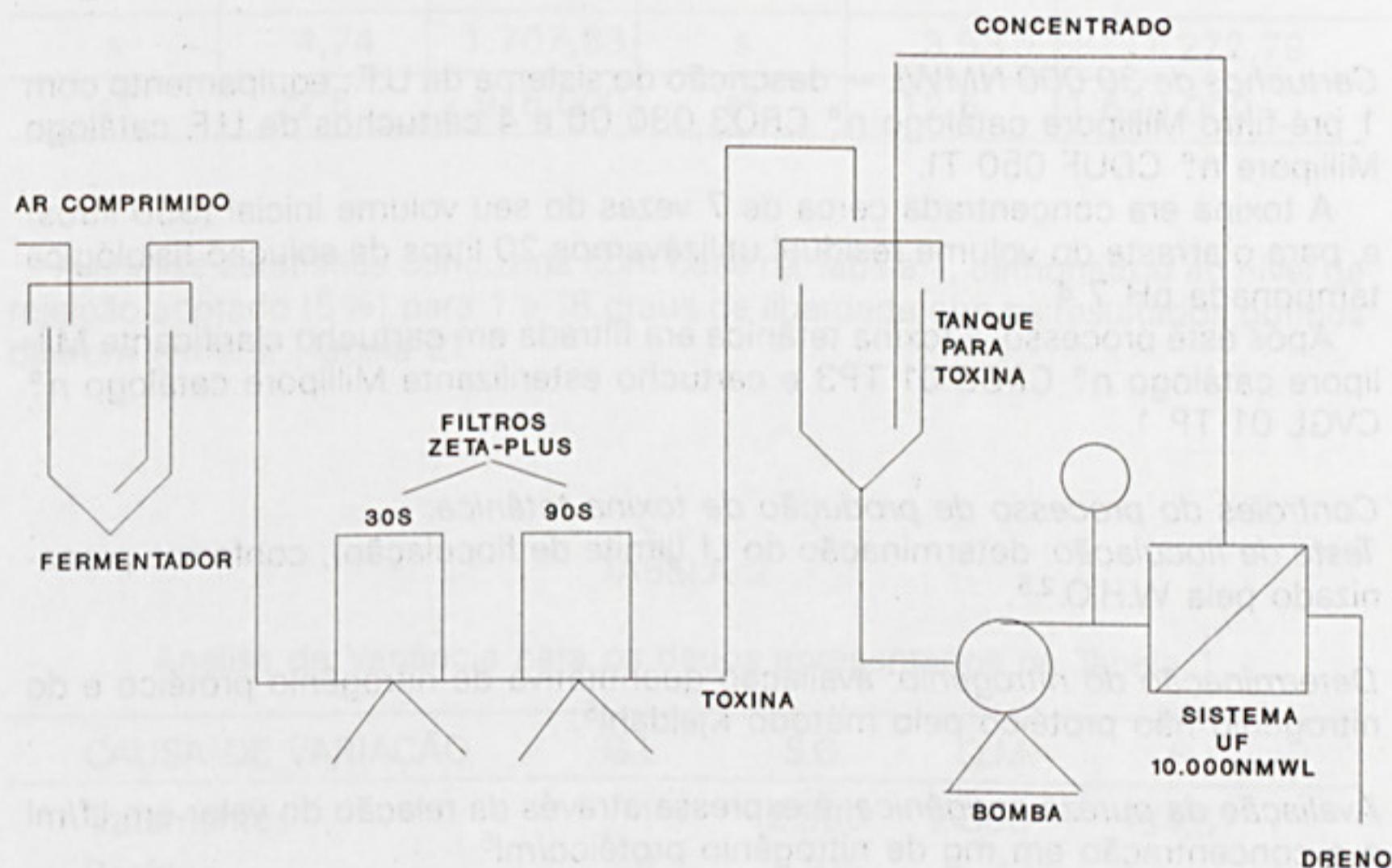


FIG. 1: Fluxograma do sistema de filtragem convencional

Processos de concentração da toxina tetânica por ultrafiltração molecular (U.F.): Cartuchos de 10.000 NMWL — descrição do sistema de U.F.: equipado com 1 pré-filtro Millipore catálogo nº CDPR 012 F4 e 3 cartuchos de U.F. Millipore catálogo CDUF 050 G1.

A toxina tetânica era concentrada cerca de 10 vezes ao seu volume inicial (350 litros) e para o arraste do volume residual utilizávamos 20 litros de água destilada.

Após este processo, a toxina era filtrada em cartuchos clarificantes Millipore catálogo nº CP19 01 12 W3, CP06 01 TP3 e CPO3 01 TP3 e em um cartucho esterilizante Millipore catálogo nº CVGL 01 TP1.

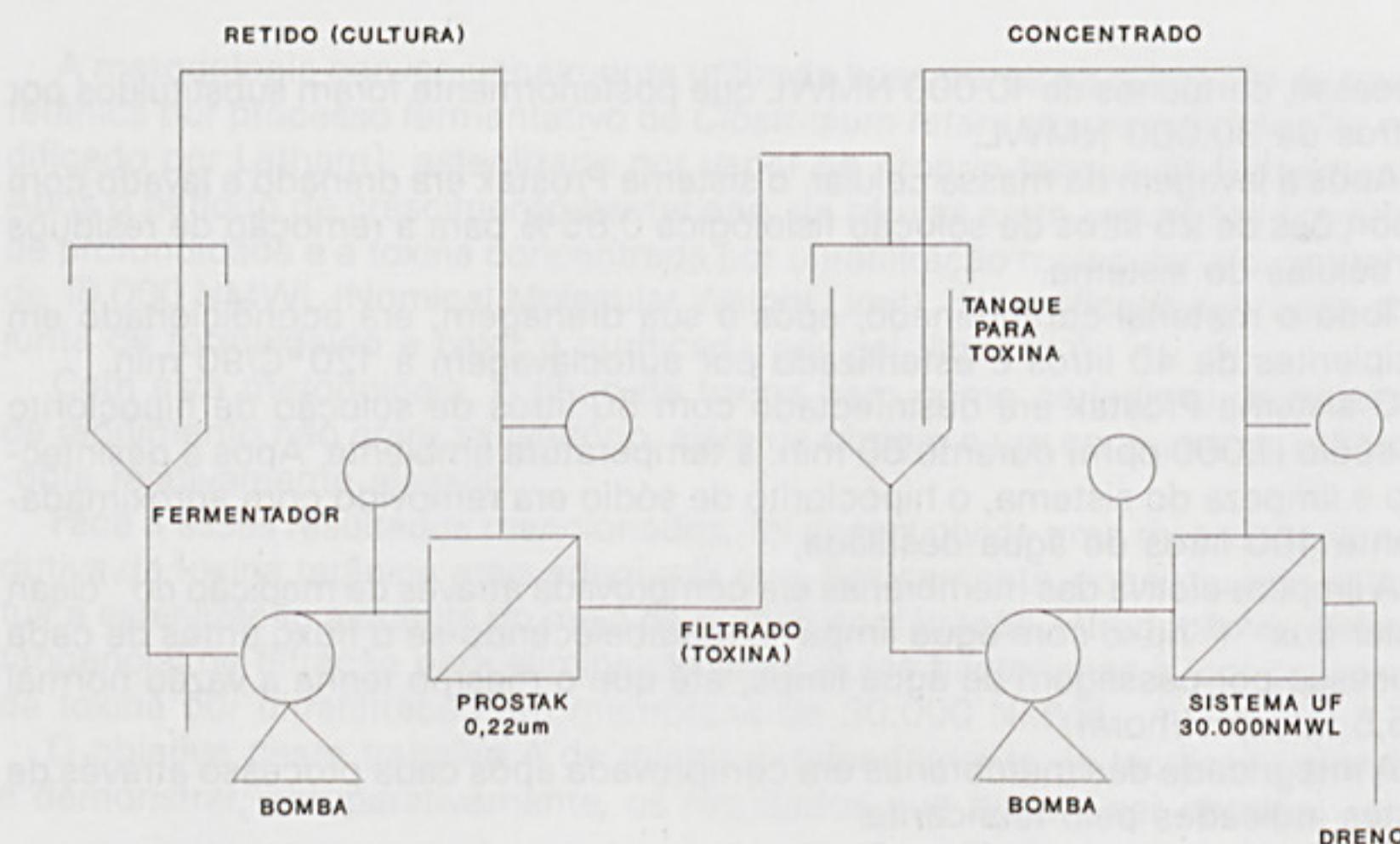


FIG. 2: Fluxograma do sistema de filtração tangencial

Cartuchos de 30.000 NMWL — descrição do sistema de U.F.: equipamento com 1 pré-filtro Millipore catálogo nº CRO3 030 06 e 4 cartuchos de U.F. catálogo Millipore nº CDUF 050 T1.

A toxina era concentrada cerca de 7 vezes do seu volume inicial (350 litros) e, para o arraste do volume residual utilizávamos 20 litros de solução fisiológica tamponada pH 7,4.

Após este processo, a toxina tetânica era filtrada em cartucho clarificante Millipore catálogo nº CPO3 01 TP3 e cartucho esterilizante Millipore catálogo nº CVGL 01 TP 1.

Controles do processo de produção de toxina tetânica:

Teste de floculação: determinação do Lf (limite de floculação), conforme preconizado pela W.H.O.^{2,5}.

Determinação do nitrogênio: avaliação quantitativa de nitrogênio protéico e do nitrogênio não protéico pelo método Kjeldahl⁵.

Avaliação da pureza antigênica: é expressa através da relação do valor em Lf/ml e a concentração em mg de nitrogênio protéico/ml⁵.

Análise estatística: conduzida através da Análise de Variância seguida pela aplicação do teste "F"⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de esterilização do meio de cultura Latham-Müeller¹, por filtração em cartuchos, apresentou resultados em média de 52,5 Lf/ml contra os 28,5 Lf/ml obtidos quando o mesmo meio era esterilizado por vapor à 118°C/35 min. (Tabela 1).

FRATELLI, F., PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., OLIVEIRA, J.M. de, HIGASHI, H.G. Toxina tetânica: produção e purificação em escala industrial. *Bol. Biotecnol.*, v.4, p. 19-29, 1993.

TABELA 1

Valores de limite floculante (Lf) de toxina tetânica segundo a utilização de vapor ou cartucho para esterilização do meio de cultura Latham — Müller

VAPOR 118 °C/35 min.			FILTRAÇÃO EM CARTUCHOS ESTERILIZANTES		
Nº LOTE TOX.TET.	Lf/ml INICIAL	Lf INICIAL $\times 10^{-3}$	Nº LOTE TOX.TET.	Lf/ml INICIAL	Lf INICIAL $\times 10^{-3}$
91/44	35	12.600	92/23	50	18.000
91/45	30	10.800	92/24	50	18.000
91/46	25	9.000	92/25	50	18.000
91/47	30	10.800	92/26	55	19.800
91/48	35	12.600	92/27	55	19.800
92/02	20	7.200	92/37	60	21.600
92/09	25	9.000	92/38	50	18.000
92/11	30	10.800	92/41	55	19.800
92/15	30	10.800	92/42	50	18.000
92/22	25	9.000	92/43	50	18.000
\bar{x}	28,5	10.260	\bar{x}	52,5	18.900
s	4,74	1.707,63	s	3,53	1.272,79
s^2	22,5	2.916.000	s^2	12,5	1.620.000

A análise estatística conduzida com base na Tabela 1, demonstrou ao nível de rejeição adotado (5%) para 1 e 18 graus de liberdade que os resultados obtidos diferem entre si (Tabela 2).

TABELA 2

Análise de Variância para os dados apresentados na Tabela 1

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	2.880	2.880	164,57
Resíduo	18	315	17,5	
Total	19	3.195		

A diferença dos resultados obtidos quanto às metodologias empregadas para a esterilização do meio Latham-Müller é demonstrada na Fig. 3.

O processo de produção de toxina tetânica em nosso laboratório, que consumia no mínimo 8 horas ininterruptas nos processos de filtração e concentração deste produto, apresentava também resultados inferiores como: rendimento médio de 59,21% e pureza a níveis médios de 537,57 Lf/mgNP (Tabela 3).

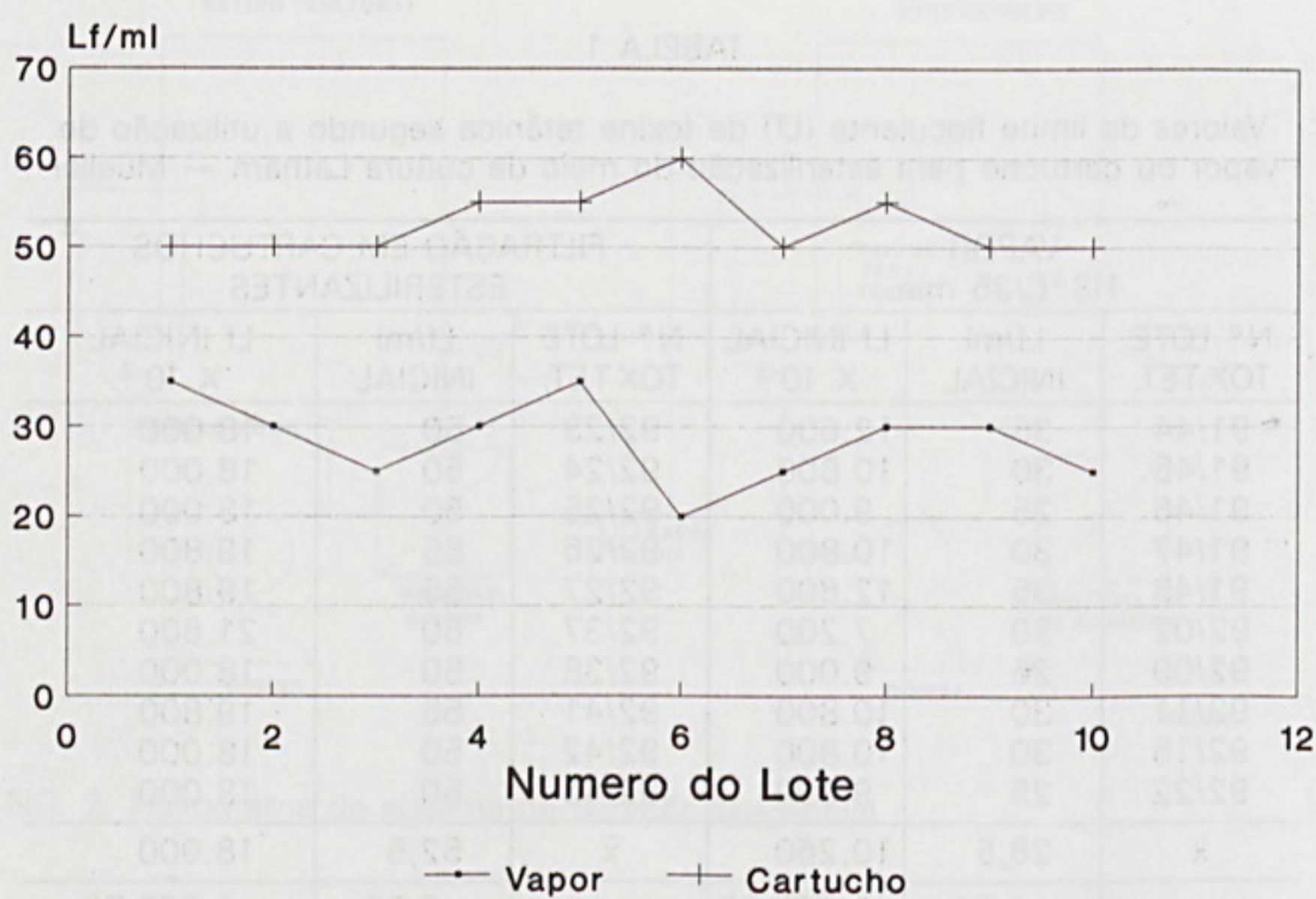


FIG. 3: Processos de esterilização do meio de Müller mod. por Latham

TABELA 3

Valores de rendimento (%) e pureza (Lf/mgNP) de toxina tetânica segundo a utilização de filtração convencional e ultrafiltração molecular com cartuchos de 10.000 NMWL

Nº LOTE TOX.TET.	Lf TOTAL INICIAL $\times 10^{-3}$	FILTRAÇÃO CONVENCIONAL		ULTRAFILTRAÇÃO MOLECULAR		PUREZA Lf/mgNP	PROCESSO TOTAL RENDIMENTO %
		Lf TOTAL $\times 10^{-3}$	RENDIMENTO %	Lf TOTAL $\times 10^{-3}$	RENDIMENTO %		
90/22	10.080	7.000	69,4	5.700	81,4	555,5	50,9
90/31	14.400	10.500	72,9	8.648	82,4	529,4	55,3
90/41	14.400	12.250	85,1	11.000	89,8	389,6	74,9
90/46	10.800	8.750	81	7.600	86,8	197,7	67,8
91/32	10.800	7.000	64,8	6.580	94	736,8	58,8
91/34	14.400	10.500	72,9	9.072	86,4	578,9	59,3
91/35	10.800	8.750	81	7.452	85,2	828	66,2
91/36	9.000	5.250	58,3	5.040	96	233,3	54,3
91/46	9.000	5.250	58,3	4.752	90,5	521	48,8
92/03	14.400	10.500	72,9	8.700	82,9	805,5	55,8
\bar{x}	11.808	8.575	71,66	7.454,4	87,54	537,57	59,21
s	2.325,65	2.398,06	9,24	1.976,53	4,95	218,12	8,15
s^2	5.408.640	5.750.694,4	85,43	3.906.678	24,46	47.576,29	66,38

A introdução do sistema Prostak para filtração tangencial da toxina tetânica associado à U.F. com cartuchos de 10.000 NMWL elevou a média de rendimento para 84,39% incrementando também os índices de pureza que alcançaram uma média de 777,38 Lf/mgNP (Tabela 4).

TABELA 4

Valores de rendimento (%) e pureza (Lf/mgNP) de toxina tetânica segundo a utilização de filtração tangencial e ultrafiltração molecular com cartuchos de 10.000 NMWL

Nº LOTE TOX.TET.	Lf TOTAL INICIAL $\times 10^{-3}$	FILTRAÇÃO TANGENCIAL	ULTRAFILTRAÇÃO MOLECULAR	PROCESSO TOTAL	
		Lf FINAL $\times 10^{-3}$	Lf TOTAL $\times 10^{-3}$	RENDIMENTO %	PUREZA Lf/mgNP
92/06	14.400	14.400	12.300	84,4	1266
92/07	12.600	5.400	4.500	85,7	833,3
92/09	9.000	9.000	6.900	78,8	547,6
92/11	10.800	10.800	10.500	97,2	530,3
92/13	12.600	10.800	10.200	80,9	944,4
92/21	12.600	10.800	10.880	86,3	888
92/22	9.000	9.000	7.680	85,3	960
92/24	18.000	16.200	14.190	78,8	895,8
92/25	18.000	18.000	15.600	86,7	525,2
92/26	19.800	18.000	15.600	78,8	382,3
\bar{x}	13.680	12.240	10.835	84,39	777,38
s	3.813,66	4.225,64	3.725,30	5,60	271,44
s^2	14.544.000	17.856.000	13.877.850	31,4	73.679,18

As tabelas 5 e 6 demonstram os resultados de Análise de Variância para os itens rendimento (%) e pureza (Lf/mgNP), respectivamente, dos processos de filtração convencional e tangencial, quando associados a ultrafiltração molecular com cartuchos de 10.000 NMWL, comprovando, estatisticamente, que os resultados diferem entre si significativamente.

TABELA 5

Análise de Variância para os dados referentes à rendimento (%) para os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	810,26	810,26	13,87
Resíduo	18	1.051,44	58,41	
Total	19	1.861,7		

TABELA 6

Análise de Variância para os dados referentes à pureza (Lf/mgNP) para os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4.

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	287.544,1	287.544,1	4,74
Resíduo	18	1.091.299,33	60.627,73	
Total	19	1.378.843,43		

A utilização do sistema Prostak no processo de filtração da toxina tetânica quando a mesma era concentrada com cartuchos de 30.000 NMWL, apresentou um rendimento médio de 90,62% (Tabela 7), resultado estatisticamente semelhante ao encontrado quando utilizamos cartuchos de 10.000 NMWL (Tabela 8), como se observa na Fig. 4. O tempo total consumido nesta etapa de produção é de 2 horas.

TABELA 7

Valores de rendimento (%) e pureza (Lf/mgNP) de toxina tetânica segundo a utilização de filtração tangencial e ultrafiltração molecular com cartuchos de 30.000 NMWL

Nº LOTE TOX. TET.	Lf TOTAL INICIAL $\times 10^{-3}$	FILTRAÇÃO TANGENCIAL Lf FINAL $\times 10^{-3}$	ULTRAFILTRAÇÃO MOLECULAR Lf TOTAL $\times 10^{-3}$	PROCESSO TOTAL	
				RENDIMENTO %	PUREZA Lf/mgNP
92/36	10.800	10.800	13.035	120,7	1.208,3
92/37	21.600	19.800	16.640	77	2.363,6
92/38	18.000	14.400	17.100	95	2.400
92/39	10.800	9.000	9.450	87,5	1.333,3
92/40	10.800	10.800	9.900	91,7	1.375
92/41	19.800	16.200	18.400	92,9	1.111,1
92/42	18.000	12.600	14.850	82,5	1.222,2
92/43	18.000	12.600	14.400	80	1.185,2
92/44	16.200	12.600	14.400	88,9	969,7
92/46	7.200	5.400	6.300	90	1.750
\bar{x}	15.120	12.420	13.447,5	90,62	1.491,84
s	4.814,98	3.929,89	3.824,82	12,05	511,52
s^2	23.184.000	15.444.000	14.629.251	145,29	261.652,78

TABELA 8

Análise de Variância para os dados referentes a rendimento (%) para os dados apresentados nas Tabelas 4 e 7

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	194,06	194,06	2,19
Resíduo	18	1.590,23	88,34	
Total	19	1.784,29		

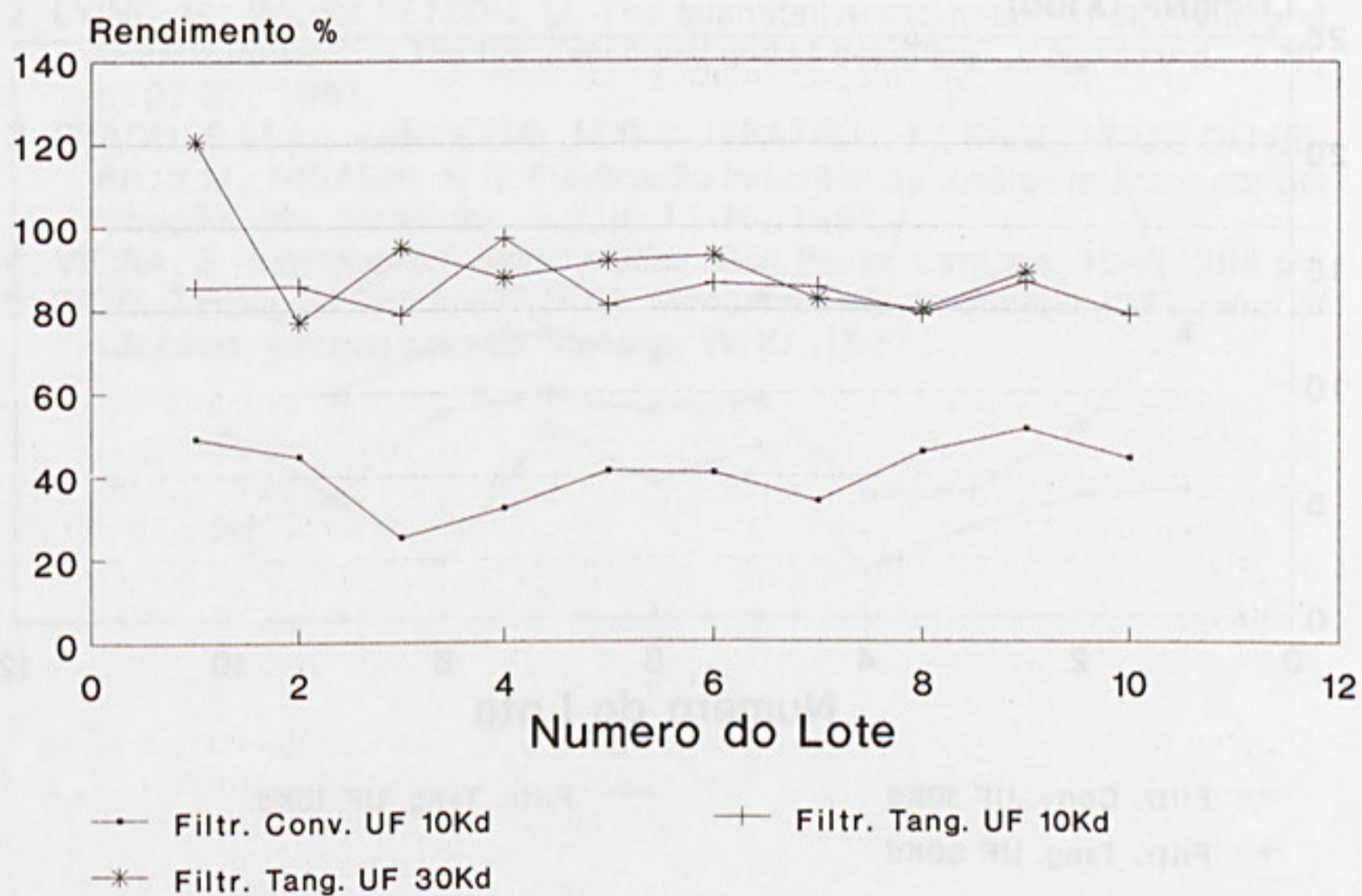


FIG. 4: Índices de Rendimento (%) dos diferentes processos de filtração

Todavia, observa-se estatisticamente que os índices de pureza ($L_f/mgNP$) obtidos quando utilizamos cartuchos de ultrafiltração molecular de 10.000 e 30.000 NMWL, ou seja, 777,38 e 1.491,84 $L_f/mgNP$ (Tabelas 4 e 7) têm valores de F significantes para o nível de rejeição adotado (5%) e para 1 e 18 graus de liberdade (Tabela 9).

TABELA 9

Análise de Variância para os dados referentes à pureza ($L_f/mgNP$) para os dados apresentados nas Tabelas 4 e 7

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	25.698.309,41	25.698.309,41	153,27
Resíduo	18	3.017.980	167.665,53	
Total	19	28.716.297,13		

A Fig. 5 evidencia que os melhores resultados quanto ao grau de pureza ($L_f/mgNP$) foram obtidos quando a toxina foi filtrada pelo sistema de filtração tangencial Prostak e posteriormente concentrada por ultrafiltração molecular com cartuchos de 30.000 NMWL.

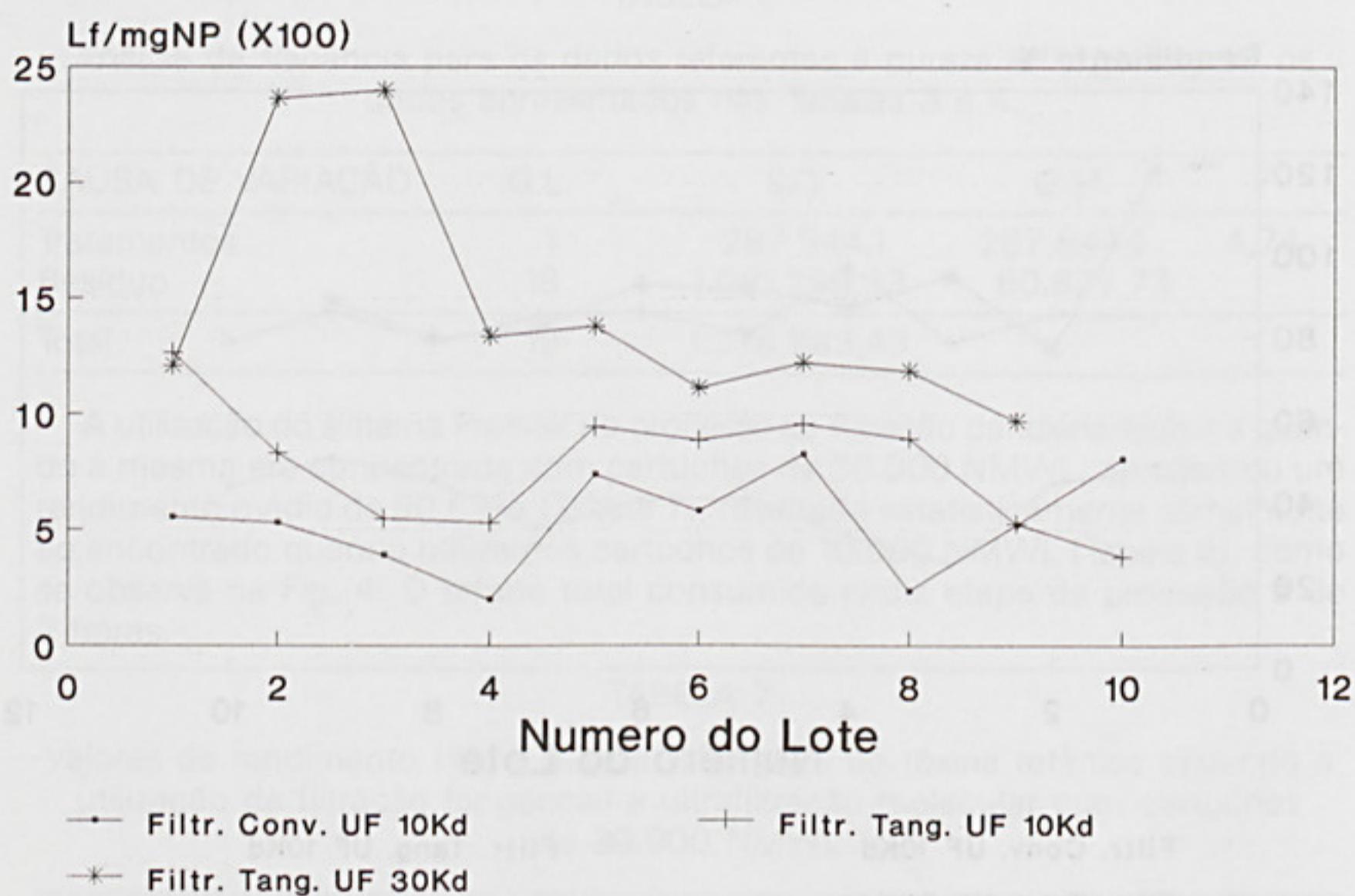


FIG. 5: Índices de Pureza (Lf/mgNP) — Filtração Tangencial

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rosalvo Guidolin pela leitura crítica do texto e sugestões. À Millipore Ind. e Com. Ltda. pelo suporte técnico, e aos funcionários da Seção de Vacinas Anaeróbicas pela colaboração no decorrer do desenvolvimento do presente trabalho.

ABSTRACT: The obtention of a large scale volumes of purified Tetanus Toxin is a fundamental step in order to produce Tetanus Toxoid for human use. It has been shown that the culture medium sterilized by steam under pressure provided insatisfactory results of purity degrees (Lf/mgPN) and percentage yields (%). In order to solve these two problems in production, the culture medium was sterilized by drawing it through a inert membrane cartridge and the final toxin filtered in a Prostak system, connected to a 30Kd molecular ultrafiltration equipment. The new methodology applied had the merit to increase significantly the purity (Lf/mgPN) and the yields (%). This paper presents the tecnology employed and the comparisom of results obtained in the different process studied.

KEYWORDS: Tangencial filtration, esterilization, tetanus toxins, tetanus toxoids.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LATHAM, W.C., BENT, B.F., LEVINE, L. Tetanus toxin production in the absence of protein. *Appl. Microbiol.*, v. 10, p. 146-152, 1962.

FRATELLI, F., PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., OLIVEIRA, J.M. de, HIGASHI, H.G. Toxina tetânica: produção e purificação em escala industrial. *Bol. Biotecnol.*, v.4, p. 19-29, 1993.

2. LYING, G., WEISS BETZON, M. The quantitative estimation of diphtheria and tetanus toxins: I — The flocculation test and Lf-definition. *J. Biol. Stand.*, v. 15, p. 27-37, 1987.
3. PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., PRAL, M.M., OLIVEIRA, J.M., HIGASHI, H.G. Purificação industrial de toxóide tetânico por gel filtração. *Bol. Biotecnol.*, v.3, p. 11-16, 1992.
4. VIEIRA, S. *Introdução à bioestatística*. São Paulo: Campus, 1988. 294 p.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Manual for the production and control of vaccines: tetanus toxoids*. Geneva: WHO, 1977.

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Volume 55, 1993

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX
VOL. 55

ABDALLA, F.M.F.	77,81
ALBAS, A.	71
ANDREONI, A.S.S.	75
ANTONIO, L.C.	80
ASSAKURA, M.T.	71
BALDASSI, L.	59
BARBARO, K.C.	72
BARBI, G.	83
BARBOSA, M.L.	59
BATISTA, M.B.C.	75
B.I.A.S.G.	78,79,85
BIOZZI, G.	77
BRANDI, C.M.W.	76
BRENO, M.C.	72
BRONDUM-NIELSEN, K.	83
BROWN, W.T.	83
BRUNONI, D.	80
CABRERA, W.H.K.	77,81
CALIL, E.M.B.	59
CAMPOS, M.M.C.	75
CAMPOS, V.A.F.P. de	19
CARDOSO, J.L.C.	72,76
CARICATI, C.P.	9
CARMONA, E.	80,83
CARNEIRO, S.M.	73
CARPENTER, N.J.	83
CASTRO, N.H.C.	82
CHAGURI, L.	27,53
CHUDLEY, A.E.	83
CORBANI, M.	80
COSTA, E.M.	80
COSTA ROSA, L.F.B.P.	73
COUDERC, J.	81
CURI, R.	73
CURY, Y.	73,74
DAIMON, T.	82
DAMY, S.B.	27,53,74
DECREEUSEFOND, C.	77
DIAS DA SILVA, W.D.	9,79,85
DORCE, V.A.C.	5,74
DOS-SANTOS, M.C.	74
EICHMANN, K.	79
EICKSTEDT, V.R.D. von	19,72
ENTRES, M.	19
FAN, H.W.	85
FARIAS, E.C.	33
FERRAZ, O.P.	82,83
FERREIRA, L.A.F.	75
FERREIRA, M.L.	76
FERREIRA, P.	83
FERREIRA, V.R.F.	41
FORTES-DIAS, C.L.	74

FRANÇA, F.O.S.	76,78
FRANCINI, F.	11
FRANCO, M. de	77
FRATELLI, F.	3,19,82
FRAZATTI GALLINA, N.M.	71
FURTADO, M. de F.	71,74
GERVITZ, R.K.	76
GHIURO VALENTINI, E.J.	71
GIOIELLI, M.L.R.	82
GOLLOP, T.R.	82
GONÇALVES, L.R.C.	74
GRISOLIA, C.S.	11
GUIDOLIN, R.	9
GUSTAVSON, K-H.	83
GUTIÉRREZ, J.M.	74
HABERMEHL, G.G.	75
HALLIDAY, J.	83
HANDAR, Z.	19
HAY, C.R.M.	78
HENRIQUES, O.B.	75
HENRIQUES, S.B.	85
HIGASHI, H.G.	3,9,19,85
HIPÓLITO, M.	59
HIRAICHI, E.	77,81
HO, P.L.	77
HOCKEY, A.	83
HOWARD-PEEBLES, P.N.	83
IBANEZ, O.M.	77,81
ISHII, H.	78
JANEIRO - CINQUINI, T.R.F.	33
JENKINS, E.	83
JORGE, M.T.	19,78
JULIANO, L.	80
KAHKONEN, M.	83
KAMIGUTI, A.S.	78,80
KENNERKNECHT, I.	83
KISIELIUS, J.J.	73
KNOLSAISEN, J.F.	19
KUHN, L.	79
LADAIQUE, P.	83
LAING, G.D.	79
LANGLADA, F.G. de	41
LEBRUN, I.	75
LEDERMAN, H.M.	80
LEFKOVITS, I.	79
LEINZ, F.F.	33
LEISTI, J.	83
LEITE, R.P.	79
LUCCHIARI, M.A.	74,79
MACEDO, M.S.	84
MADDALENA, A.	83
MANDELBAUM, F.R.	71
MARUYAMA, M.	80
MASSA, S.	77
MATHIAS, S. de J.D.	3

MATTEI, J.F.	83
MATTINA, T.	83
MAVRIDIS, S.C.	59
MAZURCZAK, T.	83
MCKINLEY, M.J.	83
MEIRELLES, M.N.L.	80
MELARAGNO, M.I.	80
MENDES, I.F.	85
MENDONÇA, R.M.Z.	71
MENDONÇA, R.Z.	13
MIHARA, H.	80
MIYAKI, C.	85
MODOLELL, M.	79
MONTEIRO, S.H.C.	76
MORAES, V.L.G. de	75
MORAIS, J.F.	9
MOTA, I.	72,76,84
MOULIN, A.A.P.	59
MOURA-DA-SILVA, A.M.	76
MOURÃO FUCHES, R.M.	71
MOUTON, D.	77,81
MURPHY, P.	83
MURTA, A.C.M.	80
MUSTACCHI, Z.	80,82
OLIVEIRA, E.P. de	81
OLIVEIRA, J.M. de	3
OOST, B.A. von	83
PAGNAN, N.A.B.	82
PALERMO-NETO, J.	74
PATRÍCIO, F.R. da S.	80
PELLISSIER, M.C.	83
PELUSO, F.O.	11
PEREIRA, C.A.	13,74,79
PETRICEVICH, V.L.	41
PICARELLI, Z.P.	72,76,77,81,83,86
PRADO, S.M.A.	3,19
PREZOTO, B.C.	75,81
PUORTO, G.	71
PURVIS-SMITH, S.	83
RAW, I.	77
REIS, M.H.	81
RIBEIRO, L.A.	19,78
RIBEIRO, O.G.	77,81
RIZZO, E. de	85
ROBINSON, H.	83
ROCHA DA SILVA, A.P.	27
RODRIGUES, M.T.A.	82
RODRIGUES, U.P.	27,53
RUBIO, G.B.G.	19
RUGMAN, F.P.	78
SAFI, D.A.	73
SAITO, T.	82
SALOMÃO, L.C.	86
SALOMÃO, M.G.	71
SANDOVAL, M.R.L.	5,74

SANO-MARTINS, I.S.	82
SANT'ANNA, O.A.	74,77
SANTOS, R. de C.S. dos	80,82
SCAPAGNINI, U.	83
SCHAAP, T.	83
SCHARFSTEIN, J.	80
SCHIRIPA, L.N.	77,83
SELIGMAN, R	65
SESSO, A.	73
SHAPIRO, L.R.	83
SHERMAN, S.L.	83
SILVA, S.G.	80
SILVEIRA, P.F.	83
SIQUEIRA, M.	77,81
SMITS, A.P.T.	83
SOARES, M.F.M.	84
SOGORB S., F	27,53
SOUSA, M. de	41
STANCHI, N.O.	11
STEINBACH, P.	83
STIFFEL, C.	77
SUGIKI, M.	80
TANAKA, H.	73
TANISAKI, M.M.	81
THEAKSTON, R.D.G.	78,79,85
TIMENETSKY, J.	85
TOMY, S.C.	80
TURNER, G.	83
UCHIDA, I.A.	83
VANCETTO, M.D.C	3,19
VASSÃO, R.C.	74
VIEIRA, E.G.J.	85
VITAL, G.R.F.	75
VOELCKEL, M.A.	83
WALTER-MOURA, J.	82
WARD, S.A.	85
WARRELL, D.A.	79,85
WEAVER, D.D.	83
WEBB, T.	83
WOE FANG, F.L.	71
YAMAGUSHI, I.K.	9
YAMANOUYE, N	77,86
ZELNIK, R.	75

CONTEÚDO/CONTENTS Volume 55 1993

Nº 1

The envenomation by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat: age and sex influence.

Efeitos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*: influência do sexo e da idade.

Maria Regina L. SANDOVAL, Valquiria A.C. DORCE 5

Influencia de la temperatura sobre la digestión en *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae).

Influence of temperature on digestion in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae).

Flavia FRANCINI, Carlos S. GRISOLIA, Nestor O. STANCHI, Fabio O. PELUSO 11

Epidemiología do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* (Heinecken & Lowe) no Estado do Paraná (Brasil).

Accidents by spiders of the genus *Loxosceles* (Heinecken & Lowe) in the Paraná state, Brazil: epidemiologic data.

Lindioneza A. RIBEIRO, Vera Regina D. von EICKSTEDT, Gisélia B.G. RUBIO, José F. KNOLSAISEN, Zuhrer HANDAR, Marlene ENTRES, Vera A. Fischer Pires de CAMPOS, Miguel Tanús JORGE 19

Diagnosis and treatment of acariasis in mice.

Diagnóstico e tratamento de acaríase em camundongos.

Fernando SOGORB S., Sueli Blanes DAMY, Ana Paula ROCHA DA SILVA, Ubimara Pereira RODRIGUES, Luziani CHAGURI 27

Ovarian cycle of the snake *Bothrops jararaca*.

Ciclo ovariano de serpentes *Bothrops jararaca*.

Thélia R.F. JANEIRO-CINQUINI, Frederico F. LEINZ, Eduardo C. FARIAS 33

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA 1

Otimização do processo de purificação industrial de toxoide tetânico por gel filtração.

Improvement in the industrial purification of tetanus toxoid by gel filtration.

Sally M.A. PRADO, Mary D.C. VANCETTO, José M. de OLIVEIRA, Fernando FRATELLI, Sandra de J.D. MATHIAS, Hisako G. HIGASHI 3

Esquema de hiperimunização eqüina mais conveniente à produção de plasma antiveneno Botrópico-Crotálico.

A more suitable equine hyperimmunization schedule for antivenom Bothrops-Crotalus plasma production.

Celso P. CARICATI, Rosalvo GUIDOLIN, Ivone K. YAMAGUSHI, Josefina F. MORAIS, Wilmar DIAS DA SILVA, Hisako G. HIGASHI 9

BHK cellgrowth on microcarriers in a bioreactor.

Crescimento de células BHK em microcarregadores utilizando bioreactores.

Ronaldo Z. MENDONÇA, Carlos A. PEREIRA 13

Nº 2

Criação de camundongos "nude".

Nude mice breeding.

V.L. PETRICEVICH, V.R.F. FERREIRA, M. de SOUSA, F.G. de LANGLADA

41

Efeitos comparados da suplementação alimentar em coelhos durante os períodos de lactação e crescimento.

Comparative effects of supplemented feeding in rabbits during lactation and growing periods.

F. SOGORB S., U.P. RODRIGUES, S.B. DAMY, L. CHAGURI

53

Estudo da microbiota aeróbica de serpentes *Bothrops* sp. (Serpentes, Viperidae), recém-capturadas.

Study of aerobic microbiota of recently captured snakes *Bothrops* sp. (Serpentes, Viperidae).

S.C. MAVRIDIS, M. HIPÓLITO, L. BALDASSI, A.A.P. MOULIN, E.M.B. CALIL, M.L. BARBOSA

59

Acidente por *Micrurus frontalis*: primeiro relato de envenenamento elapídico no Rio Grande do Sul.

Accident by *Micrurus frontalis*: the first description of an elapidic envenomation in Rio Grande do Sul.

R. SELIGMAN

65

COLETÂNEA DE RESUMOS DE TRABALHOS PUBLICADOS PELOS PESQUISADORES DO INSTITUTO BUTANTAN (1992)

71

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA

17

Toxina tetânica: produção e purificação em escala industrial.

Tetanus toxin: production and purification in large scale.

F. FRATELLI, S.M.A. PRADO, M.D.C. VANCETTO, H.G. HIGASHI

19

ÍNDICE do v. 55

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto:** título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto:** introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência:** resumos (em português e inglês); **unitermos:** palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês.
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.

Exemplos:

Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.

7. BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234 p.

Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.

8. MACHADO, J.C., SILVEIRA Fº, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. *Mem. Inst. Butantan*, v. 40/41, p. 1-9, 1976/77.

As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.

Exemplos:

...método derivado de simplificação de armadilha de Disney¹

...segundo vários autores^{2,3,4}

5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos, etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (em branco e preto).
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31x21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page:** with article title, name of author(s), professional address. **Text:** with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.

Examples:

Books:

7. BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234 p.

Articles:

8. MACHADO,J.C., SILVEIRA Fº, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. *Mem. Inst. Butantan*, v. 40/41, p. 1-9, 1976/77.

Citations in the text should be identified by the reference number.

Examples:

...método derivado de simplificação de armadilha de Disney¹

...segundo vários autores^{2,3,4}

5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure of photograph the name of the author(s) should be lightly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.

ISSN 0073 — 9901



IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
SÃO PAULO - BRASIL
1994



GOVERNO DE SÃO PAULO
CONSTRUINDO UM FUTURO MELHOR