

PRODUÇÃO DE ANATOXINA ESTAFILOCÓCICA PURIFICADA

Joana Akiko FURUTA*
Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA*
Sandra de Jesus Delgado MATIAS*
Hisako Gondo HIGASHI*

RESUMO: As toxinas produzidas pelas cepas de *S. aureus* Wood n° 3, C24 n° 6 e C24 n° 7, desenvolvidas conforme a técnica descrita, produziram anatoxinas que, submetidas à purificação e concentração com solução a 33% de sulfato de amônio, permitiram a obtenção de vacinas com elevada atividade imunogênica e baixos teores de impurezas.

UNITERMOS: *S. aureus*, toxinas, anatoxinas purificadas.

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus*, responsável por vários processos supurativos humanos, superficiais ou profundos e, estes, às vezes, de caráter grave e mesmo mortais, tem sido estudado por vários pesquisadores desde 1928, quando 12 de 21 crianças após terem sido injetadas com toxóide diftérico morreram em menos de 24 horas. Verificou-se que aquela mistura estava contaminada com *S. aureus* toxigênico (1). Este fato estimulou novas pesquisas de caráter antigênico e toxigênico do filtrado de culturas de *S. aureus*, e Dolman (2,3,4) demonstrou o valor do toxóide estafilocócico na terapia e profilaxia de infecções estafilocócicas. Gladstone e Glencross (5) verificaram que cepas selecionadas de *S. aureus*, em condições adequadas de cultivo, produzem a alfatoxina letal e fatores dermonecrotizantes e tetanizantes. Baseados nestes conhecimentos, os autores, no presente trabalho, demonstram a técnica de preparação e controle da Anatoxina Estafilocócica purificada, ainda utilizada no tratamento e prevenção de infecções estafilocócicas humanas, especialmente aquelas superficiais recidivantes.

* Serviço de Imunologia
Instituto Butantan — CP 65 — CEP 01051 — São Paulo-SP — Brasil
Recebido para publicação em 19.6.1991 e aceito em 30.8.1991

MATERIAL E MÉTODO

1 — Cepas estudadas

— Wood n° 3, C24 n° 6, e C24 n° 7, cedidas pela Seção de BCG do Instituto Butantan

2 — Características das cepas estudadas

2.1 — Verificação da pureza por semeadura em:

2.1.1 — Caldo glicosado 1% (9), incubados a 37°C durante 24 horas e exame microscópico de lâminas coradas pelo método de Gram

2.1.2 — Placa de ágar sangue, incubada a 37°C durante 24 horas e exame microscópico das colônias de halo de hemólise.

2.2 — Seleção das colônias:

2.2.1 — Por semeadura em ágar simples (9), as colônias adequadas devem apresentar, após 24 horas a 37°C: superfície convexa e lisa, com 1 a 3mm de diâmetro, bordas circulares e opacas.

2.2.2 — Pigmentação: colônias de *S. aureus* patogênico em ágar simples, após 24 a 48h à temperatura ambiente desenvolvem pigmento amarelo mais ou menos intenso, ao passo que os estafilocócicos saprófitas formam colônias brancas.

2.2.3 — Atividade hemolítica: amostras semeadas em ágar simples adicionado de 5 a 10% de sangue de carneiro, incubados a 37°C durante 24 horas, frequentemente determinam halo de hemólise de aproximadamente 10 a 30mm.

2.2.4 — Identificação perfuntória das cepas patogênicas: por semeadura em meio de Chapman-Stone (10) e incubação a 37°C, durante 24 a 48 horas, as cepas patogênicas produzem pigmento amarelo, fermentam a manita e hidrolisam a gelatina.

3 — Obtenção de alfatoxina e fatores:

Cada uma das amostras, após 24 horas de cultivo em caldo glicosado a 37°C, foi semeada em Caldo Martin (9) e Caldo soja (9) pela deposição de 8-10ml de inóculo em 180ml dos meios. O material foi incubado durante sete dias a 37°C em estufa apropriada com 20% de dióxido de carbono (CO₂).

3.1 — Provas

3.1.1 — Pureza: exame microscópico de lâminas coradas pelo Gram deve apresentar: cocos gram positivos com cerca de 1µm de diâmetro, dispostos isoladamente, aos pares ou, menos frequentemente, em cadeias.

3.1.2 — Titulação da toxina: uma alíquota de 5ml foi centrifugada durante 30 minutos a 3.000 rpm em centrífuga refrigerada 4°C. O pH sobrenadante foi corrigido a 6,8 — 7,0 com solução de HCl e filtrado em série (pré-filtro AP15 membranas inertes de 0,45 e 0,22µm), e testada como segue:

3.1.2.1 — Determinação da Dose Mínima Hemolítica: (DMH) (7,11). O material foi diluído em série em salina tamponada pH 7.2, na faixa de 1:500 a 1:8.546. Em cada tubo era colocado 1ml de cada diluição e adicionado 0,1ml de hemácias de coelho, a 10% (lavadas três vezes em salina tamponada). Os tubos, após 60 minutos em banho-maria a 37°C, foram centrifugados a 1.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente.

Os resultados foram obtidos por leitura comparativa do centrifugado com uma escala padrão de Hemólise. Foi considerada como a DMH o volume de toxina indutor de 50% de hemólise.

3.1.2.2 — Determinação do limite hemolítico (LH): Os resultados foram obtidos pela aplicação do método padronizado pelo NHI (11) e o soro padrão utilizado, proveniente do International Lab. of Biol. Statens Serum Institut — Copenhagen. O LH deverá ser igual ou menor do que 0,075ml.

4 — Preparação da Anatoxina

4.1 — Centrifugação e filtração da toxina: Os conteúdos de garrafas que se apresentaram puras foram misturados, centrifugados a 3.000 rpm a 4°C por 30 minutos. O pH do sobrenadante foi corrigido a 6,8 — 7,0, com solução de Ácido Clorídrico 20% e o material filtrado em pré-filtro AP15 membranas inertes, em série, de 0,45 e 0,22 μ m.

4.2 — Detoxificação: obtida pela ação de 0,5% de formalina a 37°C durante 30 dias, com agitação periódica.

4.3 — Provas

4.3.1 — Toxicidade específica

a) Teste dermonecrótico: Coelhos albinos de dois quilos, inoculados seja por via intradérmica com 0,2ml de material ou com 2,0ml por via subcutânea não devem apresentar necrose durante os quinze dias de observação.

b) Teste de letalidade: Coelhos albinos de dois quilos, inoculados por via venosa com 3,0ml de material/kg devem sobreviver, sem apresentar sintomas, durante um período de quinze dias de observação.

c) Teste de inocuidade em cobaias: Três cobaias de 200 a 400g de peso, inoculados com 5ml do material por via subcutânea (região abdominal) devem sobreviver, sem apresentar sintomas, durante um período de quinze dias de observação.

4.3.2 — Capacidade combinatória

Determinação da dose combinante "Line binding" (L.B.) (7,11). O material foi distribuído em tubos contendo 1UI de soro padrão, em volumes crescentes de anatoxina e completado o volume a 2,0ml com solução salina tamponada pH 7.2. Aos tubos, após 20 minutos em banho-maria a 37°C, foi adicionada toxina padrão contendo 1 limite hemolítico e incubados a 37°C em banho-maria por mais 20 minutos e, finalmente, adicionado 0,1ml de uma suspensão a 10% de hemácias de coelho. Os tubos incubados em banho-maria 37°C por uma hora foram centrifugados a 1.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. Os resultados foram obtidos por leitura comparativa do centrifugado com a escala padrão de hemólise. Foi considerada como a dose combinante (LB) o volume da anatoxina que induziu a traços de hemólise.

5 — Preparação da Anatoxina Purificada

A concentração da anatoxina foi inicialmente realizada pelo processo de ultrafiltração molecular (12) em membrana de 10.000 d. Obtida concentração de 5 vezes o produto foi submetido à precipitação seletiva à temperatura ambiente com 33% p/v de sulfato de amônio. Após a precipitação o pH foi acertado para 7,0 com uma solução de hidróxido de sódio 40% e a mistura mantida em repouso a 4°C por uma noite.

O material foi centrifugado a 3.000 rpm por 30 minutos à temperatura de 4°C, e o precipitado ressuspenso em água destilada a 1/16 do volume inicial.

Após dessalinização por ultrafiltração molecular, o produto foi novamente concentrado a 1/16 do volume inicial, isotonzado a 0,85% de NaCl, o pH reajustado para 6,0-7,0 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 40% e adicionado de Timerosal, a 1/10.000, como preservativo.

O produto assim preparado foi esterilizado por passagem em membranas inertes, constando de um pré-filtro AP15 e de 0,45 e 0,22 μ m e conservado a 4°C.

5.1 — Provas efetuadas após purificação

5.1.1 Inocuidade (3)

Foram realizados os mesmos testes citados nos itens 4.3.1 e 4.3.2

5.1.2 — Esterilidade (3). Em meio de Tioglicolato Brewer e Caseína soja por semeadura de 3ml do produto em 100ml do meio.

5.1.3 — Atividade Imunogênica (7). Oito coelhos albinos pesando de 2 a 3 quilos foram inoculados por via intramuscular como segue:

1ml, 2ml e 3ml com intervalo de 7 dias. No 7º dia após a última dose foram extraídos 2ml de sangue, da veia da orelha. Volumes iguais dos respectivos soros foram misturados e o "pool" titulado pelo método hemolítico.

O título foi considerado satisfatório quando apresentava no mínimo 3 unidades superiores ao título inicial, determinado por L.B.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção de anatoxina estafilocócica purificada, com atividade imunogênica adequada à aplicação humana com fins curativos ou profiláticos é imprescindível a utilização de cepas selecionadas de *S. aureus* produtoras de exotoxinas. Os autores verificaram que as amostras Wood nº 3, C24 nº 6 e C24 nº 7 cultivadas em Caldo Martin e Caldo Soja, sob 20% de tensão de dióxido de carbono, apresentaram bons resultados.

As anatoxinas assim preparadas podem ser purificadas e concentradas por precipitação com solução a 33% de sulfato de amônio, visando, além da concentração de atividade imunogênica, à redução de efeitos indesejáveis no homem devidos a fenômenos de hipersensibilidade individual. Na rotina produtiva, rendimentos mais elevados foram conseguidos pelo tratamento da anatoxina com 50% de sulfato de amônio.

ABSTRACT: The toxins produced by *S. aureus*, sample Wood nº 3, C24 nº 6 and C24 nº 7 developed as described, produced anatoxins that, submitted to the purification and concentration with 33% of ammonium sulfate solution permitted vaccines obtention with high immunogenic activity degree and low impurity concentration.

KEYWORDS: *S.aureus*, toxins, purified anatoxins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DOLMAN, C.E. et al. Treatment of localized Staphylococcal infections with Staphylococcus toxoid. *J. Amer. Med. Ass.*, v. 100, 13; p. 1007 — 1010, 1933
2. DOLMAN, C.E. et al. Tests for innocuity and antigenic potency of Staphylococcus toxoid. *J. Path. Bact.*, v. 41, p. 137-162, 1935
3. DOLMAN, C.E. et al. Staphylococcus toxin, toxoid, and anti toxin. *Canad. Publ. Health J.*, v.27, 11, p. 529-535, 1936.
4. GLADSTONE, G.P. & GLENCROSS, E.J.G. Growth and toxin production of Staphylococci in cellophane Saca "in vivo". *Brit. J. Exp. Path.*, v. 41; p. 313 — 333, 1960.
5. KAPRAL, F.A. et al. The nature of Alpha toxin production by *Staphylococcus aureus* Grown "in vivo". *Proc.Soc.Exp.Biol. Med.*, v. 119, p.74-77, 1965.
6. LEONARD, G.F. & HOLM, A.A method for the production of Staphylococcus toxin and toxoid. *J. Immunol.*, v. 29,3, p.209-221, 1935.
7. INTERNATIONAL CONGRESS FOR MICROBIOLOGICAL STANDARTIZATION, 7,1 962, London. Proceedings of 7th. Cópia cedida pelo Dr. Ruppert Ludwig Hahnstadt em 12/11/86, Alerbrás, Rio.
8. TÉCNICA de Preparação da Anatoxina Estafilocócica — Manual de Produção de Anatoxina Estafilocócica do Setor de Aeróbios do Instituto Butantan.
9. MILLIPORE. Técnica de ultrafiltração molecular, por meio do Sistema Pellicon, 1987. (Implantado no Setor de Aeróbios do Instituto Butantan).
10. TENTATIVE Staphylococcus toxoid requirements: National Institute of Health, Washington, D.C. August 25, 1938.

FURUTA, J. A., OLIVEIRA, E. P. T. de, MATIAS, S. de J. D., HIGASHI, H.G. Produção de anatoxina estafilocócica purificada. **Bol. Biotecnol.** , v. 2, p. 19-23, 1991

11. TOXÓIDE estafilocócico. Anexo n. 08. Ref. à Portaria n. 11, 08/7/58. *Diário Oficial*, 14 jul. 1958.
12. TOXÓIDE estafilocócico. Anexo 15. Trab. apres. no Seminário sobre Técnicas e Normas de Produção e Controle de Vacinas e Soros de Uso Humano no Brasil — CEME-27 a 31/5/74.

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Volume 53, 1991

Mem. Inst. Butantan	v. 53	n. 1,2, supl.1	p.119-23	1991
---------------------	-------	----------------	----------	------

INDICE DE AUTOR / AUTHOR INDEX
VOL. 53

ADLER, C	
ALMEIDA, E	
ALMEIDA, M. S. de	
ALVARADO, J	
ANTONIO, L.C.	
ARNHOLDT, AV	
ASSADURA, M.L.	
ATKINSON, B.	
BARRETO, O. de	
BEÇAK, Y.	
BERGMANN, T.E.	
BERRIO, O.J.	
BERTANI, R.	
BIOZZI, G.	
BRAGANCA PEREIRA, CA. de	
BRAZ, S.	
BRENO, M.C.	
BRODSKY, C.	
CABELLO, PH	
CAMARGO, A.C.M.	
CAMPUS, G.	
CARDOSO, J.L.C.	
CARMONA, E.	
CARPENTER, M.R.	
CHAGAS, JR.	
CHAGURI, L.C.A.S.	
CHUDZINSKI, A.M.	
COLETTI, G.M. de	
CONTI, R.	
CORDOIRO, C.L. de S.	
CORREIA, E.M.A.	
COSSU, M.A.	
COSTA, E.M.	
CREPALDI, R.F.	
CURI, PR.	
DANI, S.B.	
DE-CILLO, G.V.	
DECREUSEFONO, G.	
DIAS DA SILVA, W.	
DI BERNARDO, M.	
D'IMPÉRIO LIMA, M.R.	
DOMENICHINI, M.	
DOMINGOS, M.G.	
DORCI, YAC.	
DURAN, N.	
ESTRADA, F.	
FANG, ELYN.	
FETTI - CONTE, A.C.	
FRANCINI, F.	
FRASCH, C.E.	

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Volume 53, 1991

Mem. Inst. Butantan	v. 53	n. 1,2,supl.1	p.119-23	1991
---------------------	-------	---------------	----------	------

ÍNDICE DE AUTOR / AUTHOR INDEX
VOL. 53

ADLER, C.	119
ALMEIDA, E.	71
ALMEIDA, M. S. de	213
ALVARADO, J.	181
ANTONIO, L.C.	213, 218
ARNHOLDT, A.V.	219
ASSAKURA, M.T.	213
AYMERICH, R.	218
BARRETTO, O.C. de O.	213
BEÇAK, W.	11
BERGMANN, I.E.	59
BERRO, O.J.	219
BERTANI, R.	161
BIOZZI, G.	224
BRAGANÇA PEREIRA, C.A. de	222
BRAZ, S.	220
BRENO, M.C.	214
BRODSKYN, C.I.	220, 224
CABELLO, P.H.	219
CAMARGO, A.C.M.	216
CAMPUS, G.	21
CARDOSO, J.L.C.	213, 214
CARMONA, E.	216, 218, 219
CARPENTER, M.R.	215
CHAGAS, J.R.	216
CHAGURI, L.C.A.G.	175, 223
CHUDZINSKI, A.M.	218
COLLETO, G.M.D.D.	149
CONTU, B.	21
CORDEIRO, C.L. dos S.	216
CORRÊA, F.M.A.	216, 217
COSSU, M.A.	21
COSTA, E.M.	219
CREPALDI, R.F.	221
CURI, P.R.	217
DAMY, S.B.	175, 223
DE CILLO, D.M.	213
DECREUSEFOND, C.	224
DIAS DA SILVA, W.	3, 149, 220
DI BERNARDO, M.	167
D'IMPÉRIO LIMA, M.R.	220
DOMENIGHINI, M.	15
DOMINGOS, M.O.	214
DORCE, V.A.C.	221
DURAN, N.	214
ESTRADA, R.	181
FANG, F.L.W.	222
FETT — CONTE, A.C.	215
FRANCINI, F.	205
FRASCH, C.E.	77
FREITAS, J.C. de	191
FURTADO, M.F.D.	149, 213, 218, 220

FURUTA, J.A.	19
GALLINA, N.M.F.	222
GAMBARINI, A.G.	215
GATTI, M.S.V.	214
GOLDENBERG, S.	71
GONZÁLEZ, N.	181
GORDO, M.	135
GRISOLIA, C.S.	205
GUIDOLIN, R.	3, 15
GUIMARÃES, E.S.P.	219
GUTIÉRREZ, J.M.	218
HENRIQUES, S.B.	213
HIGASHI, H.G.	3, 19
HIRATA, I.Y.	216
HO, P.L.	215
HOSSLE, P.	119
IBANEZ, O.M.	224
JORGE, M.T.	215, 216, 221, 222
JULIANO, L.	216, 219
KAMIGUTI, A.S.	218
KAWANO, T.	216
KELEN, E.M.A.	218
KRIEGER, H.	219
KRIEGER, M.A.	71
KUSANO, E.J.V.	216
LAFAILLE, J.J.	71
LAZARI, M.F.M.	214
LEITE, L.C.C.	214
LEME, V.M.C.	219
LEOPOLDO-E-SILVA, R.	217
LIMA, A.T.V.C.	219
LO CASCIO, R.	119
LOMONTE, B.	218
LUCAS, S.	161
MACEDO, M.S.	223
MALUCELLI, M.I.C.	221
MANDELBAUM, F.R.	213
MARCELINO, J.R.	15
MARCUCCI, M.C.	214
MARQUES, O.A.V.	127
MARSILI, I.	21
MARTINS, M.	197
MATIAS, J.D.	19
MARUYAMA, M.	218
MASSA, S.	223
MEIER, J.	119
MEIRELLES, M.N.L.	219
MENDES, I.F.	222
MENDONÇA, J.S. de	216
MIHARA, H.	218
MOREIRA, G.	197
MORENA, P.	213, 218
MORO — FURLANI, A.M.	219
MOTA, I.	214, 220, 223, 224, 225
MOURA DA SILVA, A.M.	214, 220

MOUTON, D.	224
MUTTI PEREIRA, M.M.	221
NENCIONI, L.	15, 21
NEUMANN, B.G.	220
NEWTON, S.M.C.	53
NISHIKAWA, A.K.	220
NISHIOKA, S. de A.	222
NONOYAMA, K.	213
OELEMANN, W.	71
OGAS, S.	220, 224
OLIVEIRA, E.B.	216
OLIVEIRA, E.P.T. de	19
OLIVEIRA, E.S.	216
OSHIRO, T.T.	220, 224
OTERO, R.	218
PADOVANI, C.R.	217
PALERMO — NETO, J.	221
PELUSO, F.O.	205
PEPPOLONI, S.	21
PEREIRA, A.	221
PERINI, A.	223
PICARELLI, Z.P.	214
PIESCO, R.V.	222
PIETRO PEREIRA, A.S.	221
PIZZA, M.G.	15
PODDA, A.	15, 21
POMBAL JR., J.P.	135
PRAL, M.M.	222
PREZOTO, B.C.	214
PUORTO, G.	127
RAPPUOLI, R.	15, 21
RIBEIRO, L.A.	215, 216, 221, 222
RIBEIRO, O.G.	224
RIZZO, E. de	222
ROBLES, A.	181
RODRIGUES, U.P.	175, 223
ROJAS, E.	181
ROJAS, G.	218
ROSSO, J.P.	218
ROVIRA, M.E.	218
SAKAUCHI, M.A.	221
SANO — MARTINS, I.S.	218
SANTANA, E.Q. de	223
SANT'ANNA, O.A.	213, 223
SANTORO, M.L.	218
SANTOS, M.C. dos	220
SANTOS, R.E.S.	215
SAZIMA, I.	167
SCHARFSTEIN, J.	219
SEGURA, E.	181
SHIMIZU, Y.	221
SILVA, A.C. da	223
SILVA, A.M.M. da	224
SILVA JR., P.I. da	161
SILVA, L.F.	224

SILVA, M.L.R. da	216
SILVA, S.G.	219
SILVESTRI, S.	15, 21
SIMÕES, L.C.G.	216
SIQUEIRA, M.	224
SMILLIE, L.B.	215
SOARES, M.F.M.	223
SOGORB S., F.	175, 223
STEPHANO, M.A.	3
STIFFEL, C.	224
STOCKER, B.A.D.	53
SUCUPIRA, M.	216
TAJARA, E.H.	215
TAKATA, C.S.	222
TAKEHARA, H.A.	224
TEIXEIRA, C.F.P.	220, 224
TENÓRIO, E.C.N.	222
TOFFOLETTO, O.	214
TOMY, S.C.	218
TORDO, N.	31
TRONCONE, L.R.P.	220
TUFIK, S.	220
UMEKITA, L.F.	225
VANNI, R.	15, 21
VARELLA — GARCIA, M.	215
VARGAS, O.	218
VIEIRA, E.G.J.	213
VOLPINI, G.	21
YAMANOUYE, N.	214
YASAKA, W.J.	224

CONTEÚDO/CONTENTS
Volume 53, 1991

Nº 1

- The influence of three different drying procedures on some enzymatic activities of three Viperidae snake venoms.
A influência de três diferentes processos de secagem em algumas atividades enzimáticas de três venenos da serpente Viperidae.
Jürg MEIER, Christoph ADLER, Paul HÖSSLE, Rosario Lo CASCIO . . . 119
- Padrões cromáticos, distribuição e possível mimetismo em *Erythrolamprus aesculapii* (Serpentes, Colubridae)
Color patterns, distribution, and possible mimicry in *Erythrolamprus aesculapii* (Serpentes, Colubridae)
Otávio A.V. MARQUES, Giuseppe PUORTO 127
- Duas novas espécies de *Hyla* da Floresta Atlântica no Estado de São Paulo (Amphibia, Anura)
Two small species of *Hyla* from the Atlantic Forest of the São Paulo state (Amphibia, Anura)
José P. POMBAL JR., Marcelo GORDO 135

Supl. 1

- | | | |
|--|---|----|
| Willy Beçak | Opening Remarks | 11 |
| M.G. Pizza, M. Domenighini,
L. Nencioni, A. Podda.,
R. Vanni, S. Silvestri,
R. Rappuoli | Engeneering bacterial toxins for the
development of new vaccines | 15 |
| L. Nencioni, A. Podda, S.
Peppoloni, G. Volpini,
I. Marsili, B. Contu,
G. Campus, M.A. Cossu,
R. Vanni, S. Silvestri,
R. Rappuoli | Evaluation of a cellular DPT vaccines in
infants | 21 |
| Noël Tordo | Contribution of molecular biology to
vaccine development and molecular
epidemiology of rabies disease | 31 |
| S.M.C. Newton,
B. A. D. Stocker | Insertion of heterologous epitopes in
<i>Salmonella</i> Flagellin | 53 |
| Ingrid E. Bergmann | The impact of recombinant DNA on
the control of animal health | 59 |
| S. Goldenberg, M.A.
Krieger, J.J. Lafaille,
E. Almeida, W. Oelemann | Use of <i>Trypanosoma cruzi</i> recombinant
antigens in the immunological diag-
nosis of Chagas Disease | 71 |
| Post-Symposium Lecture | | |
| Carl E. Frasch | Perspectives on production of group
B Meningococcal vaccines | 77 |

Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. Quality control of animal venoms and of their correspondent antivenoms: I. Standardization of the assay methods to analyse the biochemical and pharmacological properties of venoms from some snakes belonging to the genus <i>Bothrops</i> and <i>Crotalus</i> by using samples of venoms dried on at room temperature or lyophilized. M.F.D. FURTADO, G.M.D.D. COLLETTI, W. DIAS DA SILVA	149
The Brazilian species of the spider genus <i>Epebopus</i> Simon, 1892 (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae), with description of <i>E. natuman</i> , n.sp. As espécies brasileiras do gênero <i>Epebopus</i> Simon, 1892 (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae) com descrição de <i>Epebopus natuman</i> , sp. n. Sylvia LUCAS, Pedro Ismael da SILVA JR., Rogério BERTANI	161
Albinismo em serpentes neotropicais Albinism in Neotropical Snakes Ivan SAZIMA, Marcos DI BERNARDO	167
Variação na composição do leite da coelha (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Variation in the composition of rabbit's milk (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) F. SOGORB S., S.B. DAMY, U.P. RODRIGUES, L.C.A.G. CHAGURI	175
Development of antibody response and clinical and hemalogical alterations in horses immunized with snake venoms for the production of antivenom in Costa Rica. Desenvolvimento da resposta imunitária e alterações clínicas e hematológicas em cavalos imunizados com venenos de serpentes para produção de antiveneno na Costa Rica. Ricardo ESTRADA, Abel ROBLES, Jorge ALVARADO, Ermila ROJAS, Nuria GONZÁLEZ, Eduardo SEGURA, José Maria GUTIÉRREZ	181
Nomenclatura em toxinologia. Relações com a comunicação química entre organismos e propriedades biológicas das toxinas. Nomenclature in toxinology. Relations with the chemical communication between organisms and biological properties of toxins. José Carlos de FREITAS	191
The nest and the tadpole of <i>Hyla wavrini</i> , Parker (Amphibia, Anura) Os ninhos e os girinos de <i>Hyla wavrini</i> , Parker (Amphibia, Anura) Marcio MARTINS, Glória MOREIRA	197
Influencia del ayuno sobre la producción de veneno en <i>Bothrops alternatus</i> (Ophidia: Viperidae: Crotalinae) Starvation period and snake venom production in <i>Bothrops alternatus</i> (Ophidia: Viperidae: Crotalinae) F. FRANCINI, F.O. PELUSO, C.S. GRISOLIA	205
COLETÂNEA DE RESUMOS DE TRABALHOS PUBLICADOS PELOS PESQUISADORES DO INSTITUTO BUTANTAN (1990)	213
BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA	1



COMPOSIÇÃO, FOTOLITO E IMPRESSÃO

**IMPrensa OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP**

Rua da Mooca, 1921 — Fone: 291-3344

Vendas, ramais: 257 e 325

Telex: 011-34557 — DOSP

Caixa Postal: 8231 — São Paulo

C.G.C. (M.F.) N.º 48.066.047/0001-84



GOVERNO DE SÃO PAULO
CONSTRUINDO UM FUTURO MELHOR

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. 1234p.

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

8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F^o, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiónico. *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 (22x12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 30 (trinta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 20 para os autores.
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 text 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 (31 x 21cm). 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. 1234p.

Articles

8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F^o, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiónico. *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 or 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. Thirty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.