

A. B. Prado Fortuna,
Reinaldo W. Vieira,
Nicola Mortali,
Renato G. G. Terzi,
Mitsuhira Yamamoto,
Cássio M. Raposo do Amaral

EFEITOS DA ESTERILIZAÇÃO DA DURA-MATER HUMANA PELO ÓXIDO DE ETILENO

Segmentos de dura-mater destinados à confecção de valvas cardíacas, condicionados em glicerina a 95,5%, foram submetidos à esterilização pelo óxido de etileno em autoclave a duas atmosferas de pressão, por um período de 12 horas seguidas por 72 horas de aeração. O óxido de etileno foi utilizado em mistura com gás carbônico na proporção de 20 % para o primeiro e 80% para o último. Culturas em meios apropriados para bactérias e fungos foram negativas para controles até 180 dias de estoque.

A medida de pressão de ruptura foi utilizada para verificar eventual alteração das características físicas, resultante do método de esterilização empregado. A análise dos dados obtidos, comparados aos de uma série-controle, não mostrou diferença estatisticamente significativa.

Os autores concluem pela eficiência do método empregado de esterilização da dura-mater humana pelo óxido de etileno e que o mesmo não altera, de imediato, as características físicas do tecido.

A proposição de se adotar esse método como rotina na esterilização de valvas cardíacas de dura-máter, deve aguardar os resultados clínicos em uma série de pacientes em observação.

A baixa incidência de complicações tromboembólicas relacionadas ao implante de valvas cardíacas biológicas, isto é, próteses valvares confeccionadas com tecido orgânico¹ fez com que Puig, Verginelli e Zerbini, em 1971², aproveitando as qualidades físicas da dura-mater humana, introduzissem o uso das “valvas cardíacas de dura-mater”

Se por um lado as valvas biológicas apresentam menor incidência de acidentes tromboembólicos, por outro, a endocardite fúngica ou bacteriana³⁻⁵ parece ser mais freqüente nesse tipo de substitutivo valvar, donde o impetrasse em se aprimorar os atuais métodos de esterilização.

Atualmente a esterilização das valvas de dura-mater homólogas obedece à técnica original de Pigossi e col.⁶, que consiste na conservação da dura-mater em glicerina a 98%, durante pelo menos 12 dias. A prótese confeccionada em condições assépticas é, a seguir, segundo preconizam Barrat-Boyes e Roche⁷, mantida por 12 a 24 horas antes de ser implantada em solução fisiológica contendo antibióticos, no caso cefalotina, kanamicina e anfotericina B.

Da Costa e col.⁸, baseados nos resultados da esterilização de próteses biológicas heterólogas pelo aldeído glutárico⁹, utilizaram esse método para a

esterilização de dura-mater humana destinada à confecção de valvas cardíacas e constataram a ocorrência de degeneração precoce das valvas implantadas.

Raposo-do-Amaral e col.¹⁰ verificaram a eficácia da esterilização da dura-mater humana, para uso clínico, por meio de radiações ionizantes, na dose de 2,5 Mrad. Não relatam, entretanto, os efeitos desse método de esterilização sobre as propriedades físicas desse tecido.

A capacidade de esterilização pelo óxido de etileno tem sido repetida desde há muitos anos, inclusive para tecidos biológicos, como demonstrado por Hufnagel e col.¹¹ em 1953, para enxertos vasculares homólogos.

Stern², em 1958, utilizou a dura-mater humana como enxerto, em diversas formas de cirurgia reparadora, para o que era esterilizada pela imersão por 30 minutos em óxido de etileno na forma líquida e, a seguir, congelada, liofilizada e estocada.

A esterilização de valva aórtica homóloga pelo gás de óxido de etileno e posterior congelamento para estocagem foi utilizada pela primeira vez por Hudson¹³ em 1966. Em nosso meio, Buffolo¹⁴ em 1973 utilizou o óxido de eti-

leno líquido a 1%, na temperatura de 4°C, para esterilizar valvas aórticas homólogas conservadas em uma solução de álcool etílico, glicerina e glicina.

Atualmente a existência de Centrais de Esterilização, dispondo de autoclaves especiais para esterilização pelo gás de óxido de etileno, levou-nos a estudar os efeitos desse método sobre a dura-máter humana conservada em glicerina, tendo em vista a formação de um “banco de valvas”.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 9 exemplares de dura-mater humana, obtidos de cadáveres de ambos os sexos, com idade variando entre 20 e 50 anos, retirados do Serviço de Verificação de Óbito até 48 horas após o óbito.

Após lavagem em água corrente, para a retirada de detritos e coágulos, a dura-mater foi colocada em glicerina P. A. 95,5% e encaminhada, no mesmo dia, ao hospital para preparação inicial.

A - Esterilização e controle bacteriológico - No hospital, cada dura-mater foi seccionada ao meio na linha sagital. Um segmento foi mantido em glicerina e conservada em temperatura ambiente, constituindo a série-controle I. Outro segmento, a ser submetido à esterilização pelo óxido de etileno, constituindo a série II, foi encaminhado em glicerina à Central de Esterilização*, onde foram retirados dois fragmentos para posterior controle bacteriológico. A seguir, cada segmento e seus respectivos controles foram condicionados separadamente em sacos plásticos, contendo glicerina a 95,5%, selados e codificados.

A esterilização foi realizada em autoclave à temperatura ambiente, a uma pressão de duas atmosferas, por um período de 12 horas, utilizando-se uma mistura de óxido de etileno (20%) e gás carbônico (8%).

Após a esterilização, seguida por um período de 72 horas de aeração, um dos controles foi incubado à temperatura de 37°C durante 14 dias, em meio Thioglycolat dífico a 30% para bactérias e em solução de Thyptio Soy Broth sojagasein para fungos. Mensalmente até o sexto mês após a esterilização, foi escolhido ao acaso um dos segundos controles para nova cultura, nos mesmos meios para bactérias e fungos.

B- Estudo das propriedades físicas da dura-mater submetida à esterilização pelo óxido de etileno - Dos espécimens de dura-mater que constituem a série I (controle mantido em glicerina a 95,5%) e a série II (mantida em glicerina a 95,5% e submetida à esterilização pelo óxido de etileno), foram retirados, após reidratação, 40 corpos de prova (I = 18, II = 22), utilizando-se um cunho circular cortante, de modo a determinar áreas iguais de 22 cm² cada uma.

Os corpos de prova foram submetidos a teste de arrebentamento ou ruptura em um aparelho Shopper-Leipzig, da Seção de Produtos Industriais do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. A área

de ensaio de 10 cm² foi submetida à pressão de nitrogênio contido em um tubo de aço. A vazão do gás foi sempre gradual e de maneira constante. A pressão (em Kgf/cm²), no momento de ruptura, foi registrada em manômetro.

Retalhos, remanescentes da feitura dos corpos de prova, foram submetidos a estudo microscópico, após fixados e corados pela hematoxilina-eosina.

C - Estudo estatístico - Os valores médios das pressões de ruptura das séries I e II foram comparados e submetidos a tratamento estatístico, aplicando-se o teste t para a comparação de médias para o caso de variâncias iguais e número amostral diferente.

RESULTADOS

A - Esterilização e controle bacteriológico - Culturas, nos meios descritos, dos fragmentos-controles da dura-mater humana esterilizados pelo óxido de etileno não demonstraram crescimento de fungos e/ou bactérias, até 14 dias de observação, mesmo em controles duplicatas mantidos em estoque até 180 dias após a esterilização.

B- Estudo das propriedades físicas da dura-mater humana submetida à esterilização pelo óxido de etileno - Na série I (mantida em glicerina a 95,5%), em 18 corpos de prova submetidos à prova de ruptura, a pressão média de ruptura foi de $6,49 \pm 2,55$ Kgf/cm². Na série II (mantida em glicerina a 95,5% e submetida à esterilização pelo óxido de etileno) em 22 corpos de prova a pressão média encontrada foi de $6,10 \pm 2,34$ Kgf/cm².

Quadro I – Dados a respeito dos exemplares de dura-máter retirados de nove cadáveres.

N.º de testes		Pressão de ruptura	
I	II	I	II
2	3	6,4	6,5
2	3	6,7	7,8
2	2	8,2	5,5
2	2	5,3	6,2
2	2	9,0	4,6
2	2	9,3	10,0
2	2	7,7	5,8
2	3	2,5	3,1
2	3	3,3	5,4
Média		6,49	6,10
t		0,55	
Probabilidade		0,50 < p < 0,50	

Observou-se que a pressão de ruptura não sofre alterações significativas, quando a dura-mater humana conservada em glicerina é submetida à esterilização pelo óxido de etileno (t = 0,55).

O estudo microscópico pela hematoxilina-eosina não revelou alteração histológica além das já descritas com o método de esterilização, e conservação pela glicerina à temperatura ambiente⁶.

DISCUSSÃO

A prática corrente de esterilização de dura-mater humana, destinada à confecção de valvas cardíacas, consiste na conservação em glicerina a 98% por um período de 12 dias, como preconizado por Pigossi e col.⁶. A valva é em geral confeccionada em condições assépticas 12 ou 24 horas antes da cirurgia e, segundo a técnica de Barrat-Boyes e Roche⁷, mantida em solução contendo antibióticos e fungicidas até o momento de ser implantada.

A associação desses dois processos de esterilização deve-se provavelmente ao reconhecimento de ser a glicerina um agente bactericida lento¹⁷ e ineficaz para algumas formas bacterianas esporuladas⁶, fato esse recentemente confirmado por Raposo-do-Amaral e col.¹⁰ ao demonstrarem o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus anthracis* em amostras de dura-mater humana mantidas em glicerina por um período de 12 dias após a inoculação. Embora os autores tenham atribuído esses achados à inoculação de número extremamente elevados de microorganismos no experimento, a complementação pelo óxido de etileno da esterilização obtida com a glicerina está justificada. Restava, entretanto, comprovar a difusão do óxido de etileno através da glicerina e que o mesmo não alteraria as propriedades físicas da dura-mater.

A difusão do óxido de etileno através da glicerina foi facilitada pela mistura ao gás carbônico e do uso de autoclave, permitindo uma pressão constante de duas atmosferas, durante o período de 12 horas de esterilização.

A ação esterilizante do óxido de etileno, nas condições acima descritas, foi verificada pela realização de culturas em meio apropriados para bactérias e fungos. Os meios empregados foram o Thioglycolat Dífico a 30% e o Thytic Soy Broth. As culturas foram incubadas a 37.°C durante 14 dias, não sendo verificado, durante esse período, crescimento de microrganismos, mesmo em controles conservados em estoque, à temperatura ambiente, por período de tempo superior a seis meses.

Para a verificação dos efeitos do óxido de etileno sobre as propriedades físicas da dura-mater humana, foi escolhida a prova de arrebentamento ou teste de ruptura, pois essa prova, segundo trabalhos anteriores¹⁵⁻¹⁶, demonstrou ser bastante representativa.

A prova de arrebentamento ou ruptura, como teste de avaliação da resistência para a dura-mater humana, é passível de críticas, pois cada corpo de prova não é rigorosamente uniforme e apresentava variações de espessura. Por esse motivo, no presente estudo consideraram-se, para a comparação, as médias das pressões de arrebentamento registradas.

A análise estatística dos dados obtidos permite supor que a exposição da dura-mater humana ao óxido de etileno, por um período de 12 horas, não altera significativamente as propriedades físicas da mesma, impressão essa corroborada pelo estudo microscópico realizado.

Os resultados dos controles bacteriológicos e das propriedades físicas da dura-mater, após a esterilização pelo óxido de etileno como descrito no presente trabalho, levaram-

nos à utilização desse método para esterilizar valvas cardíacas de dura-mater conservadas em glicerina 18. A adoção desse método como rotina deve, entretanto, aguardar os resultados clínicos do seguimento de uma série de pacientes, já em andamento.

CONCLUSÕES

1 - A exposição da dura-mater humana, conservada em glicerina P.A. a 95,5% a uma mistura de óxido de etileno (20%) e gás carbônico (80%) em autoclave a duas atmosferas de pressão durante 12 horas, mostrou ser eficiente como método de esterilização, a julgar pelas culturas negativas para o crescimento de bactérias e fungos nos meios utilizados.

2 - As propriedades físicas da dura-mater humana não se alteram significativamente pela esterilização pelo óxido de etileno de acordo com o método descrito, uma vez que a pressão média de ruptura desse tecido não é influenciada pelo método em questão.

SUMMARY

Human dura-mater, conditioned in 95.5% glycerol, was sterilized by exposure to a gas mixture of 20 percent of ethylene oxide and 80 percent of carbon dioxide at a pressure of 2 B.P. for a period of 12 hours followed by 72 hours aeration.

Cultures for bacteria and fungi were negative up to 180 days following sterilization.

Specimens of sterilized dura-mater were subjected to rupture tests.

No statistical difference was noted on the measured rupture pressure when data was compared to a control series.

The authors conclude that ethylene oxide is an efficient sterilizing agent for human dura-mater and that no immediate changes are induced on the physical properties of this tissue by the method.

Routine use of this method of sterilization should await clinical follow-up now underway on a group of patients with dura-mater heart valves sterilized as described.

REFERÊNCIAS

1. Angell, W. W. - Long-term results of tissue valve grafts for mitral replacement- In Kalmanson, D. - The mitral valve: a Pluridisciplinary Approach. Edward Arnold, Londres, 1976. p. 481.
2. Puig, L. B.; Verginelli, G.; Zerbini, E. J. - Valvas cardíacas de dura-mater. In: Zerbini, E. J. - Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto. 3.ª ed, Sarvier, São Paulo, 1974. p. 677.
3. Wain, B.; Thompson, R.; Ahmed, M.; Mustapha, T.; Yacoub, M. - Fungal endocarditis following homograft valve replacement. Am. J. Cardiol. 43: 425, 1979.
4. Paulista, P. P.; Souza, L. C. B.; Abdalnassih Neto, C.; Arnoni, A. S.; Jatene, A. D. - Complications in dura-mater valve prosthesis. 3º Simpósio Internacional de Órgãos Artificiais, São Paulo, 1979.
5. Grinberg, M.; Mansur, A. J.; Yamano, J. S.; Curiati, J. A. E.; Puig, L. B.; Décourt, L. V. - Infective endocarditis in homologous dura-mater cardiac valve prosthesis. 3º Simpósio Internacional de Órgãos Artificiais, São Paulo, 1979.
6. Pigossi, N.; Raia, A.; Lex, A.; Gama, A. H.; Simonsen, O.; Haddad, J.; Stolf, N. A. G.; Zerbini, E. J.; Mi-

- niti, A.; Tenuto, R. - Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-mater homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. *Rev. Ass. Med. Bras.* 17: 263, 1971.
7. Barratt-Boyes, B. G.; Roche, A. H. G. - A review of aortic valve homografts over a six and one-half year period. *Ann. Surg.* 170: 483, 1969.
 8. Costa, I. A.; Camargo, P. H.; Silva, A. Z., Jr.; Faraco, D. L.; Sallum, F. S.; Oliveira, E. C. C.; Raggio, A. S.; Coelho, A. - Experiência clínica com uso de próteses homólogas de dura-mater conservadas em uma solução tamponada de aldeído glutárico. *Rev. Col. Bras. Cir.* 5: 255, 1978.
 9. Carpentier, A.; Deloche, A.; Relland, J.; Fabiani, J.; Dubost, C. - Six years follow-up of glutaraldehyde preserved heterografts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 68: 771, 1974.
 10. Raposo-do-Amaral, C. M.; Yanaguita, R. M.; Minami, P. S.; Gambale, W.; Paula, C. R.; Pigossi, N. Esterilização da dura-mater humana com radiações ionizantes para uso clínico. *Rev. Paul. Med.* 95: 20, 1980.
 11. Hufnagel, C. A.; Rabil, P. J.; Reed, L. - A method for the preservation of arterial homo-and-heterografts. In: *Surgical Forum 1953*, American College of Surgeons, Filadélfia e Londres, 1954. p. 162.
 12. Stern, W. E. - The surgical application of freeze-dried homologous dura-mater. *Surg. Gynec. Obstet.* 106: 159, 1958.
 13. Hudson, R. E. B. - Pathology of the human aortic valve homograft. *Br. Heart J.* 28: 291, 1966.
 14. Buffolo, E. - Substituição da valva aórtica ou mitral por valva aórtica homóloga montada em suporte. Tese. Escola Paulista de Medicina, 1973, São Paulo.
 15. Raposo-do-Amaral, C. M.; Pigossi, N.; Leonardi, L. S.; Mazzei, F. M. - O problema da seleção da dura-mater para implante. I: Investigação de algumas variáveis que podem interferir nas suas propriedades físicas. *Rev. Paul. Med.* 90: 89, 1977.
 16. Raposo-do-Amaral, C. M.; Pigossi, N.; Leonardi, L. S.; Mazzei, P. M. - O problema da seleção da dura-mater para implante. II: Investigação de algumas variáveis que podem interferir nas suas propriedades físicas. *Rev. Paul. Med.* 91: 06, 1978.
 17. Goodman, L. S.; Gilman, A. - *The pharmacological basis of therapeutics*. MacMillan, 3rd ed, New York, 1965. p. 977.
 18. Fortuna, A. B. P.; Vieira, R. W.; Raposo, C. M.; Cordeiro, F. - Valva de dura-mater humana conservada em glicerina e esterilizada pelo óxido de etileno. *Resumo em Arq. Bras. Cardiol.* 32 (supl. 1): 30, 1979.