

R Esp. Fisiol.  
Tom. I, Fasc. 2, páginas 150 a 164, 1945.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas  
Sección de Fisiología, Barcelona  
(Prof. Juan Jiménez Vargas)

## **Sobre la influencia del alcohol etílico en la actividad de la pepsina**

por J. JIMÉNEZ VARGAS y J. MONCHE ESCOBOS

Recibido para publicar el día 28 de abril de 1945

### **Introducción**

Desde los trabajos de Krijgsman (7) poco más se ha hecho en relación con el tema objeto de las presentes líneas, sobre el cual ninguna referencia concreta hemos hallado en la bibliografía consultada. Se han estudiado las influencias de diversos factores sobre la acción de la pepsina, aunque en la mayoría de los casos son poco conocidas. Así se ha investigado la acción de metales pesados (Humme) (5), del yodo (Herriot) (4), hidrato de cloral (Heiduschka y Forster) (3), colessterina (Romesow y Mahossowitsch) (13), la de algunas hormonas, como la adrenalina, insulina y pituitrina (Permiakov) (12), del biuret, urea y ureas sustituidas (Banerjee) (2), y de algunas vitaminas (Martison y Tetinenko) (10). Pero nos ha llamado particularmente la atención la falta de datos bibliográficos, por lo menos en las revistas que hemos podido consultar, sobre la acción del alcohol, objeto del presente trabajo. Dada la importancia del alcohol en la alimentación humana, y dentro de la orientación del plan de trabajos que venimos desarrollando, nos ha parecido interesante estudiar comparativamente — y, por lo tanto, en identidad de condiciones experimentales — la acción de la pepsina sobre disoluciones de proteínas, en presencia y ausencia de alcohol etílico.

## Parte experimental (\*)

Hemos empleado en todas las experiencias el mismo preparado comercial de clorhidrato de betaína y pepsina, eligiendo el suero sanguíneo de perro, después de numerosas experiencias de tanteo con otros substratos igualmente adecuados, por ser el que nos ha permitido apreciar más claramente la evolución de los sistemas correspondientes, a cuyo fin hemos aplicado las técnicas de la fotometría fotoeléctrica, descritas en un trabajo anterior (6), comparativamente con las del análisis químico.

Se fundan las primeras en el aumento de transparencia del medio estudiado, a medida que progresa la acción de la pepsina durante el curso del proceso. Las segundas, en cambio, en el aumento de los grupos carboxílicos terminales, como consecuencia de las degradaciones moleculares debidas a la digestión péptica sobre las albúminas del suero estudiado. Como es sabido, dichas degradaciones moleculares no alcanzan nunca, bajo la acción de la pepsina — una endopeptidasa — a los aminoácidos y sí, en cambio, a las llamadas peptonas, que verosímilmente no son más que combinaciones de cadenas de aminoácidos del tipo de los polipéptidos, si bien de mayor tamaño molecular, y, por lo tanto, productos de degradación incompleta, cuya propiedad característica es, precisamente, la de ser precipitables por el alcohol.

Para las determinaciones químicas, hemos seguido el método de titulación al formol, tan conocido como adecuado al caso presente. La determinación de los cloriones totales se efectuó acidulando con ácido nítrico unas muestras previas de líquidos problema, después de tratados con formol y con la disolución de sosa cáustica hasta reacción alcalina, para agregarles, una vez así acidulados, un exceso de disolución valorada de nitrato de plata y determinar el exceso por el método del sulfocianuro.

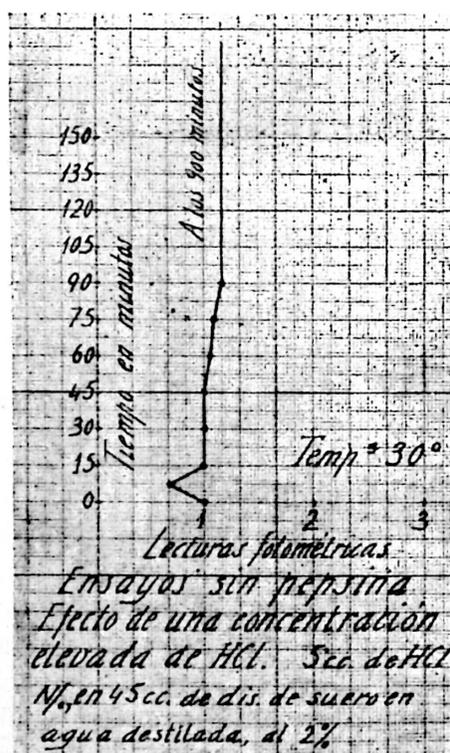
De este modo, los cloriones totales expresados en ácido clorhídrico, correspondientes a cada ensayo efectuado empleando como agente la quinceava parte del volumen total correspondiente a la disolución de 10 tabletas de clorhidrol pepsina en 375 c. c. de agua destilada, fueron 11 mgrs. de HCl por 2 cen-

(\*) Con la colaboración de las señoritas Rosario Quintana y Mercedes Massana.

tímetros cúbicos de suero sanguíneo, incluyendo, naturalmente, los cloriones del suero. La cantidad respectiva de pepsina fué de 196 mgrs., deducida del contenido de cada tableta original.

### Gráficas fotométricas

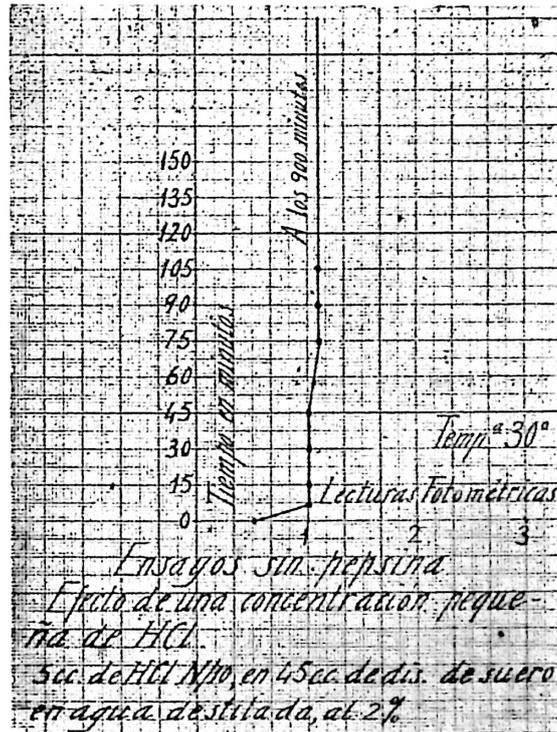
Todas las gráficas correspondientes a las determinaciones con nuestro fotómetro fotoeléctrico las hemos obtenido por lectura directa de los valores de las distintas desviaciones del



Gráfica núm. 1

espejo del galvanómetro, mediante proyección del haz de rayos reflejados sobre una pantalla de papel milimetrado. Se emplearon al efecto disoluciones de seroalbúmina (suero sanguíneo al 2 %), operando con los dos fotómetros dispuestos en la estufa del modo indicado en un trabajo anterior (6), según el método diferencial. La cantidad de líquido empleado en cada

determinación fué la misma de la capacidad respectiva de los tubos fotométricos, o sea de 50 c. c. Los demás detalles operatorios se indican en cada gráfica.



Gráfica núm. 2

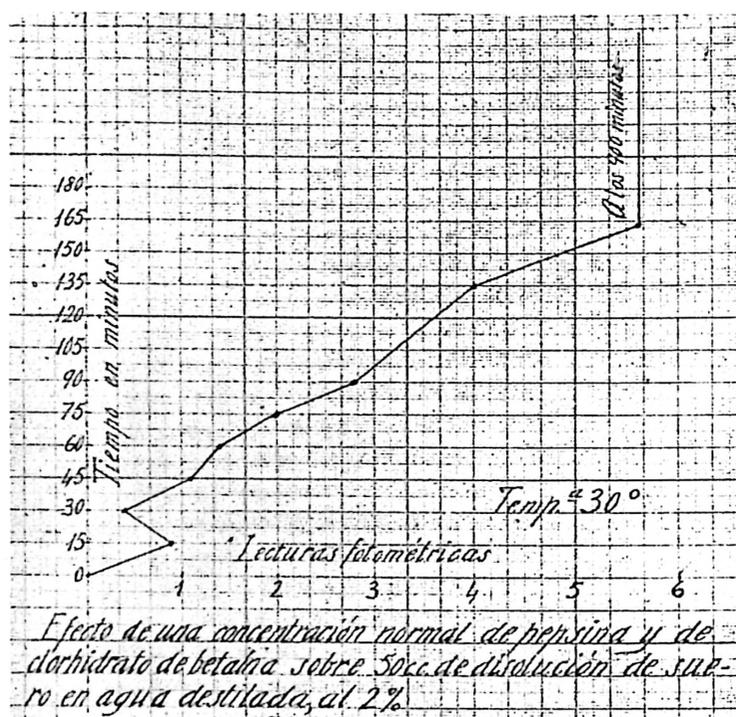
### Valores obtenidos por método químico

Estas gráficas las hemos obtenido operando del modo siguiente: Se diluyeron 750 c. c. de formol al 40 % en 1.000 centímetros cúbicos de agua para neutralizarlo seguidamente con la cantidad necesaria de disolución de sosa cáustica aproximadamente normal, empleando la fenolftaleína como indicador, hasta coloración rosa franca persistente. Una vez conseguido esto, se agregó la cantidad suficiente de agua destilada hasta completar el volumen de 2.250 c. c., para dividirlo en 15 partes idénticas, medidas con el mayor cuidado.

Se prepararon por separado 1.500 c. c. de disolución de

seroalbúmina al 2 % para dividirla en quince partes igualmente idénticas, efectuándolo también con la mayor precisión.

Se dispusieron finalmente 15 tabletas disueltas en 375 centímetros cúbicos de agua destilada, para dividir la disolución

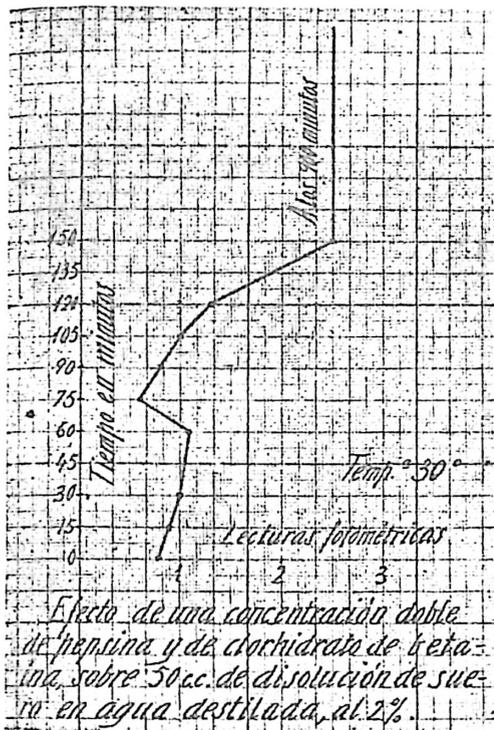


Gráfica núm. 3

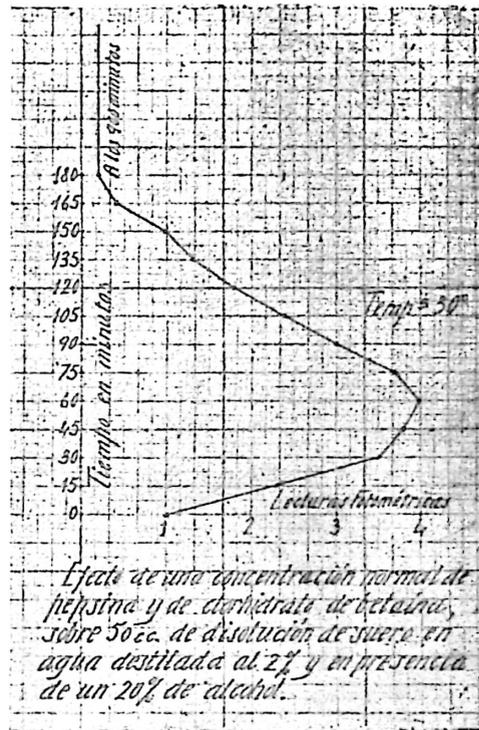
resultante en otras quince partes iguales, como precedentemente.

Se tuvieron preparados 15 erlenmeyers numerados, llenando cada uno con la quinceava parte de suero sanguíneo, permaneciendo todos a la temperatura de 30° y añadiéndoles seguidamente en la misma forma la quinceava parte de pepsina clorhídrica, cuidando de efectuarlo en conjunto durante el mismo intervalo de tiempo.

Inmediatamente se separaron 6 erlenmeyers (tiempo 0 de las gráficas), para agregarles la quinta parte de la disolución de formol neutralizado, con lo que cesa instantáneamente la acción de la pepsina, desapareciendo, además, en el acto, la co-



Gráfica núm. 4



Gráfica núm. 5

loración de dicha disolución, debida a la fenoltaleína, conforme se ha expuesto.

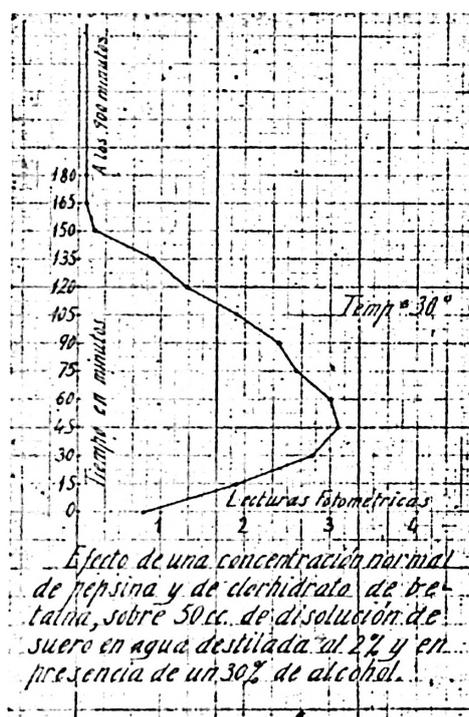
Cinco de los erlenmeyers se emplearon para la determinación de los cloriones totales, acidulando con unas gotas de disolución concentrada de ácido nítrico, agregando a cada uno un exceso de disolución décimo normal de nitrato de plata para valorar el exceso de la disolución de dicho nitrato inalterado, con sulfocianuro amónico décimo normal, en presencia de alumbre férrico amoniacal, como indicador, todo ello en la forma y con los resultados que exponemos.

En el erlenmeyer restante se determinó la acidez total con disolución de sosa décimo normal, conforme se expondrá más adelante.

Así, pues, a cada uno de los intervalos de tiempo que constan en las dos gráficas correspondientes, se fueron retirando los erlenmeyers respectivos para agregarles la disolución de

formol, con lo cual se interrumpía inmediatamente la acción de la pepsina, lo que permite efectuar después con comodidad las determinaciones de acidez total.

Como que se efectuaron dos tipos de ensayos diferentes, operando en ausencia o presencia de alcohol, respectivamente,



Gráfica núm. 6

en series de tres erlenmeyers por determinación correspondiente a cada ensayo, se necesitaron en total para las diez determinaciones de que consta cada una de las dos gráficas, treinta erlenmeyers, es decir, en conjunto sesenta.

De este modo hemos efectuado las determinaciones de acidez total hasta la reaparición de la coloración de la disolución de fenolftaleína inicialmente presente en la disolución de formol, practicándose, pues, tres determinaciones por cada uno de los puntos de cada gráfica, para asignar a dichos puntos el valor correspondiente a la media aritmética de los tres resultados hallados por determinación.

Cada determinación se efectuó, además, tomando como punto de viraje de la fenolftaleína, la media aritmética de los valores correspondientes a la coloración rosa y roja de la misma.

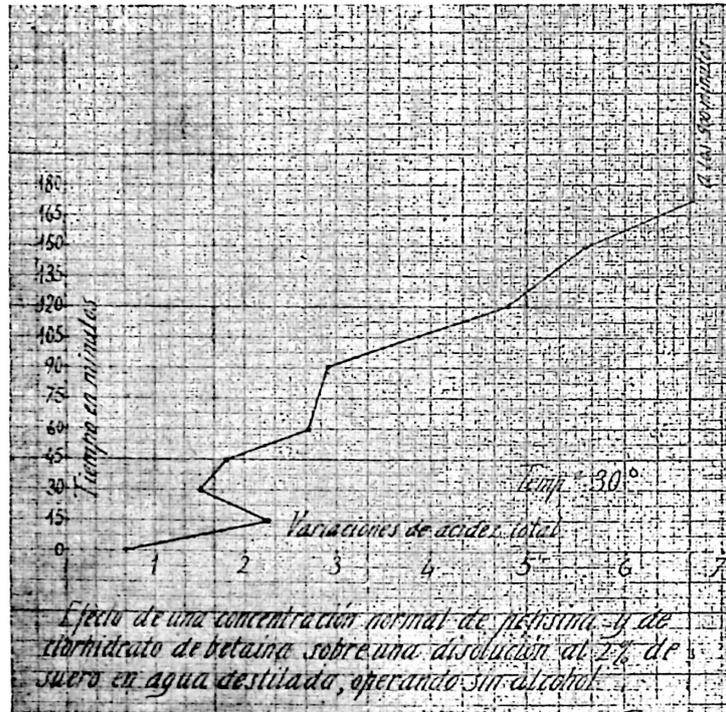
En los ensayos efectuados en presencia de alcohol, se emplearon 30 c. c. de alcohol por cada 120 c. c. de sustrato, lo que corresponde a una concentración de alcohol del 24 %.

Después de varios ensayos previos de tanteo y a fin de aumentar en lo posible la precisión de las determinaciones correspondientes, hemos procedido a la determinación total de acidez de cada erlenmeyer, añadiendo siempre la misma cantidad de disolución de sosa décimo normal a todos ellos, medida en efecto con una pipeta aforada, para completar ulteriormente con una microbureta la neutralización correspondiente a los dos virajes rosa y rojo de la fenolftaleína, ya mencionados. A continuación exponemos debidamente tabulados los valores correspondientes a cada una de las gráficas respectivas que ilustran el presente trabajo.

#### Ensayos efectuados en ausencia de alcohol.

*Valores correspondientes a la gráfica núm. 7.*

Tiempo en minutos	Valores medios de Na OH N/10 para viraje en:		Valores medios correspondientes	Diferencias
	Color rosa	Color rojo		
0	69,45 c. c.	70 c. c.	69,7	69,7 — 69 = 0,7
15	70,9, »	71,3 »	71,1	71,1 — 69 = 2,1
30	70 »	71 »	70,5	70,5 — 69 = 1,5
45	70,2 »	71,5 »	70,8	70,8 — 69 = 1,8
60	71,5 »	72 »	71,7	71,7 — 69 = 2,7
90	71,2 »	72,7 »	71,9	71,9 — 69 = 2,9
120	73,6 »	74 »	73,8	73,8 — 69 = 4,8
150	74 »	75,2 »	74,6	74,6 — 69 = 5,6
180	74,45 »	77 »	75,7	75,7 — 69 = 6,7
900	74,55 »	75,55	75,0	75 — 69 = 6,0



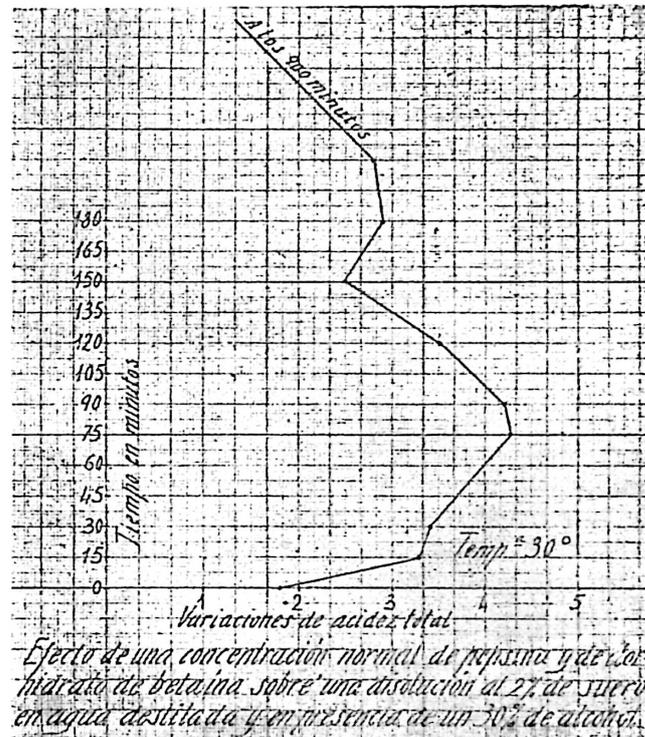
Gráfica núm. 7

## Ensayos efectuados en presencia de alcohol.

(Conc. de alcohol = 30 por 100.)

Valores correspondientes a la gráfica núm. 8.

Tiempo en minutos	Valores medios de Na OH N/10 para viraje en:		Valores medios correspondientes	Diferencias
	Color rosa	Color rojo		
0	70 c. c.	71,7 c. c.	70,8	70,8 — 69 = 1,8
15	72 »	72,75 »	72,3	72,3 — 69 = 3,3
30	72,1 »	72,8 »	72,4	72,4 — 69 = 3,4
45		73,79 »	73,3	73,3 — 69 = 4,3
60	72,9 »	73,60 »	73,2	73,2 — 69 = 4,2
90	72 »	73 »	72,5	72,5 — 69 = 3,5
120	71 »	72 »	71,5	71,5 — 69 = 2,5
150	72 »	71,8 »	71,9	71,9 — 69 = 2,9
180	72 »	71,6 »	71,8	71,8 — 69 = 2,8
900	69 »	70 »	69,5	69,5 — 69 = 0,5



Gráfica núm. 8

### Resultados

Del examen de las gráficas fotométricas podríamos deducir la acción del ácido clorhídrico aisladamente y junto con la pepsina, a diversas concentraciones y en presencia o ausencia del alcohol, y establecer además la comparación con las dos gráficas correspondientes a los resultados obtenidos químicamente.

Prescindiendo de los errores de las determinaciones fotométricas, consecuencia de las oscilaciones del espejo del galvanómetro provocadas por vibraciones de las paredes maestras del edificio, prácticamente inevitables, se aprecian manifiestamente en las gráficas las diferencias correspondientes a uno u otro tipo de ensayos, entre las referentes a la acción de la pepsina, cuya desviación es máxima operando a triple concentración de la indicada anteriormente, para disminuir cuando se

opera a una concentración cuatro veces mayor y, por fin, entre las gráficas relativas a ensayos efectuados en ausencia o presencia de alcohol, correspondiendo siempre las máximas desviaciones a las primeras, hecho éste que se observa igualmente en las gráficas de los valores obtenidos por vía química.

### Discusión

Los hechos mencionados precedentemente, acerca de la digestión péptica, son de sobra conocidos para insistir sobre ellos. Creemos, sin embargo, interesante dedicarles atención en este trabajo, como aplicación nueva de los métodos de la fotometría fotoeléctrica al estudio de este tipo de acciones enzimáticas, con los resultados positivos observables en las gráficas correspondientes. Pero son las gráficas de ensayos de acción de la pepsina operando en ausencia o presencia de alcohol, lo que constituye el objeto del presente trabajo, las que ofrecen un interés particular para nosotros. La desviación mínima de las mismas, tanto si representan los valores obtenidos mediante nuestro fotómetro fotoeléctrico como por vía química, no creemos exacto atribuirlos exclusivamente a una acción inhibitoria del alcohol sobre la pepsina y sí, en cambio, resultado de la acción precipitante del alcohol sobre las peptonas formadas como consecuencia de la actividad péptica, hecho éste que nos parece plenamente confirmado dentro de las mismas gráficas, puesto que permite interpretar su mayor desviación durante los primeros intervalos de tiempo y el retroceso correspondiente a intervalos sucesivos.

La explicación de este fenómeno, al parecer complejo es, sin embargo, bastante sencilla a nuestro modo de ver, si el mismo se considera como la resultante de dos procesos esenciales netamente diferenciados e independientes: uno de degradación molecular mediante la acción péptica, y otro de precipitación de las peptonas formadas como consecuencia de dicha actividad, cuya precipitación, debida a operar en presencia de alcohol, depende, evidentemente, del grado de concentración molecular alcanzado en peptonas y de la temperatura y viscosidad del medio, entre los factores principales. De este modo se explica el rápido retroceso de las gráficas correspondientes, a

partir de los primeros intervalos de tiempo, o en otras palabras, a partir de determinado grado de concentración de las moléculas de peptona formadas.

En cuanto a la acción de combinaciones de función alcohólica sobre la pepsina, hemos hallado una referencia en un trabajo de Karl Myrbäck (11), según el cual la pepsina es soluble en glicerina, dando disoluciones muy estables. Por nuestra parte hemos podido comprobar que es perfectamente soluble en los medios hidroalcohólicos estudiados por nosotros, incluso aun operando a concentraciones superiores al veinticinco por ciento en volumen; hecho éste que se halla en completa concordancia con los observados en peptidasas de otras procedencias, las que son totalmente estables en medios fuertemente alcohólicos (Agren) (1).

Puede, pues, continuar actuando la pepsina con invariable actividad, aun en presencia de cantidades convenientes de alcohol y acusar las gráficas correspondientes un retroceso más acentuado, cuya magnitud debe, pues, depender, de acuerdo con lo expuesto, del número de peptonas que van precipitándose a intervalos sucesivos de tiempo y a medida de su formación.

Es evidente la concordancia de estos hechos con la disminución de transparencia de las disoluciones correspondientes y, por lo tanto, los retrocesos de las gráficas fotométricas. También lo es, sin embargo, el retroceso claro de la gráfica de los valores obtenidos químicamente.

Efectivamente, en toda precipitación de coloides existe aglomeración de las partículas en forma de gránulos, cuyo tamaño depende de la velocidad de precipitación, de la concentración de las moléculas coloidales y de la viscosidad, temperatura y naturaleza del medio. En la titulación al formol, la superficie externa de los gránulos actúa a modo de capa o envoltura protectora del contenido de cada uno, como consecuencia del bloqueo de los grupos amino terminales de dicha capa externa por el formol, con lo cual los grupos amino del interior de cada gránulo, quedan, pues, sustraídos a la acción del formol, sin pérdida, por lo tanto, del carácter anfótero de las moléculas correspondientes, resultando así, naturalmente, la disminución progresiva observada de la acidez total del sistema a medida que aumenta la cantidad de peptonas precipita-

das, todo lo cual se traduce, evidentemente, en una inversión progresiva de los valores correspondientes a la gráfica respectiva, o en otras palabras, en un retroceso evolutivo de la misma.

De acuerdo con todo lo expuesto hasta aquí, no es, pues, probable, que se modifique muy acentuadamente en medio hidro-alcohólico, la actividad péptica en el estómago. Por otra parte, las peptonas precipitadas pueden ser después totalmente degradadas a aminoácidos como consecuencia de la actividad de los fermentos proteolíticos pancreáticos e intestinales, de modo análogo a lo que ocurre, por ejemplo, con la gelatina formolizada.

De todo lo expuesto resulta, pues, como más probable, una acción indirecta del alcohol sobre la digestión gástrica, debida, no a simples modificaciones de la actividad péptica normal, sino a alteraciones de dicha actividad, provocadas por cambios en la composición del jugo gástrico, como consecuencia del estímulo secretor, o bien por acción directa del alcohol sobre la mucosa o por las posibles acciones reflejas.

En las gráficas correspondientes se observa evidentemente la diferente actividad péptica debida a variaciones en la composición de los substratos estudiados por nosotros.

Examinados todos los hechos en conjunto, no se aprecia, pues, modificación muy sensible de la acción de la pepsina cuando la concentración total de alcohol del substrato es inferior al 20 %, conforme lo demuestra el desplazamiento progresivo de las gráficas en sentido contrario. Por otra parte, no es probable que el alcohol normalmente alcance grandes concentraciones en el estómago, debido a su dilución por el jugo gástrico segregado.

En cuanto a los efectos de un aumento de concentración de clorhídrico, aun cuando vaya acompañado de otro aumento simultáneo de concentración de pepsina, disminuye la actividad de ésta, debido a una disminución del pH del medio hacia límites que exceden los de estabilidad y activación de la pepsina, y es sabido que el pH óptimo de estabilidad de la pepsina está comprendido entre 3,0-4,5 (Loughlin) (8), que es el de los medios que hemos estudiado.

Existen, naturalmente, diferencias entre unas y otras gráficas, sólo interpretables por el hecho de la imposibilidad lógica de efectuar todas nuestras experiencias trabajando con

suero fresco del mismo animal, lo que puede obedecer a factores biológicos de tipo individual, en cuanto al contenido proteico, y a la composición especial del suero estudiado en cada ensayo, cuyas diferencias no afectan, como podrá observarse, a la marcha general de los procesos objeto de investigación; pero que modifican, sin embargo, la velocidad y tiempo de precipitación de las peptonas formadas.

### Conclusiones

- 1.º El alcohol etílico inhibe la acción de la pepsina en medio hidroalcohólico.
- 2.º Esta inhibición se observa ya claramente operando a concentraciones del orden del 20 %.

### Resumen

Se efectúa un estudio comparativo sobre la evolución del sistema ácido clorhídrico-pepsina-substrato, en ausencia y presencia del alcohol, respectivamente, apreciándose una clara disminución de la actividad péptica en este último caso, cuyo posible mecanismo se explica de acuerdo con los hechos observados fotométrica y químicamente.

### Summary

We accomplish a comparative study on the evolution of the system hydrochloric acid-pepsine-substrate, in absence and presence of ethyl alcohol, respectively, and we found a clear diminution of the peptic activity in this latest case. The possible mechanism of this phenomenon is explained in concordance of the facts observed by photometric and chemical ways.

### Zusammenfassung

Man unternimmt ein vergleichendes Studium über den Verlauf des Salzsäure-Pepsin-Substrat Systems, in An und Adwesenheit von Alkohol. Man findet eine deutliche Verminderung der peptischen Aktivität in Gegenwart von Alkohol. Dieser wahrscheinliche Vorgang kann man durch unsere photometrischen und chemischen Beobachtungen erklären.

## Bibliografía

- (1) AGREN, G. *Acta Physiol. Scandinavica*, 7, 356 (1944).
- (2) BARNEJEE, S. Sen, H. K. : *J. Indian chem. Soc.* 12, 740 (1935).
- (3) HEIDUSCHKA, A. FORSTER, J. : *Ber. dtsh. Pharmaz. Ges.*, 270, 419 (1932).
- (4) HERRIOT R. M. : *J. grn. Physiol.* 20, 335 (1937).
- (5) HÜMME, H. : *Ber. ges. Physiol. esp. Pharmakol.* 93, 87 (1936).
- (6) JIMÉNEZ VARGAS, J. y MONCHE ESCUBÓS, J. : *R. esp. Fisiol.* 1,77 (1945).
- (7) KRYGSMAN, B. J. *HOPPE Seyler's Zeits. J. Phisiol Chem.* 227, 251 (1934).
- (8) LOISELEUR, J. : *C. R. acad. fco. París*, 205, 1103 (1937).
- (9) LOUGHLIN, W. J. : *Biochemic, J.* 27, 1779 (1933).
- (10) MARTISON, E. E. y FETSIMENKO, I. V. : *Bull. Biol. Med. exper. URSS*, 5, 517 (1938).
- (11) MYRBACK, K. : *Die Methoden der Ferment Sorschung*, Bd. 11, 2016 (1941).
- (12) PERMAAKOV, F. : *Ber. ges. Physiol. exp. Pharmakol.* 59, 630 (1931)
- (13) REMSEOW, L. MATROSSOWITSCH, D. : *Z. ges. exp. Med.* 87, 623 (1933).