

## INACTIVACION PERMANENTE DE LA AMILOPSINA PANCREATICA POR EL ACIDO CLORHIDRICO LIBRE Y POR LA PEPSINA

Por ROBERTO LLAMAS,  
del Instituto de Biología.

La acción de las encimas está sujeta a diversas circunstancias, una de las cuales es la acidez, alcalinidad o neutralidad del medio en que actúan; algunas de ellas tienen su punto óptimo, y por lo tanto su máxima actividad, en pH neutro o que oscila ligeramente hacia la basicidad o hacia la acidez, un buen ejemplo lo constituye la amilasa salival o ptialina; otras tienen su punto óptimo en acideces que van desde el pH 2 hasta el pH 4 como la pepsina, y algunas, finalmente, actúan en medios alcalinos como las encimas del páncreas. Cuando una encima que normalmente ejerce su acción en determinado medio, alcalino por ejemplo, se pone en contacto con ácidos, se inactiva por completo y es incapaz de obrar sobre el substrato; las leyes de la acción enzimática establecen que si la acidez se neutraliza y el pH se eleva hasta alcanzar la alcalinidad óptima de la encima, esta es capaz de recobrar sus propiedades; este enunciado de las leyes de la acción enzimática tiene sus restricciones, puesto que el ácido puede, según las circunstancias, destruir parcial o totalmente a la encima, en cuyo caso la recuperación de su poder es lógicamente imposible.

Hemos llamado inactivación permanente de una encima a la pérdida total o parcial de su poder (hidrolítico en el caso de las encimas digestivas), cuando después de haber sido sometidas a la acción de medios progresivamente ácidos o progresivamente alcalinos durante un tiempo determinado, se restablece el pH adecuado para su acción; las encimas así tratadas pueden tener, un poder hidrolítico menor que la encima que no lo ha sido, esta disminución de la capacidad enzimática de las primeras con respecto a las segundas

representa la destrucción parcial de las mismas o sea la inactivación permanente.

La opinión comunmente expresada en diversas Obras de Farmacología y de Terapéutica así como de Bioquímica, es la de que la amilopsina es completamente inactivada y destruida cuando se le somete a la acción de acideces bajas (hasta de 0.006 de ácido clorhídrico por cien), y que la tripsina es la única capaz de ofrecer resistencia a la acción de los hidrogeniones.

Hemos estudiado la inactivación permanente de la amilopsina por el ácido clorhídrico a distintas concentraciones que van desde uno hasta cinco por mil, es decir, a las concentraciones en que el ácido clorhídrico puede encontrarse en el contenido gástrico, y la inactivación de la propia amilopsina en estos medios y en presencia de tripsina.

#### Reactivos utilizados

Se utilizó pancreatina comercial, desecada a temperatura constante de 37.5 grados centigr. El substrato fué almidón de arroz en solución acuosa al uno por ciento. La solución de ácido clorhídrico se preparó a partir de la solución acuosa del mismo de densidad 1.19, con un contenido efectivo de HCl de 37.23 g. por ciento; hechos los cálculos correspondientes se obtuvo una solución al uno por ciento de ácido clorhídrico puro y cuantificable como ácido libre.

El almidón empleado no redujo espontáneamente el licor de Fehling. El control de este reactivo demostró que 10 c.c. del mismo eran reducidos por 0.055 de glucosa, o sea que dos centímetros del mismo equivalían a 0.011 del glúcido mencionado. Los cálculos han sido expresados, simplemente por comodidad, en glucosa, y no en el glúcido terminal de la hidrólisis del almidón o sea en maltosa.

#### Método de estudio

Series de nueve tubos con amilopsina inactivada por el ácido clorhídrico.

Tubos (1a., 2a. y 3a. series).

1.—0.05 centigr. de almidón (5 c.c. de la solución al 1%), 0.05 centigr. de pancreatina, 1c.c. de Sol. al 1% de ácido clorhídrico (acidez al 1 por mil), Agua dest. 4 c.c., Volumen total 10 c.c.

- 2.—0.05 centigr. de almidón, 0.05 centigr. de pancreatina, 1.5 cc. de Sol. al 1% de ácido clorhídrico (acidez al 1.5 por mil), Agua dest. 3.5 c.c., Vol. total 10 c.c.
- 3.—0.05 centigr. de almidón, 0.05 centigr. de pancreatina, 2 c.c. de Sol. al 1% de ácido clorhídrico (acidez al 2 por mil), Agua dest. 3 c.c., Vol. total 10 c.c.
- 4.—0.05 centigr. de almidón, 0.05 centigr. de pancreatina, 2.5 c.c. de Sol. de ácido clorhídrico al 1% (acidez al 2.5 por mil), Agua dest. 2.5 c.c., Vol. total 10 c.c.
- 5.—0.05 centigr. de almidón, 0.05 centigr. de pancreatina, 3 c.c. de Sol. de ácido clorhídrico al 1% (acidez al 3 por mil), Agua dest. 2 c.c., Vol. total 10 c.c.
- 6.—0.05 centigr. de almidón, 0.05 centigr. de pancreatina, 3.5 c.c. de Sol. de ácido clorhídrico al 1% (acidez al 3.5 por mil), Agua dest. 1.5 c.c., Vol. total 10 c.c.
- 7.—0.05 centigr. de almidón, 0.05 centigr. de pancreatina, 4 c.c. de Sol. de ácido clorhídrico al 1% (acidez al 4 por mil), Agua dest. 1 c.c., Vol. total 10 c.c.
- 8.—0.05 centigr. de almidón, 0.05 centigr. de pancreatina, 4.5 c.c. de Sol. de ácido clorhídrico al 1% (acidez al 4.5 por mil), Agua dest. 0.5 c.c., Vol. total 10 c.c.
- 9.—0.05 centigr. de almidón, 0.05 centigr. de pancreatina, 5 c.c. de Sol. de ácido clorhídrico al 1% (acidez al 5 por mil), Vol. total 10 c.c.

Se dejó que el ácido clorhídrico estuviese en contacto con la pancreatina durante media hora, y se sujetó cada tubo a agitaciones repetidas para hacer más íntima la mezcla; en seguida se neutralizó cada tubo con solución de carbonato de sodio hasta pH. de 7.8. Hay que hacer notar que después de obtenido este pH alcalino, óptimo para la acción de la encima, volvía a descender convirtiéndose en ligeramente ácido algunos minutos después de colocados los tubos en el Baño María, por lo que se hizo necesario restablecer la alcalinidad y vigilar constantemente si el pH permanecía en sus límites normales. Los tubos se mantuvieron durante dos horas en el Baño María a temperaturas comprendidas entre 38 y 40 grados centígrados.

Una vez enfriado el contenido de los tubos, se completaron los volúmenes a 25 c.c. y se filtraron a través de papel, en los líquidos obtenidos se procedió a cuantificar el glúcido reductor expresándolo en glucosa.

#### Resultados.

Tubos (Primera serie).

- 1.—Acidez al uno por mil, Líquido gastado 5.2, Fehling 2 c.c., Glucosa 0.211 por ciento.
- 2.—Acidez al 1.5 por mil, Líquido gastado 5.2, Fehling 2 c.c., Glucosa 0.211 por ciento.
- 3.—Acidez al 2 por mil, Líquido gastado 5.4, Fehling 2 c.c., Glucosa 0.203 por ciento.
- 4.—Acidez al 2.5 por mil, Líquido gastado 5.8, Fehling 2 c.c., Glucosa por ciento 0.189.
- 5.—Acidez al 3 por mil, Líquido gastado 5.8, Fehling 2 c.c., Glucosa por ciento 0.189.
- 6.—Acidez al 3.5 por mil, Líquido gastado 5.8, Fehling 2 c.c., Glucosa por ciento 0.196.
- 7.—Acidez al 4 por mil, Líquido gastado 5 c.c., Fehling 2 c.c., Glucosa por ciento 0.220.
- 8.—Acidez al 4.5 por mil, Líquido gastado 6.0, Fehling 2 c.c., Glucosa por ciento 0.163.
- 9.—Acidez al 5 por mil, Líquido gastado 5.5 c.c., Fehling 2 c.c., Glucosa por ciento 0.200.

#### Resultados.

Segunda y tercera series.

Cantidades por ciento de glucosa en cada una.

Tubos.

- 1.—0.207 y 0.196.
- 2.—0.220 y 0.203.
- 3.—0.200 y 0.203.
- 4.—0.196 y 0.196.
- 5.—0.194 y 0.203.
- 6.—0.196 y 0.194.
- 7.—0.183 y 0.200.
- 8.—0.194 y 0.183.
- 9.—0.196 y 0.172.

Promedios de resultados de las tres series anteriores.

Tubos.

1.—0.205 de glucosa por ciento.

2.—0.211 " " " "

3.—0.233 " " " "

4.—0.194 " " " "

5.—0.195 " " " "

6.—0.193 " " " "

7.—0.201 " " " "

8.—0.187 " " " "

9.—0.189 " " " "

Series de tubos con 0.05 centigr. de pancreatina, 0.05 centigr. de almidón, Agua hasta Vol. total de 10 c.c.

Alcalinidad con carbonato de sodio hasta pH 7.8.

Se colocaron en Baño María a temperatura de 38 a 40 grados durante dos horas.

Resultados.

Promedio de los cinco tubos testigos que componían la serie. Glucosa 0.296 por ciento.

Se deduce de lo anterior que existe inactivación permanente de la amilopsina pancreática cuando se le somete a la acción del ácido clorhídrico durante treinta minutos. Se puede observar que las primeras tres concentraciones de ácido, o sean las de 1, 1.5 y 2 por mil, respectivamente, son las que producen inactivación permanente menor de la encima. Tomando la cifra mayor de glucosa obtenida (tubo 3), es fácil deducir que la destrucción mínima de la amilopsina en estos experimentos, representa el 14.50 por ciento, considerando como valor de cien a la glucosa obtenida como promedio de los tubos testigos (0.296 por ciento). La inactivación máxima del fermento, permanente también, representa, a su vez, el 33.41 por ciento; quiere esto decir que con acideces bajas o medias, se aprovecharán solamente 85.50 partes de amilopsina y que con acideces mayores el aprovechamiento será de 66.59 partes sobre cien.

Es de notarse que a partir de la acidez de 2.5 por mil, la inactivación permanente de la amilasa pancreática es sensiblemente igual hasta llegar a la acidez máxima estudiada o sea la de 5 por mil.

Destrucción o inactivación permanente de la amilopsina sometida a la acción del ácido clorhídrico durante noventa minutos.

Tres series de nueve tubos con acideces (ácido clorhídrico libre), de 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 7.5 por mil respectivamente, 0.05 centigr. de pancreatina, 0.05 centigr. de almidón y agua dest, hasta Vol. Total de 10 c.c.

Al cabo de noventa minutos se alcalinizan con carbonato de sodio hasta pH 7.8 y se someten, durante dos horas a temperatura constante entre 38 y 40 grados centígrados en el Baño María.

### Resultados.

Primera, segunda y tercera series.

Cantidades por ciento de glucosa en cada una.

Tubos.

1.—0.183	0.183	0.169.
2.—0.176	0.183	0.169.
3.—0.183	0.169	0.183.
4.—0.183	0.160	0.176.
5.—0.157	0.157	0.160.
6.—0.160	0.169	0.160.
7.—0.166	0.160	0.166.
8.—0.160	0.160	0.157.
9.—0.140	0.157	0.136.

Promedio de los resultados de las tres series anteriores.

Tubos.

1.—0.173	de glucosa por ciento.		
2.—0.176	"	"	"
3.—0.178	"	"	"
4.—0.173	"	"	"
5.—0.158	"	"	"
6.—0.163	"	"	"
7.—0.164	"	"	"
8.—0.159	"	"	"
9.—0.144	"	"	"

Serie de tubos testigos.

Tres tubos con 0.05 centigr. de pancreatina, Almidón 0.05 centigr., Agua hasta Vol. total de 10 c.c., Alcalinizados con carbonato de sodio hasta pH 7.8. Dos horas en baño de María a temperaturas constantes entre 38 y 40 grados centígrados.

Promedio de tres cuantificaciones. Glucosa por ciento 0.288.

La inactivación permanente de la emilopsina, es por lo tanto, mayor cuando ha sido sometida a la acción de la acidez clorhídrica durante noventa minutos. La cantidad de glúcido reductor liberado en este caso es menor a medida que la concentración ácida aumenta, existe pues franca relación entre la mencionada acidez y el grado de inactivación permanente de la encima; el por ciento de glucosa más bajo, en efecto, se obtuvo con la acidez máxima de cinco por mil y el más alto en tubos cuya acidez es baja.

La inactivación permanente mínima, por lo tanto, es de 38.33 por ciento, lo que quiere decir que la amilopsina sometida durante noventa minutos a acideces de uno a dos por mil, conserva tan solo 61.77 por ciento de su actividad original. Sometida a acideces mayores (cinco por mil), la inactivación permanente máxima representa el cincuenta por ciento.

Inactivación permanente de la amilopsina tratada con pepsina a diversas concentraciones de ácido clorhídrico.

Tres series de tubos con 0.025 gr. de pepsina, 0.05 de almidón, 0.05 de pancreatina y ácido clorhídrico al 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 por mil respectivamente.

Durante un hora se mantuvieron los tubos en baño de María a temperaturas de 38 a 40 grados C., en seguida se alcalinizaron con carbonato de sodio hasta pH 7.8.

Se tuvieron después dos horas en baño de María a temperaturas de 38 a 40 grados.

#### Resultados.

Promedios de las tres series.

Tubos.

- 1.—0.208 de glucosa por ciento.
- 2.—0.208 " " " "
- 3.—0.301 " " " "
- 4.—0.107 " " " "
- 5.—0.204 " " " "
- 6.—0.301 " " " "
- 7.—0.107 " " " "
- 8.—0.108 " " " "
- 9.—0.107 " " " "

Serie de tubos testigos.

Tres tubos con 0.05 de pancreatina, 0.05 gr. de almidón. Alcalinizados con carbonato de sodio hasta pH de 7.8. Agua hasta volumen total de 11 c.c.

Promedio de las tres series. Glucosa 0.411 por ciento.

La inactivación máxima de la amilopsina, en estas condiciones, representa el 74.24 por ciento de potencia original, y se obtuvo con las acideces de 5.4 y 2.5 de ácido clorhídrico por mil; en general se observa que la inactivación es mayor a medida que el medio es más ácido, lo que puede explicarse por la propia concentración mayor de hidrogeniones, o por la acción de la proteasa gástrica.

La inactivación mínima representa el 26.79 por ciento de la actividad original, y se obtuvo con las acideces bajas, con excepción del tubo seis (3.5 por mil).

Parece desprenderse de estos experimentos que la inactivación de la amilopsina es mayor cuando a la acidez clorhídrica se añade pepsina; quizá esta proteasa sea capaz de desintegrar parcialmente a la amilopsina, lo que no improbable si se piensa que a las enzimas se les considera como de estructura proteínica.

En ninguno de los experimentos hemos logrado inactivaciones completas de la amilopsina; probablemente se lograrían permitiendo a los iones hidrógeno, o a estos y a la pepsina, mayor tiempo de acción sobre la encima amilolítica.

Febrero de 1943.