

ESTUDO DO EFEITO BIOLÓGICO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTERIAS ANAERÓBIAS.

STUDY OF THE BIOLOGICAL EFFECT OF pH ON THE ENZYMATIC ACTIVITY OF ANAEROBIC BACTERIA.

Carlos ESTRELA *

Gilson Blitzkow SYDNEY **

Lili Luschke BAMMANN ***

Oswaldo FELIPPE JUNIOR ****

Estudou-se o efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. Para tanto, analisaram individualmente alguns fatores, entre os quais: concentração de íons hidrogênio; composição estrutural da parede celular de bactérias Gram-negativas; composição biológica da membrana citoplasmática de bactérias Gram-negativas; efeito do pH na atividade enzimática de bactérias Gram-negativas; considerações em torno das propriedades enzimáticas do hidróxido de cálcio empregado como medicação intracanal - inativação de enzimas bacterianas (efeito antibacteriano) e ativação enzimática tecidual (efeito mineralizador). A tentativa de explicação do mecanismo de ação do pH no controle da atividade enzimática bacteriana permitiu levantar a hipótese de uma inativação enzimática irreversível ou definitiva, em condições extremas de pH, em longos períodos de tempo. E, também, uma inativação enzimática temporária, quando do retorno do pH ideal à ação enzimática, havendo volta à sua atividade normal, ou seja, atuando de maneira reversível.

UNITERMOS: Bactérias anaeróbias; Hidróxido de cálcio; Reabsorção radicular externa.

* Professor Adjunto da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. Doutor em Endodontia - USP-SP.

** Professor Adjunto Mestre da Disciplina de Endodontia do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná. Doutorando em Endodontia - USP-SP.

*** Professora Titular, Doutora em Microbiologia da Universidade Federal de Pelotas - RS.

**** Professor do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO

A Endodontia, que fundamenta-se em bases biológicas, aliada às ciências básicas como a biologia celular e molecular, a bioquímica e a microbiologia, caminha ao encontro de melhores explicações para algumas alterações e, dentre estas, a inflamação e a infecção.

Não é recente a busca de soluções eficazes e práticas voltadas a manutenção da sanificação do sistema de canais radiculares infectados, obtida após o preparo químico-mecânico. Aliado a esse fato, destaca-se uma variedade de medicamentos historicamente utilizados com tal finalidade.

Todavia, o raciocínio atual direciona-se ao emprego de um medicamento intracanal, dotado de um potencial de ação eficaz frente a diferentes tipos respiratórios de bactérias (aeróbias, anaeróbias e microaerófilas), que atue também nos túbulos dentinários, com vistas a neutralizar a atividade osteoclástica encontrada normalmente nas reabsorções dentinárias externas.

O foco de atenção frente à eliminação bacteriana está voltado a condições determinantes ao seu crescimento e multiplicação. No entanto, alguns fatores podem influenciar na atividade enzimática das bactérias, dentre estes destacam-se a concentração de íons hidrogênio (pH), a temperatura, a pressão osmótica e a concentração de substratos.^{41,42}

A partir do momento em que técnicas modernas, de coleta e de transporte, foram desenvolvidas para cultura e isolamento de bactérias anaeróbias, recentes achados sobre a microbiota do canal radicular, e seu papel nas infecções periapicais, vieram à tona^{5,9,12,19,22,31,49,50,51,53,55,56,59,61}.

Assim, bactérias anaeróbias nas infecções mistas do canal radicular exercem função primordial na produção de enzimas e endotoxinas, sendo responsáveis por diversas reações que potencializam a infecção: promovem a inibição da quimiotaxia dos neutrófilos e fagocitose, garantem a migração de enzimas lisossômicas, participam da resposta imunológica por ativação do sistema complemento (C3 e C5), e induzem a produção de anticorpos, além de interferir com a sensibilidade antibiótica, resultando na permanência de lesões periapicais dolorosas^{3,9,10,20,47,52,54,61}.

De outra parte, o hidróxido de cálcio tem recebido um merecido destaque como medicação intracanal, graças a duas grandes propriedades: a primeira é a inibição

de enzimas bacterianas (efeito antibacteriano), e a segunda é a ativação enzimática tecidual (efeito mineralizador).

O presente trabalho tem como propósito estudar, através da revisão da literatura, o efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. Coloca-se em questão, a hipótese do efeito do pH gerado pelo hidróxido de cálcio, quando empregado como medicação intracanal, sobre a possível reversibilidade da atividade enzimática de bactérias anaeróbias e da atividade osteoclástica encontrada nas reabsorções dentinárias externas.

Para tanto, será feita uma análise individual relativa a alguns fatores, entre os quais:

01. Concentração de íons hidrogênio.
02. Composição estrutural da parede celular de bactérias Gram-negativas.
03. Composição biológica da membrana citoplasmática de bactérias Gram-negativas.
04. Efeito do pH na atividade enzimática de bactérias Gram-negativas.
05. Considerações em torno das propriedades enzimáticas do hidróxido de cálcio empregado como medicação intracanal.
 - 5.1. Inativação de enzimas bacterianas (efeito antibacteriano)
 - 5.2. Ativação enzimática tecidual (efeito mineralizador)

1. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO

Segundo a teoria de Arrhenius, base é todo composto que em solução aquosa libera, exclusivamente como ânion o grupo OH^- , chamado íon hidroxila. Enquanto os ácidos, em solução aquosa, liberam exclusivamente como cátion o íon hidrogênio. Assim os ácidos são doadores de prótons, e as bases são doadoras de íons hidroxila.^{4,8}

O conceito de pH é definido como sendo o logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio, ou seja, o pH é igual a $-\log [\text{H}^+]$.

Mesmo sendo a água um composto pouco ionizado, pode-se escrever o seu assim chamado equilíbrio de auto ionização:



A 25 graus C, o produto das concentrações de H^+ e OH^- em qualquer solução tem valor constante e igual a 10^{-14} : $[H^+]. [OH^-] = 10^{-14}$.

Desta forma, em cada litro de água pura, apenas 10^{-7} mols de molécula se ionizam, fornecendo 10^{-7} mols de íons H^+ e 10^{-7} mols de íons OH^- . Tomando-se esses valores como padrão, tem-se :

$pH = -\log. [H^+] = -\log. 10^{-7} = -(-7) = 7,0 =$ solução neutra. Assim:

$pH < 7$ concentração de $H^+ > 10^{-7}$, concentração de $OH^- < 10^{-7} =$ solução ácida e,

$pH > 7$ concentração de $H^+ < 10^{-7}$, concentração de $OH^- > 10^{-7} =$ solução básica

2. COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL DA PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Bactérias são microorganismos que apresentam estrutura celular procariótica, possuindo, portanto, um "núcleo" rústico, isento de membrana.

Segundo LOESCHE³⁴ e tomando como referencial o efeito de O_2 sobre o seu metabolismo, as bactérias classificam-se em aeróbias estritas, aeróbias facultativas, microaerófilas e anaeróbias. As bactérias aeróbias estritas são aquelas que somente vivem na presença de O_2 , utilizando-o como aceptor final de elétrons. As aeróbias facultativas compreendem dois sub-grupos, as facultativas verdadeiras e as indiferentes; as facultativas verdadeiras vivem tanto na presença como na ausência de O_2 , enquanto as facultativas indiferentes toleram a presença de oxigênio, mas conservam o metabolismo fermentativo. As bactérias classificadas como microaerófilas, requerem um ambiente com baixa tensão de oxigênio, inferior àquele existente no ar atmosférico (21%). As bactérias anaeróbias estão enquadradas em dois sub-grupos, anaeróbias moderadas e anaeróbias estritas; as anaeróbias moderadas são capazes de viver em presença de 2% a 8% de oxigênio e permanecer viáveis em atmosfera oxigenada por períodos de 60 a 90 minutos, ao passo que as anaeróbias estritas perdem sua viabilidade em ambiente com quantidade igual ou superior a 0,5% de oxigênio.

A forma das bactérias pode ser observada através de coloração de Gram que divide as bactérias em dois grupos: gram-positivas e gram-negativas, aproximadamente iguais em número e importância. A reação das bactérias à técnica de Gram expressa

diferentes características, de modo especial no que diz respeito à composição química, estrutura, permeabilidade da parede celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade das mesmas^{6,40,41}.

Nas bactérias gram-negativas, a parede celular está composta por uma camada de peptidoglicano e três outros componentes que a envolvem externamente: lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo.

O peptidoglicano, que entre outras funções confere rigidez ao corpo bacteriano, está formado por dois açúcares aminados, o ácido N-acetil glicosamina e o ácido N-acetil murâmico, e por um tetrapeptídeo, sempre ligado ao resíduo de ácido N-acetil murâmico; as sub-unidades peptídicas, de cadeias glicídicas adjacentes, são unidas entre si por ligações diretas ou indiretas (pontes de ligação). O peptidoglicano situa-se no espaço periplásmico, localizado entre a membrana citoplasmática (interna) e a membrana externa, onde também são encontradas enzimas hidrolíticas (fosfatases, nucleases, proteases e outras), que facilitam a nutrição bacteriana, proteínas de ligação, que participam da captação de açúcares e amino - ácidos a partir do meio, e enzimas que inativam certos antibióticos.^{6,40}

A lipoproteína está ligada de modo covalente ao peptidoglicano e não covalente à membrana externa; sua função, inferida de estudos realizados com amostras mutantes, é estabilizar a membrana externa e ancorá-la à camada de peptidoglicano. A membrana externa é uma dupla camada, contendo fosfolípidos e proteínas, e apresentando, em sua camada externa, o lipopolissacarídeo.

Entre suas funções, a membrana externa representa uma barreira molecular, prevenindo ou dificultando a perda de proteínas periplásmicas e o acesso de enzimas hidrolíticas e certos antibióticos ao peptidoglicano, possui receptores para bacteriófagos e bacteriocinas e participa da nutrição bacteriana^{6,40}. O lipopolissacarídeo consiste no lípido A (endotoxina), ao qual estão ligadas duas regiões de natureza polissacarídica, respectivamente, o "core" e as cadeias laterais. O lípido A é um glicofosfolípido, cujo papel biológico consiste na sua participação nos mecanismos de patogenicidade da célula bacteriana^{6,40}.

3. COMPOSIÇÃO BIOLÓGICA DA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVAS.

A membrana citoplasmática localiza-se subjacentemente à parede celular, é formada por dupla camada fosfolipoproteica e é fundamental na estrutura bacteriana. Atua como barreira osmótica (a substâncias ionizadas e grandes moléculas), é livremente permeável aos íons sódio e aos amino-ácidos (permeabilidade seletiva). Acresça-se que esta membrana é sede de importantes sistemas enzimáticos, envolvidos nos últimos estágios da formação da parede celular, participantes da biossíntese de lipídeos, e responsáveis pelo transporte de elétrons, assim como enzimas envolvidas no processo de fosforilação oxidativa^{6,40}.

Como sede enzimática, muitas bactérias produzem proteinases que hidrolisam as proteínas uma vez que as bactérias, geralmente, são incapazes de utilizar macromoléculas.⁶

4. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.

As bactérias, de modo geral, necessitam de condições físico - químicas favoráveis ao seu crescimento, e dentre estas encontram-se : temperatura, pH, pressão osmótica, concentrações de dióxido de carbono e de oxigênio.⁴¹

No que respeita ao pH, existem poucas espécies que, em pH menor do que 2 ou maior do que 10, podem crescer. A maioria das bactérias patogênicas cresce melhor em meio neutro.^{6,30,41}

Assim, de acordo com o pH ideal ao crescimento, estas podem ser classificadas em três categorias : acidófilas, neutrófilas e alcalófilas⁶.

A variação do pH se reflete no crescimento bacteriano, uma vez que influencia a atividade enzimática. A velocidade das reações químicas favorecidas pelas enzimas é influenciada pelo substrato. Estas enzimas podem estar presentes tanto extra como intracelularmente. As enzimas extracelulares atuam sobre os nutrientes, carboidratos, proteínas e lipídeos, que por meio das hidrolases favorecem a digestão. As enzimas localizadas na membrana citoplasmática estão relacionadas com o transporte de substâncias para dentro e para fora da célula, com a atividade respiratória, e com a estruturação da parede celular. O transporte pela membrana é fundamental, pois, para as suas complexas reações metabólicas, crescimento e reprodução, há necessidade do controle do fluxo de nutrientes^{28,41,42}.

Todavia, está perfeitamente demonstrado que, em condições de elevado pH (baixa concentração de íons H^+), a atividade enzimática das bactérias é inibida. Aliado a este fato, cada enzima possui um pH ótimo para a sua ação, segundo o qual reage com uma velocidade máxima³⁰.

KODUKULA et al.³⁰ postularam que o pH interno das bactérias é diferente do pH externo, sendo que, internamente, seu valor oscila em torno da neutralidade. Aliás, o mecanismo que mantém essa neutralidade ainda é desconhecido. Acrescido a este fato, a diferença do pH interior e exterior a célula pode determinar o mecanismo, através do qual, a atividade celular é influenciada pela concentração de íons hidrogênio.

Considera-se, todavia, a existência de um gradiente de pH através da membrana citoplasmática, que é responsável por conduzir energia para o transporte de nutrientes e componentes orgânicos para o interior da célula. Este gradiente pode ser afetado pela mudança no pH do meio, influenciando o transporte químico através da membrana.³⁰

Neste particular, o efeito do pH sobre o transporte químico pode ser direto ou indireto. Será direto quando o pH influenciar a atividade específica das proteínas da membrana (combinação com o grupo químico específico). O efeito indireto pode levar a alterações dos estados de ionização dos nutrientes orgânicos. Os componentes não ionizados são muito mais facilmente transportados através da membrana celular do que os ionizados. Desta forma, conforme o pH, pode haver aumento da disponibilidade de nutrientes, e um intenso transporte pode induzir inibição e efeitos tóxicos sobre a célula³⁰.

O crescimento bacteriano em pH inferior ao seu pH interno faz com que o citoplasma fique mais alcalino do que o meio, no entanto, quando o crescimento ocorre em pH alto, seu citoplasma fica mais ácido.³⁸ O crescimento bacteriano em alto pH pode levar a complicações fisiológicas e é muito complexo.

Frente ao exposto, importa enfatizar que a membrana citoplasmática relaciona-se a três funções essenciais: metabolismo, crescimento e divisão celular. Para tanto, o transporte de nutrientes e o retorno de seus catabólitos através de suas membranas, deve ser naturalmente realizado^{6,42}.

AMABIS et al.¹ e KODUKULA et al.³⁰, afirmam a possibilidade de haver uma inativação enzimática reversível (temporária), quando colocada em pH acima

ou abaixo do ideal para seu funcionamento, no entanto, quando novamente colocada em ótimo pH, a enzima pode readquirir sua atividade catalítica. Sua irreversibilidade pode ser observada em condições extremas de pH, em períodos longos.

Esta possível reversibilidade da atividade enzimática, observada frente ao retorno do pH ideal, não é encontrada quando se analisa o efeito da temperatura sobre a mesma atividade enzimática. Nesta nova situação, a velocidade das reações químicas é acelerada com o aumento da temperatura. Apesar disso, acima de certas temperaturas, o aquecimento de moléculas proteicas rompe ligações, alterando a estrutura tridimensional destas moléculas. Este processo de desnaturação é irreversível, visto que a proteína perde a atividade biológica¹

Sabe-se, pois, que a configuração tridimensional nativa de uma dada proteína é sua configuração mais estável em condições biológicas de temperatura e pH, e que essa configuração é consequência automática de sua sequência específica de amino-ácidos. Com isto, uma proteína desnaturada perde a configuração tridimensional característica e fica inativa.^{1,25,30}

5. CONSIDERAÇÕES EM TORNO DAS PROPRIEDADES ENZIMÁTICAS DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO EMPREGADO COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL

5.1. Inativação de Enzimas Bacterianas (Efeito Antibacteriano)

O hidróxido de cálcio é uma base forte, obtido a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio até sua transformação em óxido de cálcio (cal viva). Com a hidratação do óxido de cálcio, chega-se ao hidróxido de cálcio; outrossim, a reação entre o hidróxido de cálcio e o gás carbônico leva à formação de carbonato de cálcio¹⁸.

Dentre as propriedades do hidróxido de cálcio, destaca-se sua atividade antibacteriana. Esta é devida a liberação de íons hidroxila (OH^-), levando a um alto pH, que atinge valores próximos a 12,6, sendo que neste pH, há baixa concentração de íons H^+ .

Por conseguinte, o pH é um fator químico capaz de alterar o metabolismo enzimático das bactérias. Afeta, direta ou indiretamente, o transporte químico através da membrana citoplasmática. A inibição enzimática, temporária ou definitiva, dado ao alto ou baixo pH, atua sobre o crescimento e sobre a atividade bacteriana^{30,38}.

Em condições de pH extremo por longo tempo, a inativação enzimática das bactérias pode ser irreversível, porém, quando o pH não se mantiver em condições extremas, pode haver uma reversibilidade na atividade enzimática em nível de membrana citoplasmática bacteriana^{1,30}.

Salienta-se que, em canais radiculares infectados, ao preparo químico-mecânico é delegada a função de sanificação e modelagem. Neste particular, a função primária da medicação intracanal restringe-se à manutenção da sanificação antes conquistada. Em situações de exsudatos persistentes ou reabsorções externas, esta medicação assume seu efetivo papel.

O emprego de uma pasta de hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, assegura, ao mesmo tempo, duas propriedades particulares, uma relativa ao preenchimento (selamento) do canal, e outra biológica, inerente às suas propriedades específicas.

GORDON et al.¹⁴, ao analisarem os efeitos do hidróxido de cálcio no tecido pulpar bovino, salientam que o hidróxido de cálcio apresenta ação bactericida não específica no interior do canal, e que seu efeito depende exclusivamente de seu pH. Advogam que, como medicação intracanal, qualquer material como agente antibacteriano age sem o suporte dos mecanismos teciduais de defesa.

Isto posto, outras propriedades podem interferir no prognóstico do caso clínico em tratamento, como sua capacidade de neutralização de produtos ácidos, que tem efeito controlador na atividade osteoclástica em reabsorções radiculares externas.

Deste modo, BARRIL² afirma que a reabsorção óssea só existe em meio ácido, o que favorece a atividade dos osteoclastos sobre a matriz óssea, garantindo sua reabsorção. Outrossim, na digestão enzimática e ácida do colágeno e da hidroxiapatita do tecido mineralizado, participam algumas enzimas (fosfatases ácidas, desidrogenases, collagenases, hialuronidases), sendo que suas atividades máximas se dão em ambiente ácido.

Para mais, o hidróxido de cálcio proporciona uma mudança de pH, através da liberação de íons hidroxila que migram para a superfície externa, neutralizando o meio ácido promovido pela atividade osteoclástica (23,32,33).

5.2. Ativação Enzimática Tecidual (Efeito Mineralizador).

A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolítica (fosfo-hidrólise monoéster ortofosfórica) que atua por meio da liberação de fosfato inorgânico dos ésteres de fosfato⁴³. Acredita-se na sua relação com o processo de mineralização^{7,15,16,17,21,24,29,35,60}.

O pH ótimo para atuação da fosfatase alcalina varia de acordo com o tipo e concentração de substrato, com a temperatura e com a fonte de enzima, sendo que os limites estão por volta de um pH 8,6 a 10,3^{37,57}.

Esta enzima pode separar os ésteres fosfóricos de modo a liberar os íons fosfatos, que ficam livres, os quais reagem com os íons cálcio (provenientes da circulação sanguínea), para formar um precipitado na matriz orgânica, o fosfato de cálcio, que é a unidade molecular da hidroxiapatita⁴⁶.

Neste contexto, o hidróxido de cálcio ativa a fosfatase alcalina a partir de seu elevado pH, o que pode iniciar ou favorecer a mineralização^{36,58}.

SCIACKY & PISANTI⁴⁵, analisando a origem dos íons cálcio da ponte dentinária, após proteção de polpas expostas de cães com hidróxido de cálcio contendo cálcio radioativo Ca^{45} , e PISANTI & SCIACKY⁴⁴, injetando intravenosamente em cão solução de hidróxido de cálcio com cálcio radioativo, observaram através de autoradiografias da dentina neoformada, que os íons cálcio da barreira de dentina provêm da corrente sanguínea.

À sua vez, HOLLAND et al.²⁷, mediante análise histoquímica de polpas dentais de cães, após pulpotomia e capeamento pulpar com hidróxido de cálcio, de bário e estrôncio, mostraram a participação ativa dos íons cálcio do material capeador no processo de cura (barreira dentinária). Apresentaram-se como grânulações grosseiras, altamente birrefringentes à luz polarizada, e que reagiram positivamente ao método de Von Kossa. Esses resultados também foram encontrados por SEUX et al.⁴⁸.

Frente ao exposto, aceita-se que o íons hidroxila e o íon cálcio do hidróxido de cálcio atuam de forma sinérgica na mineralização.

De outro lado, a presença de íons pirofosfato no sítio da mineralização atua inibindo este processo. A metabolização do pirofosfato se dá a partir da ativação da fosfatase alcalina. HEITHERSAY²⁶ aclara que a redução da permeabilidade dos novos capilares pode ser diminuída a partir dos íons cálcio. A elevada

concentração de íons cálcio pode aumentar a atividade da pirofosfatase cálcio dependente, que está associada ao processo de mineralização.

Nesta mesma ordem de idéias é prudente as posições de FOREMAN & BARNES¹³, quando afirmaram que o hidróxido de cálcio é antes um iniciador e não apenas substrato para o reparo.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.

O hidróxido de cálcio constitui uma medicação intracanal bastante empregada. O seu grande sucesso é consequência de duas propriedades principais: atividade antibacteriana (dado à inibição de enzimas bacterianas) e a atividade mineralizadora (decorrente da ativação enzimática tecidual, de modo especial da fosfatase alcalina).

Na tentativa de explicação do mecanismo de ação do pH no controle da atividade enzimática bacteriana, é possível levantar a hipótese de uma inativação enzimática bacteriana irreversível, em condições extremas de pH, em longos períodos de tempo. E, também, uma inativação enzimática bacteriana temporária, quando do retorno do pH ideal à ação enzimática, havendo volta à sua atividade normal.

ESTRELA et al.¹¹, avaliando "in vitro" a difusão de íons hidroxila através da dentina, quando do emprego de diferentes pastas de hidróxido de cálcio, observaram que em períodos de 30, 45 e 60 dias, poucas foram as modificações do pH na luz do canal radicular, e na superfície externa do cimento. Nas pastas cujos veículos empregados foram soro fisiológico e o anestésico, o pH a 2 mm do vértice apical e na superfície do cimento, aos 30 dias, estava em torno de 7 a 8, permanecendo inalterado até aos 60 dias. No grupo em que o veículo era o polietileno glicol 400, observou-se um pH de 7 a 8 no cimento apical, somente aos 45 dias, sendo que também em nada alterou aos 60 dias. Internamente, na luz do canal radicular, todas as pastas utilizadas apresentaram-se com um alto pH, por volta de 12,0 durante o período de observação.

Outros trabalhos, todavia, também demonstraram diferentes alterações de pH nas superfícies de cimento, em diferentes terços da raiz e por variados períodos.^{58,39} Sabe-se, no entanto, que o pH em nível da superfície externa da raiz, quando do emprego do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, não é tão elevado quanto o pH interno e está relacionado à

maior ou menor permeabilidade dentinária, à velocidade de difusão de íons hidroxila e ao grau de calcificação dentinária presente.

Frente ao exposto, uma situação clínica pode suportar a hipótese levantada. Um dente portador de reabsorção radicular externa é tratado durante um certo período com hidróxido de cálcio. Após a obtenção do controle da reabsorção externa, o canal é obturado com gutta-percha e cimento. Posteriormente, durante a preservação observa-se retorno da atividade osteoclástica. A manutenção de um alto pH, gerado pelo hidróxido de cálcio na luz do canal radicular, inativa enzimas bacterianas de modo irreversível, decorrente do choque produzido pelo alto pH, em certo tempo. Entretanto, a inativação enzimática dos osteoclastos, no sítio da reabsorção externa, pode ser reversível devido principalmente ao pH não ter atingido um valor extremo.

The authors have studied the biologic effect of pH on the enzymatic activity of anaerobic bacteria. To do it, they have individually analyzed several factors, among which: concentration of hydrogen ions; structural composition of the cytoplasmic membrane of gram-negative bacteria; the effect of pH on the enzymatic activity of gram-negative bacteria; considerations with respect to enzymatic properties of calcium hydroxide used as intracanal medication - inactivation of bacterial enzymes (antibacterial effect) and enzymatic tissue activation (mineralizing effect).

The study of the mechanism of the pH effect in the control of bacterial enzymatic activity has permitted raising the hypothesis of an irreversible enzymatic inactivation at extreme conditions of pH over a long period of time as well as a temporary bacterial enzymatic inactivation at the return of antideal pH for enzymatic action, after which there is a return to normal activity.

UNITERMS: Anaerobic bacteria; Calcium hydroxide; External root resorption.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. AMABIS, J.M. et al. **Biologia**, São Paulo, Moderna, 1976. 286p.
2. BARRIL, I. Ostéoclasie et résorptions. **Rev. franç. Endod.**, v.6, n.4, p.21-41, 1987.
3. BAUMGARTNER, J.C. Serum IgG reative with oral anaerobic microorganisms associated with infections of endodontic origin. **Oral Microbiol. Immunol.** v.7, p.106-10, 1992.
4. BELL, R.P. **The proton in chemistry**, New York, Cornell University Press, 1959. p.7-17.
5. BROOK, I.; FRAZIER, E.H.; GHER, M.E. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abcess. **W0Oral Microbiol. Immunol.**, v.6, p.123-5, 1991.
6. BURNETT, G.W.; SCHUSTER, G.S. **W0Microbiologia oral e enfermidade infecciosa**, Buenos Aires, Panamericana, 1982. p.31-70.
7. CAMPBELL, A.K. **W0Intracellular calcium - It's Universal role as regulator**. New York, John Wiley & Sons Limited, 1985, p. 1-22.
8. COHEN, J.J.; KAISSIRER, J.P. **W0Acid-Base**. Boston, LittleBrow and Company, 1982. p.97-102.
9. DAHLÉN, H.; HOFSTAD, T. Endotoxic activities of lipopolysaccharides of microorganisms isolated from an infected root canal in macaca Cynomolgus. **Scand. J. Dent. Res.**, v.85, p. 272-78, 1977.
10. DAHLÉN, H.; BERGENHOLTZ, G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. **J.Dent.Res.**, v.59, n.6, p.1033-40, 1980.
11. ESTRELA, C. et al. Dentinal diffusuion of hydroxyl ions on various calcium hydroxide pastes. (in press).
12. FARBER, P.A.; SELTZER, S. Endodontic microbiology- I- **Etiology. J.Endod.**, v.14, n.7, p.363-71, 1988.
13. FOREMAN, D.C.; BARNES, I.E. A review of clacium hydroxide. **Int.Endod.J.**, v.23, n.6, p.283-97, 1990.
14. GORDON, T.M.; ALEXANDER, J.B. The effects of calcium hydroxide on bovine pulp tissue: variations on pH and calcium concentrations. **J. Endod.**, v.11, p.156-60, 1985.
15. GRANSTROM, G.; LINDE, A. A biochemical study of alkaline phosphatase in isolated rat incisor odontoblasts. **Arch.Oral Biol.**, v.17, p.1213-24, 1972.
16. GRANSTROM, G.; LINDE, A.; NYGREN, H. Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in rat incisor odontoblasts. **J. Histochem.Cytochem.**, v.26, p.359-68, 1978.
17. GRAMSTROM, G. Relationship of inorganic pyrophosphatase and pnitrophenyl-phosphatase activities of alkaline phosphatase in the microsomal fraction of isolated odontoblasts. **Scand.J. dent. Res.**, v.90, n.4, p.271-77, 1982.
18. GREENWOOD, N.N.; EARNSHAW, A. Chemistry of the elements. New York, **Pergamon Press**, 1984 p.117-54.
19. GRIFFE, M. et al. The relationship of bacteroides melaninogenicus to symptions associated with pulp necrosis. **Oral Surg.**, v.54, p.486-89, 1980.
20. GRIFFE, M. et al. Bacteroides melaninogenicus and dental infection. Some questions and some answers. **Oral Surg.**, v.54, p.486-89, 1982.
21. GUIMARÃES, S.A.C.; ALLE, N. Estudo histoquímico da reação tecidual ao hidróxido de cálcio. **Estomat. & Cult.**, v.8, n.1, p.79-82, 1974.
22. HAAPASALO, M. **W0The genus bacteroides in human dental root canal infections**. Helsink, Finland, 1986. 87p Dissertation (Master) - University of Helsink.
23. HAMMARSTROM, L. et al. Effect of calcium hydroxide treatment on periapical rep[air and root resorption. **Endod. Dent. Traumatol.**, v.2, p.184-9, 1986.
24. HARADA, M. et al. Inorganic pyrophosphatase activity of purified bovine pulp alkaline phosphatase at physiological pH. **W0J. Dent.Res.**, v.64, n.2, p.125-7, 1986.
25. HARPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A. **Manual de química fisiológica**, São Paulo, Ed. Atheneu, 1982, p.13-18.
26. HEITHERSAY, G.S. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. **W0J. Brit. Endod.Soc.**, v.8, p.74-94, 1975.

27. HOLLAND, R.; et al. Histochemical analysis of the dog's dental pulp capping with calcium, barium, and strontium hydroxides. **J. Endod.**, v.8, n.10, p.444-7, 1982.
28. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **W0Biologia celular e molecular**, 5ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. 260p.
29. KITAMURA, H. **W0Embriology of the mouth and related structures**, Tokio, Maruzen, 1989, p.45-57.
30. KODUKULA, P.S.; PRAKASAM, T.B.S.; ANTHONISEN, A.C. Role of pH in biological wastewater treatment processes. In: BAZIN, M.J.; PROSSER, J.I. **W0Physiological models in microbiology**, Florida, CRC Press Boca Raton, 1988, p.113-34.
31. KONOW, L.V.; NORD, C.E.; NORDENRAM, A. Anaerobic bacteria in dental alveolar infections. **W0Int. J. Oral Surg.**, v.10, p.313-22, 1981.
32. LENGHEDEN, A. et al. Effect of immediate calcium hydroxide treatment and permanent root-filling on periodontal healing in contaminated replanted teeth. **W0Scand. J. dent. Res.**, v.99, n.2, p.139-46, 1991.
33. LENGHDEN, A. et al. Effect of delayed calcium hydroxide treatment on periodontal healing in contaminated replanted teeth. **W0Scand. J. dent. Res.**, v.99, n.2, p.147-53, 1991.
34. LOESCHE, W.J. **W0Cárie Dental - Uma infecção tratável**. Rio de Janeiro, Ed. Cultura Médica, 1993, p.17-31.
35. MESSER, H.H. et al. Effect phosphate deficiency on pulp alkaline phosphatase and Ca^{2+} , Mg^{2+} - ATPase activity in rats. **W0J. dent. Res.**, v.61, n.9, p.1110-12, 1982.
36. MITCHELL, O.F.; SHANKWALKER, G.B. Osteogenic potential of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. **W0J. dent. Res.**, v.37, p.1157-63, 1958.
37. MOURA, R.A.A. **W0Técnicas de laboratório**, São Paulo, Atheneu, 1982. p.230-56.
38. NEIDHART, F.C. et al. **W0Physiology of the bacterial cell - A molecular approach**, Massachusetts, Ed. Sinaver, 1990. p.226-46.
39. NERWICH, A.; FIGDOR, D.; MESSER, H.H. pH changes in root dentine over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. **W0J. Endod.**, v.19, n.6, p.302-6, 1992.
40. NEWMAN, M.G.; NISENGARD, R. **W0Oral microbiology and Immunology**, London, Saunders, 1988, p.55-125.
41. NOLTE, W.A. **W0Oral microbiology**, 4ª ed. London, Mosby, 1982, p.3-37.
42. ORTEN, J.M.; NEUHAUS, O.W. **W0Human Biochemistry**, 10 ed., London, Mosby, 1982, p. 61-98.
43. OSBORN, J.W.; TEN CATE, A.R. **W0Histologia dental W0Avançada**, 4ª ed. São Paulo, Quintessence Books, 1988. p. 81-95.
44. PISANTI, S.; SCIAKY, I. Origin of calcium in the repair wall after pulp exposure in the dog. **J. dent. Res.**, v.43, p.641-44, 1964.
45. SCIAKY, I.; PISANTI, S. Localization of calcium placed over amputated pulps in dog's teeth. **W0J. dent. Res.**, v.39, p. 1128 - 32, 1960.
46. SELTZER, S.; BENDER, I.B. **W0A polpa dental**, 2. ed. Rio de Janeiro, Labor, 1979, 499 p.
48. SEUX, D. et al. Odontoblast like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide containing cement. **Archs. Oral Biol.**, v. 36, n.2, p.117-28, 1991.
49. SKALAVOUNOS, A. et al. Anaerobic bacteria in the dental alveolar abscess. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.15, p.288-91, 1986.
50. STASHENKO, P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod. dent. Traumat.**, v.6, p.89-96, 1990.
51. SUNDQVIST, G. **W0Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. Umeo. Sweden, 1976. 94p. Dissertation (Master) - University of Umeo.
52. SUNDQVIST, G. et al. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. **W0Infect. Immun.**, v.25, n.2, p. 685-93, 1979.
53. SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E. Neutrophil chemotaxis induced by anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. **Scand. J. Dent. Res.**, v.8, p.113-121, 1980.
54. SUNDQVIST, G. et al. Phagocytosis of bacteroides melaninogenicus and bacteroides gingivalis in vitro by human neutrophils. **J. Periodont. Res.**, v.17, p.113-17, 1982.
55. SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.7, p.257-62, 1992.
56. SUNDQVIST, S.W. Ecology of the root canals flora. **J. Endod.**, v.18, n.9, p.427-30, 1992.
57. THOMPSON, S.W. **W0Selectes histochemical and histopathological methods**. Florida, Charles C. Thomas, 1966, p.615-46.
58. TRONSTAD, L. et al. pH changes and dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. **J. Endod.**, v.7, p.17-21, 1981.
59. ZIELKE, D.R.; HEGGERS, J.P.; HARRISON, J.W. A statistical analysis of anaerobic versus aerobic culturing in endodontic therapy. **Oral Surg.**, v.42, p.8-30, 1976.
60. WOLTGENS, J.H.M. et al. Relationship of inorganic pyrophosphatase and alkaline phosphatase activities in Hamster molars. **Calcif. Tissue Res.**, v.5, p.333-43, 1970.
61. YOSHIDA, M. et al. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth periapical pathosis. **J. Endod.**, v.13, n.1, p.24-28, 1987.