



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
UNIDADES DE BIOLOGÍA CELULAR Y BIOQUÍMICA**

**“Asociación entre velocidad de flujo salival, pH y concentración de proteínas salivales en sujetos xerostómicos hiposialícos y no hiposialícos con alteraciones dentales, de mucosa oral y lengua”**

**Yoshua Alexis Parry Yáñez**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Juan Pablo Aitken Saavedra**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dr. Alejandro Escobar Álvarez**

**Dra. Irene Morales Bozo**

**Adscrito a Proyecto FONIS SA12I2207  
Santiago - Chile  
2015**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
UNIDADES DE BIOLOGÍA CELULAR Y BIOQUÍMICA**

**“Asociación entre velocidad de flujo salival, pH y concentración de proteínas salivales en sujetos xerostómicos hiposialícos y no hiposialícos con alteraciones dentales, de mucosa oral y lengua”**

**Yoshua Alexis Parry Yáñez**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Juan Pablo Aitken Saavedra**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dr. Alejandro Escobar Alvarez**

**Dra. Irene Morales Bozo**

**Adscrito a Proyecto FONIS SA12I2207  
Santiago - Chile  
2015**

*A Carmelita y Verónica.*

# **AGRADECIMIENTOS**

Millones de gracias a mis tutores por el tiempo y la disposición, y a mis amigos por estar en las buenas y en las malas. Gracias por acompañarme en todo este proceso que si bien duró cerca de seis años, en este punto no es más que un parpadeo.

# INDICE

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>III.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
III.1	SALIVA	8
III.2	FUNCIONES SALIVALES	9
III.3	COMPONENTES SALIVALES	10
III.4	ALTERACIONES SALIVALES	12
III.5	PATOLOGÍAS Y ALTERACIONES MÁS FRECUENTES ASOCIADAS A XEROSTOMÍA E HIPOSIALIA	14
III.6	CONSIDERACIONES FINALES	15
<b>IV.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
IV.1	HIPÓTESIS	17
IV.2	OBJETIVO GENERAL	17
IV.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>V.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>18</b>
V.1	TIPO DE ESTUDIO	18
V.2	MUESTRA	18
V.2.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	18
V.2.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	18
V.3	ASPECTOS ÉTICOS	18
V.4	DISEÑO DEL ESTUDIO	19
V.5	DETERMINACIÓN DE LESIONES ORALES	19
V.6	DETERMINACIÓN FLUJO SALIVAL	20
V.7	DETERMINACIÓN PH SALIVAL:	20
V.8	DETERMINACIÓN CONCENTRACIÓN TOTAL DE PROTEÍNAS:	20
V.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>22</b>
VI.1	ANÁLISIS DE DATOS DEMOGRÁFICOS	22
VI.2	VELOCIDAD DE FLUJO SALIVAL EN PACIENTES XEROSTÓMICOS CON HIPOSIALIA Y SIN HIPOSIALIA	23

<b>VI.3</b>	<b>PH SALIVAL EN PACIENTES XEROSTÓMICOS CON HIPOSIALIA Y SIN HIPOSIALIA</b>	<b>24</b>
<b>VI.4</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN PACIENTES XEROSTÓMICOS CON HIPOSIALIA Y SIN HIPOSIALIA</b>	<b>24</b>
<b>VI.5</b>	<b>ALTERACIONES DENTALES, DE MUCOSA Y LENGUA EN PACIENTES XEROSTÓMICOS CON Y SIN HIPOSIALIA</b>	<b>26</b>
<b>VI.6</b>	<b>RELACIÓN ENTRE ALTERACIONES DENTALES, DE MUCOSA Y LENGUA CON PH Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS</b>	<b>29</b>
<b>VII.</b>	<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>31</u></b>
<b>VIII.</b>	<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>35</u></b>
<b>IX.</b>	<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b><u>36</u></b>
<b>X.</b>	<b><u>ANEXOS</u></b>	<b><u>41</u></b>

## I. RESUMEN

**Introducción:** La saliva es un fluido de crucial importancia para mantener un correcto funcionamiento del sistema estomatognático. Alteraciones cualitativas y cuantitativas de ésta, pueden condicionar la aparición de diversas alteraciones orales. En el presente estudio se intentó relacionar algunas de estas características salivales cuantitativas y cualitativas (velocidad de flujo salival, pH y concentración de proteínas) de un grupo de individuos xerostómicos con la presencia de alteraciones orales (dentales, de mucosa y lengua), para así conocer el grado de influencia de estas características en las alteraciones encontradas.

**Metodología:** El presente estudio incluyó 29 voluntarios mayores de 18 años reclutados del servicio de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y del Centro de Referencia de Salud, Peñalolén Cordillera Oriente. La recolección de datos se realizó mediante una ficha clínica, previa firma de un consentimiento informado, la cual registró presencia de xerostomía y alteraciones orales mediante un examen realizado por dos clínicos calibrados. Además se obtuvieron muestras salivales de cada individuo para determinar velocidad de flujo salival, pH y concentración total de proteínas en saliva. La muestra se dividió en 2 grupos de estudio, un grupo hiposialico, con velocidad de flujo salival  $<0,2$  mg/mL, y el no hiposialico, con velocidad de flujo salival  $>0,2$  mg/mL. Para la asociación de las variables se utilizó el Coeficiente de correlación biserial-puntual. Se aceptaron diferencias estadísticamente significativas con un error alfa igual o menor a 0.05 y un intervalo de confianza del 95%.

**Resultados:** El pH salival de los individuos con sequedad labial fue menor en el grupo no hiposialico en comparación con el grupo de hiposialicos, presentando una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,0249$ ). No hubo diferencias entre concentración total de proteínas y pH para ambos grupos de estudio. En la prevalencia de las alteraciones orales entre ambos grupos y su relación a la concentración total de proteínas tampoco se encontraron diferencias significativas, sin embargo se evidenció una tendencia a mayor presencia de queilitis angular en



individuos hiposialicos en comparación a los no hiposialicos. En presencia de lesiones cervicales (erosiones y caries) también se evidencia una tendencia ( $p = 0,06$ ), habiendo menores valores en el pH en estos individuos. En relación a la cuantificación total de proteínas, también hubo una tendencia hacia una mayor concentración en el caso de las úlceras, pero sin llegar a ser estadísticamente significativa. En la queilitis angular se observó una menor concentración media de proteínas.

**Conclusiones:** En nuestro estudio solo se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar el pH de los pacientes hiposialicos y no hiposialicos, con presencia de labio seco, sin embargo se necesitan más estudios al respecto para poder distinguir el verdadero rol de las características salivales en la expresión de estas alteraciones orales para así poder enfocar el tratamiento de las patologías orales asociadas a la xerostomía.

## II. INTRODUCCIÓN

La xerostomía es un síntoma relativamente común, de origen multifactorial con frecuentes implicancias orales, las que pueden disminuir la calidad de vida del individuo (Napeñas y cols., 2009). Suele encontrarse acompañada de una disminución en la cantidad de saliva, signo denominado hiposialia, empeorando de esta forma el cuadro anterior (Liu y cols., 2012; Han y cols., 2015). La población más afectada por esta sensación de boca seca corresponde a mujeres entre los 35 y los 55 años en una proporción de hasta 7:1 en relación a los hombres. Suele asociarse además a sensación de boca urente, consumo de fármacos, ansiedad y depresión (Chimenos, 2014). Alteraciones salivales cualitativas y cuantitativas, se han asociado a la presencia de diversas patologías orales, lo que hace relevante considerarlas no solo dentro del pronóstico de estas patologías, sino también, como parte de la evaluación e indicación terapéutica.

En el presente estudio se intenta relacionar algunas de estas características salivales cuantitativas y cualitativas (velocidad de flujo salival, pH y concentración de proteínas) de un grupo de individuos xerostómicos con la presencia de alteraciones orales (dentales, de mucosa y lengua). De esta forma pretendemos esclarecer de mejor manera el origen de estas variaciones en las características salivales para a futuro colaborar de mejor forma en el correcto diagnóstico y tratamiento de las alteraciones orales con las que se asocian.

### III. MARCO TEÓRICO

#### III.1 SALIVA

La saliva es un fluido orgánico complejo cuya base proviene del fluido intersticial de los capilares sanguíneos, el cual entra por los ductos salivales pasando de ser un fluido isotónico a uno hipotónico. Su densidad es de 1,005 g/mL y está compuesta por un 98% de agua, mientras el otro 2% lo componen diferentes electrolitos (Na, K, Ca, Mg, bicarbonatos y fosfatos), mucus compuesto por mucopolisacáridos y glicoproteínas, sustancias antisépticas (peróxido de hidrógeno, IgA), y varias enzimas, como la amilasa, lisozimas y la lipasa lingual (Jain y Sharma, 2005; Pink y cols., 2009).

El volumen promedio de producción salival diaria está entre los 500-1000 mL. Durante un flujo no estimulado la glándula submandibular produce el 65% del volumen total, la glándula parótida el 20% y la sublingual 7-8% aproximadamente. El volumen compartido por las glándulas salivares menores suele ser insignificante. Durante un flujo estimulado por otra parte, los porcentajes de contribución cambian, quedando la parótida con más del 50% del aporte en volumen (Sue y Russel, 2001).

La saliva producida por las glándulas submandibular, sublingual y glándulas menores, es muy rica en mucinas (MUC5B y MUC7) y contiene una pequeña cantidad de amilasa. Por el contrario, la saliva de la parótida es rica en amilasa (20%), proteínas ricas en prolina (60%) y fosfoproteínas como la estaterina (7%) pero sin rastro de mucinas (Pink y cols., 2009).

El pH normal va de 6 a 7, pudiendo tener un rango de 5.3 a 7.8 dependiendo del flujo (Sue y Russel, 2001).

La concentración de proteínas en la saliva varía en la literatura y pareciera no presentar parámetros fijos ya que se han documentado valores desde los 1,06 mg/mL (Henskens y cols., 1993) hasta 1,59 gr/mL (Mulki y cols., 2013).

### III.2 FUNCIONES SALIVALES

a) **Limpieza mecánica:** Dentro de las funciones de la saliva, la limpieza mecánica impide o disminuye la absorción en la mucosa de una serie de sustancias potencialmente dañinas para los tejidos (provenientes de alimentos o de sustancias del humo de tabaco), además puede controlar la eventual aparición de diferentes afecciones dentales, gingivales y periodontales (Rojas y cols., 2000; Blanco y Otero, 2014).

b) **Lubricación:** además de su rol digestivo protege dientes mediante la película salival adquirida, mucosas y lengua evitando atrofas, fisuras, queilitis angular y diferentes grados de ulceración en tejidos blandos y daño a tejidos duros. (Blanco y Otero, 2014).

c) **Capacidad tamponante:** influye en los fenómenos de mineralización de esmalte y en la limitación de la flora bacteriana en la cavidad oral. La desmineralización ocurre cuando la película salival adquirida adquiere un pH de 5 a 5,5, el que se considera como pH crítico en el desarrollo de lesiones cariosas (Sue y Russel, 2001). Se ha visto que estos cambios en el pH oral (muchas veces como consecuencia de la xerostomía) también se han asociado a una mayor prevalencia de alteraciones orales en mujeres embarazadas y presencia de lengua geográfica (Rojas y cols., 2000; Blanco y Otero, 2014; Jain y Kaur, 2015).

d) **Actividad antimicrobiana:** esta característica es producto de la presencia de inmunoglobulinas (IgA secretora, contribuyendo a la agregación bacteriana), lisozima (control bacteriano), mucina (que mantiene la integridad de las mucosas) y una serie de péptidos antimicrobianos, evitando síntomas como halitosis y aparición de candidiasis (presente en paladar, lengua y labios), lengua eritematosa y liquen plano (Jensen y Barkvoll, 1998; Rojas y cols., 2000; Balasubramaniam y cols., 2009; Blanco y Otero, 2014).

e) **Rol alimenticio:** abarca la formación del bolo alimenticio, masticación, digestión inicial, y sentido del gusto. Se ha documentado que podría ser el causante

de fenómenos de disfagia y disgeusia en personas con cambios cualitativos o cuantitativos en la saliva (Llena-Puy, 2006; Farnaud y cols., 2010; Han y cols., 2015). Además se ha visto que los pacientes con estas alteraciones tienden a cambiar su alimentación, por la dificultad que genera el tragar los alimentos, creando a la larga un compromiso en su estado nutricional (Blanco y Otero, 2014).

f) **Adhesión a aparatos protésicos:** la película salival es clave en la retención de los distintos aparatos removibles, por lo que cambios cuantitativos y cualitativos (como la viscosidad) dificultan la rehabilitación de estos pacientes. Lo anterior combinado a una deficiente higiene del portador puede desencadenar una estomatitis subprotésica asociada a candidiasis, relacionada además con úlceras producto de la falta de lubricación (Aguirre, 2002; Fenoll-Palomares y cols., 2004; Gendreau y Loewy, 2011; Altarawneh y cols., 2013; Blanco y Otero, 2014).

Más aun, se ha visto que la velocidad de flujo salival aumenta en los primeros usos de la prótesis debido a los receptores a nivel de mucosa que reaccionan frente a la presencia de un elemento extraño en la cavidad oral, a modo de protección (Bagán y cols., 1995).

### III.3 COMPONENTES SALIVALES

a) **Estaterinas:** polipéptidos que están en alta concentración en la película salival adquirida, favoreciendo remineralización del esmalte.

b) **Proteínas ricas en prolina:** se unen a hidroxiapatita y a *S. mutans*, se asocian comúnmente a riesgo de caries.

c) **Mucinas:** MUC1 forma parte de la película dental adquirida, es asociada a riesgo de caries. MUC2 es aglutinina, solo se une a bacterias. MUC5B protege tejidos duros y blandos creando una capa protectora frente a influencias físicas, químicas y bacterianas, disminuye la abrasión dental y cualquier otro daño mecánico. MUC7 se une fácilmente a bacterias y virus (VIH) asegurando la limpieza oral.

d) **Lactoferrina:** es una proteína de unión a fierro, actúa en bacterias anaerobias y en las facultativas más sensibles, afectando su metabolismo.

e) **Histatinas:** tienen propiedades antifúngicas, además previenen precipitación de fosfato de calcio sobre la hidroxiapatita.

f) **Lisozima:** desestabiliza la pared celular de bacterias y es capaz de hidrolizar la capa de peptidoglicanos.

g) **Amilasa:** metaboliza polisacáridos y promueve adherencia de *S. mutans* a los cristales de hidroxiapatita.

h) **Peroxidasa:** inhibe el crecimiento de bacterias mediante peróxido de hidrógeno e hipotiocianato.

i) **Cistatinas:** son inhibidoras de proteasas, mantienen la saliva cohesionada, controla metabolismo del fosfato de calcio.

j) **IgA:** inmunoglobulina que se une a bacterias por aglutinación.

Como se puede apreciar, cada uno de estos componentes puede realizar más de una función en la saliva, tal como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1: Funciones y componentes de la saliva**

Dental	Remineralización	Proteínas ricas en prolina, estaterina, fosfato
	Inhibición de desmineralización	Mucinas
	Lubricación	Proteínas ricas en prolina, mucinas
	Tamponante	Bicarbonato, fosfato, proteínas
Alimenticia	Digestión	Lipasa, amilasa, proteasa
	Gusto	Zinc
	Bolo	Mucinas
Antimicrobiana	Antiviral	Mucinas, Inmunoglobulinas, cistatinas
	Antifúngica	Inmunoglobulinas, mucinas, cistatinas
	Antibacteriana	Mucinas, histatinas, cistatinas, lactoferrina, aglutinina, lisozima, lactoperoxidasas

**Pink y cols. (2009). Saliva as a diagnostic medium. Biomed Pap Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub 153(2):104.**

### III.4 ALTERACIONES SALIVALES

La secreción salival tiene un volumen medio en boca aproximado de 1,1 mL. En personas sanas este flujo puede variar dependiendo de su edad, género, tamaño glandular, estado de hidratación, peso corporal, factores ambientales y emocionales (Aitken y cols., 2013). Cambios nutricionales y deficiencias también pueden influenciar el flujo. Una pequeña reducción en la ingesta diaria puede incrementar el número de proteínas salivales, mientras que grandes restricciones calóricas tienden a reducir el flujo salival, número de células y composición salival. (Sue y Russel, 2001).

a) **Hiposalia**: se describe como la disminución de flujo salival sobre los rangos normales de variación. Para detectar la hiposalia se recurre al test de velocidad de flujo salival o sialometría, destinado a medir la cantidad de saliva que se produce en un tiempo determinado, donde de 0,3 a 0,4 mL/min es el valor normal y la hiposalia se define como una condición en la cual los valores de velocidad de

flujo se encuentran bajo los 0,2 mL/min (Sreebny y cols., 1991; Navazesh, 1993; Glazar y cols., 2010). Este bajo nivel de flujo se traduce generalmente en dos grandes efectos a nivel oral: una reducida preparación del alimento para la digestión y sentido del gusto, y un aumento en la susceptibilidad de las estructuras orales a la enfermedad. (Sue y Russel, 2001).

b) **Xerostomía:** definida como sensación de boca seca, no siempre es acompañada de hiposialia. Al igual que ésta última ha demostrado tener efectos adversos en quienes la padecen, sin embargo su etiología y prevalencia han sido difíciles de determinar debido al limitado número de estudios epidemiológicos al respecto y a la poca claridad en los mismos al relacionarla o no con la hiposialia (Napeñas y cols., 2009). La condición se determina generalmente mediante un cuestionario, como es el caso del test de Fox (Valdez y Fox, 1993).

La condición de xerostomía o hiposialia suele deberse a una etiología multifactorial y está asociada a varios factores de riesgo tales como enfermedades sistémicas (síndrome de Sjögren, artritis, lupus sistémico, escleroderma, cirrosis biliar primaria, diabetes mellitus, citomegalovirus, hepatitis c, displasia ectodérmica, depresión), terapia farmacológica, radioterapia, deshidratación, trasplante de médula ósea, deficiencias nutricionales y neuropatías, entre otros (Von Bültzingslöwen y cols., 2007; Agha-Hosseini y Moosavi, 2013).

Esta combinación entre la condición sistémica de base sumada a la xerostomía ha demostrado generar distintos tipos de alteraciones orales (Von Bültzingslöwen y cols., 2007; Mays y cols., 2012)

Las molestias relatadas por quienes padecen alguna de estas condiciones se deben al desmedro de los distintos roles que tiene la saliva en la cavidad oral. Así, las alteraciones funcionales en el caso de la hiposialia se explicarían debido a la disminución objetiva en la cantidad de saliva, y en el caso de la xerostomía se han visto relacionadas a una alteración en la composición de esta cuando no se acompaña de hiposialia (Kivela y cols 1997; Napeñas y cols., 2009). Un cambio en la composición y cantidad de saliva también se ha encontrado en asociación con el síndrome de boca urente, lengua fisurada y liquen plano (Jensen y Barkvoll, 1998; Balasubramaniam y cols., 2009; Glore y cols., 2009)



### **III.5 PATOLOGÍAS Y ALTERACIONES MÁS FRECUENTES ASOCIADAS A XEROSTOMÍA E HIPOSIALIA**

#### ***Presencia de erosiones, caries y pérdida dentaria***

Se ha documentado que en pacientes hiposialícos existe una mayor incidencia de caries, principalmente relacionada a una disminución en el flujo salival, debido a que no existe arrastre de bacterias y hay una menor concentración de proteínas antibacterianas (Bascones y cols., 2007). En la literatura la condición hiposialica se relaciona a caries atípicas (zonas interproximales e incisales de dientes anteriores) y si existe además exposición radicular, la caries cervical suele ser la más notoria debido a su rapidez de avance en relación a la caries de esmalte, debido a la facilidad para penetrar la dentina (Blanco y Otero, 2014). Se ha documentado además que el bajo flujo salival se relacionaría con mayor pérdida de dientes en el adulto mayor (Caplan y Hunt, 1996) y un mayor COPD (Sue y Russel, 2001). Por último también existe una asociación entre xerostomía y erosiones causada por la desmineralización subsiguiente a una disminución en el pH salival (Sue y Russel, 2001).

#### ***Afecciones gingivales y periodontales***

La hiposialia favorece el acúmulo de placa bacteriana incrementando la severidad y frecuencia de las enfermedades que afectan el periodonto. La disminución en la limpieza mecánica proporcionada por la saliva favorece el asentamiento y proliferación de diversos tipos de bacterias patógenas (Tanner y cols, 1998). Si bien el acúmulo de placa bacteriana, consecuencia de esta condición, no siempre se asocia a una mayor profundidad del saco periodontal, sí se ha visto que genera gingivitis más refractarias (Ciancio, 1996).

### ***Candidiasis y queilitis angular***

*Cándida albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia en el ser humano, formando parte de la microbiota normal de la cavidad oral, sin embargo, al producirse un cambio en las condiciones ambientales a las que normalmente está sometida, aparece su patogenicidad desarrollándose candidiasis (Rodríguez y cols., 2002). El pH ambiental es un potencial inductor de diferenciación y desarrollo de esta especie, ya que en un ambiente ácido favorece el desarrollo de levaduras junto con la activación de proteinasas y fosfolipasas, mientras que en un medio alcalino la formación de hifas, junto con el desarrollo de *cándida no albicans* (Davis, 2003; Araújo y cols., 2014; Perez, 2015). Es así como un cambio en el pH salival o la disminución de factores antimicrobianos puede aumentar el riesgo de candidiasis (Silvestre-Donat 2004). Debido a la falta de lubricación y humectación salival es posible además encontrar queilitis angular en las comisuras de los sujetos afectados, que se infecta frecuentemente con *cándida albicans*. (Huerta y Silva, 1996).

### ***Alteraciones de labios, mucosa y lengua***

La sequedad de labios y mucosa son uno de los tantos parámetros de identificación de hiposialia, junto con la sequedad a la palpación y un alto COPD. (Navazesh y cols., 1992; Sue y Russel, 2001). Se ha encontrado una correlación positiva entre humedad de las mucosas orales y la hipofunción glandular (Osalilan y cols., 2010). Esta hipofunción en conjunto con la disminución de humedad mucosal también se ha visto relacionada con un pH más ácido (Wolff y Kleinberg, 1998). También se ha documentado en estos pacientes la presencia de lengua fisurada (Glore y cols., 2009), lengua depapilada y diversos grados de ulceración en tejidos blandos (Blanco y Otero, 2014).

## **III.6 CONSIDERACIONES FINALES**

Si la xerostomía no es evaluada a tiempo, la aparición de lesiones en la cavidad oral podrían empeorar el cuadro de estos pacientes, ya que varias

patologías de la cavidad oral pueden agravar cuadros sistémicos (Rojas y cols., 2000; Blanco y Otero, 2014). Además, si bien se han descrito signos y síntomas como consecuencia de la xerostomía, no existe suficiente evidencia respecto de la asociación entre este síntoma, las características cualitativas y cuantitativas salivales y la presencia de patologías orales. Esta asociación, podría tener un efecto positivo en la consideración de los objetivos terapéuticos en los sujetos afectados mejorando a fin de cuentas, su calidad de vida.

## **IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **IV.1 HIPÓTESIS**

Una menor velocidad de flujo salival, menor pH salival y mayor concentración de proteínas en saliva se asocian a una mayor frecuencia de patologías dentales, de la mucosa oral y lengua en sujetos xerostómicos con y sin hiposialia.

### **IV.2 OBJETIVO GENERAL**

Asociar velocidad de flujo salival, pH salival y concentración de proteínas salivales en paciente xerostómicos hiposialicos y no hiposialicos con alteraciones dentales, de mucosa oral y lengua.

### **IV.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar pH, concentración de proteínas y velocidad de flujo en individuos con xerostomía, con y sin hiposialia.
- 2) Determinar presencia de labios secos, queilitis y úlceras en individuos xerostómicos con y sin hiposialia.
- 3) Determinar presencia de poliobturaciones, caries y erosiones cervicales en dientes de individuos xerostómicos con y sin hiposialia.
- 4) Determinar presencia de lengua geográfica y lengua fisurada en individuos xerostómicos con y sin hiposialia.
- 5) Comparar frecuencia de alteraciones orales entre individuos xerostómicos con y sin hiposialia.

## **V. METODOLOGIA**

### **V.1 TIPO DE ESTUDIO**

Este estudio se enmarca dentro de la metodología cuantitativa y corresponde a un estudio transversal descriptivo.

### **V.2 MUESTRA**

Se consideró un grupo de 29 individuos, reclutados y seleccionados por conveniencia en el Servicio de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, o del Centro de Referencia de Salud, Peñalolén Cordillera Oriente, de acuerdo a los siguientes criterios:

#### ***V.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN***

Adultos de ambos géneros mayores de 18 años.

Presentar xerostomía de cualquier origen, determinada por responder afirmativamente a la pregunta N°1 de la encuesta de Fox o 3 de las otras 4 en caso que la primera no sea respondida afirmativamente (Fox y cols., 1987) (anexo 1).

Que puedan realizar el procedimiento de recolección de saliva.

Haber firmado el consentimiento informado del estudio (anexo 2).

#### ***V.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN***

Individuos con trastornos motores a nivel bucal

Individuos con deterioro cognitivo severo

Individuos que estén en tratamiento que estimule la secreción salival.

### **V.3 ASPECTOS ÉTICOS**

La presente investigación se adscribe al proyecto FONIS SA12I2207, cuya acta de aprobación se encuentra en el anexo 3. Los individuos fueron debidamente

informados del tipo de investigación y del protocolo metodológico del estudio aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, mediante el consentimiento informado que cumple con las recomendaciones de la declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 1964).

#### **V.4 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Al grupo de individuos de los cuales se seleccionó la muestra (los que aceptaron su participación informada y voluntaria) un equipo de clínicos calibrados realizó una anamnesis y examen clínico. Se aplicó la encuesta de Fox y cols., (1987) para seleccionar a los individuos con xerostomía. Se consideró como sujeto xerostómico a aquel que respondió la primera pregunta del test en forma afirmativa o en su defecto 3 de las 4 siguientes en forma afirmativa. Se consignaron las enfermedades sistémicas que padecía cada paciente, junto con la medicación que estuvo recibiendo en ese momento. A los participantes se les informó del estado de su salud bucal y cuando fue necesario se les orientó sobre cómo proceder para su posterior atención y tratamiento.

#### **V.5 DETERMINACIÓN DE LESIONES ORALES**

Un grupo de 2 clínicos capacitados y calibrados en diagnosticar alteraciones orales (un patólogo y un estudiante de odontología) realizó el examen dental, de mucosa oral y lengua en busca de lesiones. Para medir concordancia entre los examinadores se realizó una evaluación de concordancia inter-observador visual de acuerdo a los criterios de la OMS en su décima revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (World Health Organization, 2010), aceptándose al menos un coeficiente Kappa de 0,7 al inicio de los exámenes.

Las regiones a examinar fueron labios, dientes, mucosa yugal, vestíbulos, paladar, piso de boca y lengua. Las lesiones objetivo del examen fueron caries, lesiones cervicales, queilitis angular, úlcera traumática, lengua geográfica y lengua fisurada (Anexo 4).

## **V.6 DETERMINACIÓN FLUJO SALIVAL**

Para determinar la presencia o ausencia de Hiposialia, a los individuos participantes en el estudio se les determinó el flujo salival mediante el test de “Saliva total no estimulada” (Márton y cols., 2008) además, se definió la condición de hiposialia como una tasa de flujo salival menor o igual a 0,2mL/min (Silvestre-Donat y cols., 2004). El flujo salival se determinó entre las 8 y 11 horas A.M. y con el individuo en reposo. Se solicitó a los individuos que lavaran su boca con agua y cepillo dental y se abstuvieran de consumir alimentos durante una hora. Se les pidió que previo a depositar la muestra se encontraran sentados de forma cómoda con los ojos abiertos y la cabeza levemente inclinada hacia al frente descansando 5 minutos previos a la recolección y minimizando los movimientos faciales (Navazesh, 1993). Luego se solicitó que depositaran en un recipiente, previamente pesado, la saliva que pudieran producir durante cinco minutos. La saliva recolectada, se pesó y los valores obtenidos se expresaron en mL/min, asumiendo un valor de densidad igual a 1 para la saliva (Jain y Sharma, 2005; Morales y cols., 2015)

## **V.7 DETERMINACIÓN PH SALIVAL:**

Se determinó el pH salival de las muestras de cada individuo. Para la medición del valor de pH de las muestras salivales se empleó un pH-metro digital (Modelo PL-600 EZDO-OMEGA que cumple la norma ISO-9001), que de forma automatizada entregó el valor del pH de forma digital con 2 decimales. Todas las mediciones se realizaron por el mismo operador y con la metodología estándar. Se consideraron ácidas aquellas muestras de saliva tomadas después del minuto 1, que presentaron valores promedio de pH inferiores a 5,5.

## **V.8 DETERMINACIÓN CONCENTRACIÓN TOTAL DE PROTEÍNAS:**

Se utilizó el kit para cuantificación de proteínas Protein Assay Bio Rad (Richmond CA, USA), y estándares de albúmina bovina (BSA, Sigma). Las

muestras de saliva a analizar se procesaron en duplicado, en diluciones sucesivas de 1:100 a 1:200 para la lectura de la absorbancia en un espectofotómetro a 595 nm. Con los datos obtenidos, se confeccionó una curva de calibración y se estimó la concentración de proteínas total en  $\mu\text{g/mL}$  según instrucción del fabricante (Anexo 5).

## **V.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la asociación de las variables se utilizó el Coeficiente de correlación biserial-puntual. Se ocupó el software STATA 11. Se aceptaron diferencias estadísticamente significativas con un error alfa igual o menor a 0.05 y un intervalo de confianza del 95%. Para contrastar la normalidad del conjunto de datos se usó el test de Shapiro-Wilk. Se utilizó el test t de Student para relacionar una variable cualitativa (alteración oral) con variables cuantitativas (pH y concentración de proteínas) en los datos que presentaron distribución normal. Para los datos que no presentaron distribución normal (presencia de hiposialia con pH, concentración de proteínas y VFS) se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Se utilizó la prueba  $\chi^2$  de Pearson para relacionar dos variables cualitativas, en este caso alteraciones orales y presencia de hiposialia.



## VI. RESULTADOS

### VI.1 ANÁLISIS DE DATOS DEMOGRÁFICOS

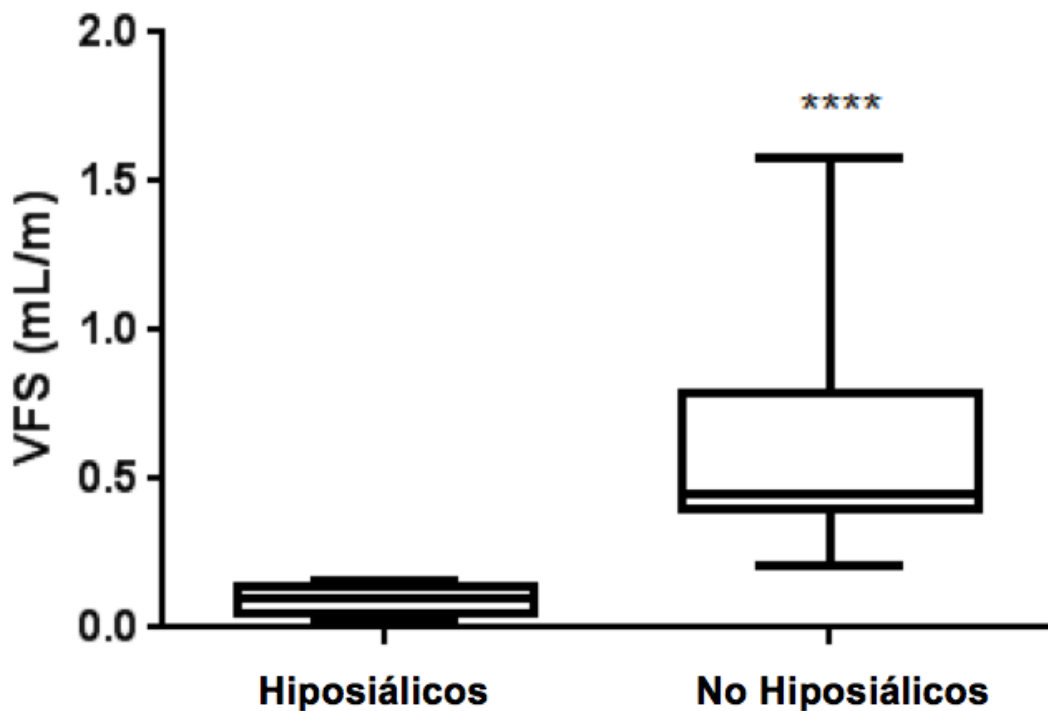
El presente estudio incluyó 29 voluntarios xerostómicos, dentro de los cuales 2 no generaron la suficiente cantidad de saliva para realizar las mediciones correspondientes (asiáticos), por lo que los análisis finales se realizaron en un total de 27 individuos. De ellos 21 correspondieron a mujeres y 6 a hombres, con un promedio de edad de 57 años. 24 de ellos estaba bajo algún tratamiento farmacológico (88,8%). Además, del total de xerostómicos 11 presentaban hiposialia (40,74%), como se aprecia en la tabla 2.

**Tabla 2: Caracterización de la muestra**

	<b>Hiposiáticos &lt; 0,2 ml/min (n=11/40,74%)</b>	<b>No Hiposiáticos &gt; 0,2 ml/min (n=16/59,26%)</b>
<b>Mujeres</b>	10	11
<b>Hombres</b>	1	5
<b>Edad</b>	60,5 ± 17,9	54,8 ± 21,2

## VI.2 VELOCIDAD DE FLUJO SALIVAL (VFS) EN PACIENTES XEROSTÓMICOS CON HIPOSIALIA Y SIN HIPOSIALIA

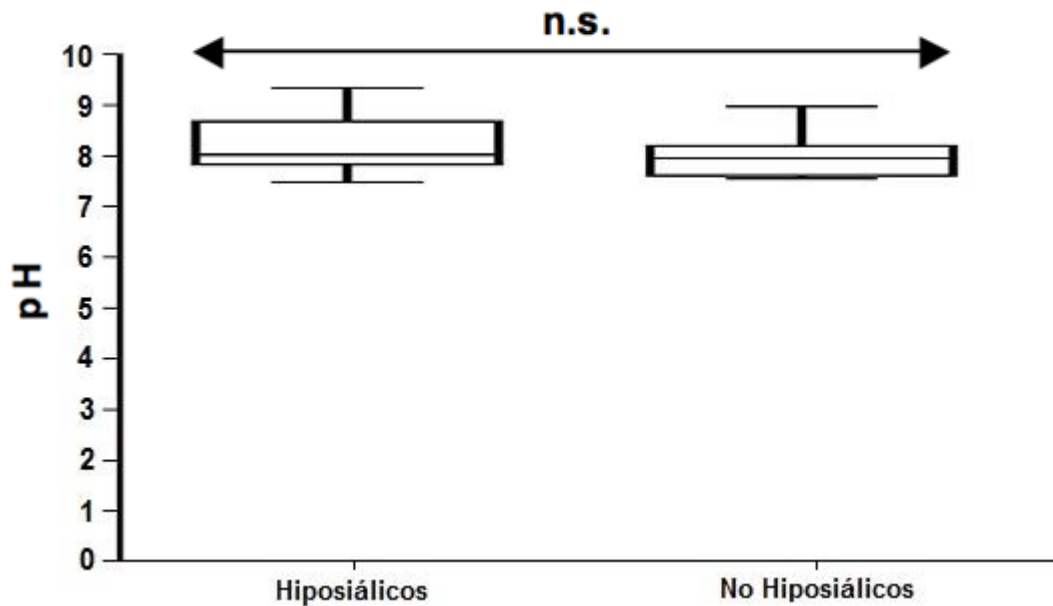
En la figura 1 se observa la VFS para ambos grupos de estudio. La diferencia encontrada fue estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre los xerostómicos con hiposialia (mediana = 0,1013 mL/min; desviación estándar = 0,049) y aquellos sin hiposialia (mediana = 0,4507 mL/min; desviación estándar = 0,332).



**Figura 1: Velocidad de flujo salival entre pacientes xerostómicos hiposiálícos versus los no hiposiálícos.** El gráfico de caja y bigotes representa la mediana y los valores máximos y mínimos de la VFS. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (test de Mann-Whitney).

### VI.3 PH SALIVAL EN PACIENTES XEROSTÓMICOS CON HIPOSIALIA Y SIN HIPOSIALIA

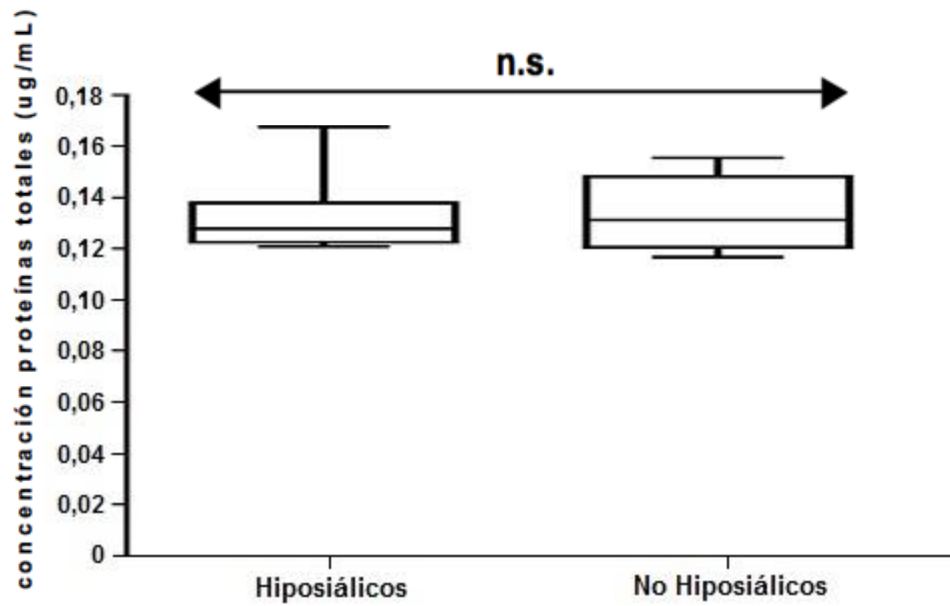
En la figura 2 se observa el pH para ambos grupos de estudio. No hubo diferencias significativas en el pH de los individuos xerostómicos con hiposialia (mediana = 8,02; desviación estándar = 0,59) y los xerostómicos sin hiposialia (mediana = 7,95; desviación estándar = 0,40).



**Figura 2: pH en pacientes xerostómicos con hiposialia y sin hiposialia.** El gráfico de caja y bigotes representa la mediana y los valores máximos y mínimos de pH (Test de Mann-Whitney, n.s. diferencias no significativas).

### VI.4 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN PACIENTES XEROSTÓMICOS CON HIPOSIALIA Y SIN HIPOSIALIA

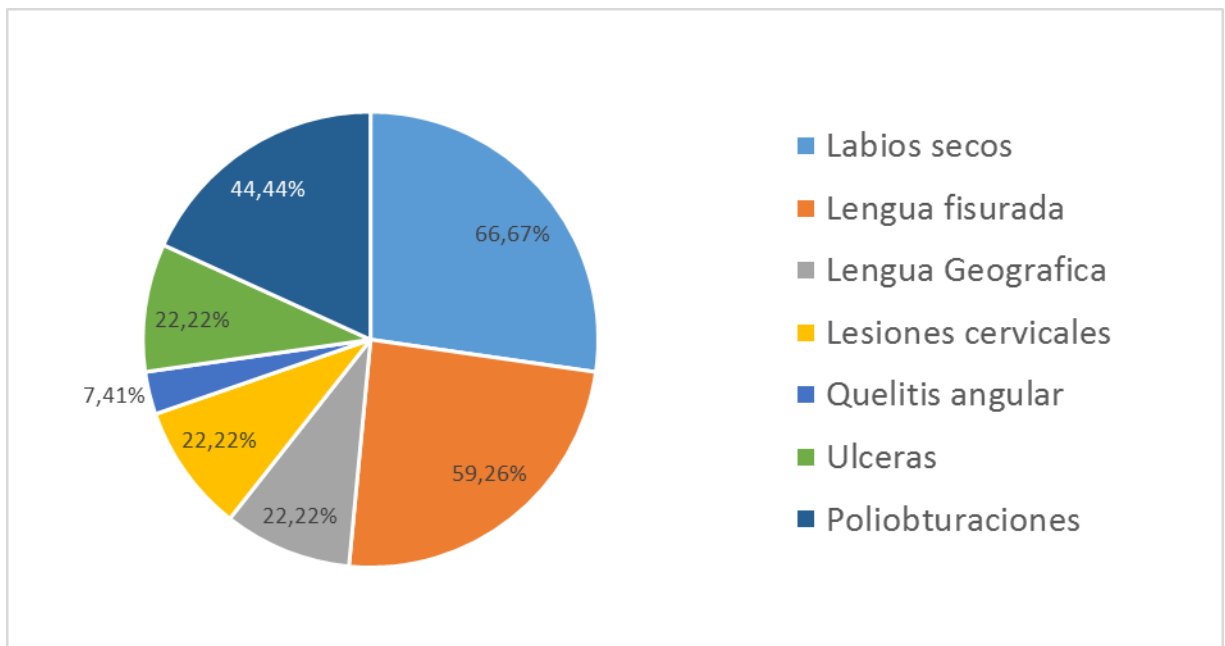
En la figura 3 se observa la concentración de proteínas en ambos grupos de estudio. No hubo diferencias significativas entre el grupo de xerostómicos con hiposialia (mediana = 0,127  $\mu\text{g/mL}$ ; desviación estándar = 0,014) y el grupo sin hiposialia (mediana = 0,131  $\mu\text{g/mL}$ ; desviación estándar = 0,013).



**Figura 3: concentración de proteínas en pacientes xerostómicos con y sin hiposialia.** El gráfico de caja y bigotes representa la mediana y los valores máximos y mínimos de la concentración de proteínas (Test de Mann-Whitney, n.s. diferencias no significativas)

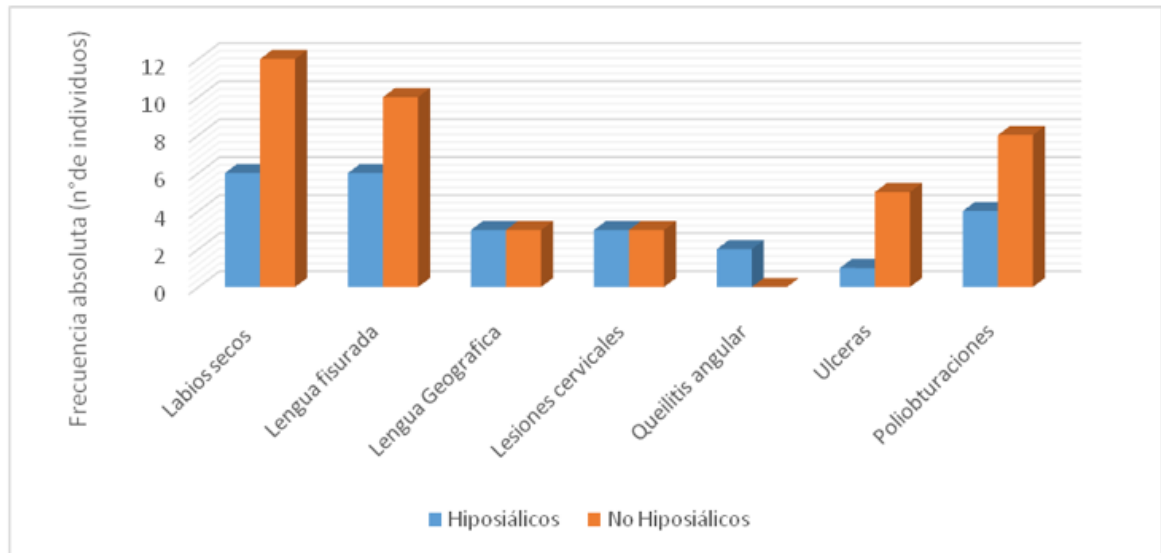
## VI.5 ALTERACIONES DENTALES, DE MUCOSA Y LENGUA EN PACIENTES XEROSTÓMICOS CON Y SIN HIPOSIALIA

Dentro de las alteraciones orales que se consignaron, se encontraron labios secos, lengua fisurada, lengua geográfica, lesiones cervicales (erosiones y caries), queilitis angular, úlceras (traumáticas y no traumáticas) y poliobturaciones (como antecedente de lesiones cariosas previas). La distribución de estas se observa en la figura 4.

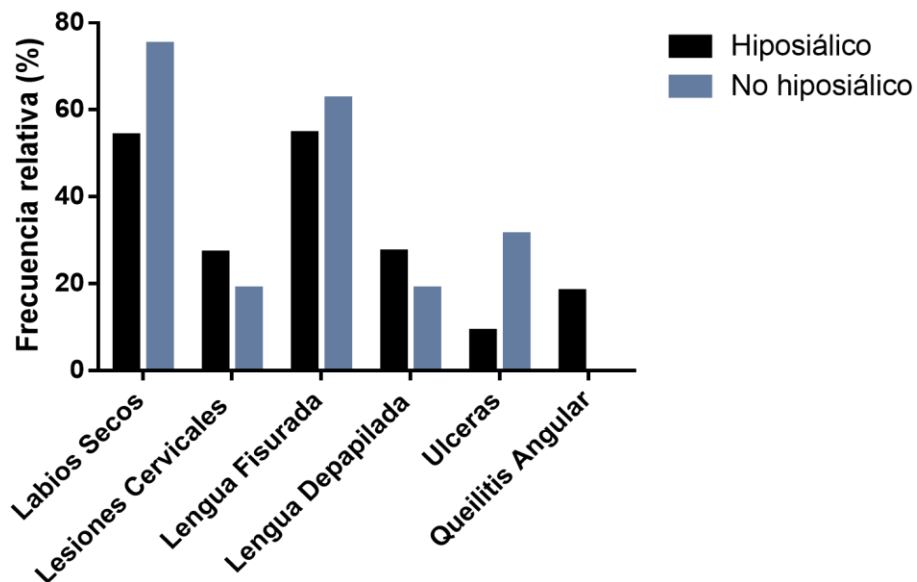


**Figura 4: Frecuencia relativa de lesiones orales en el total de la muestra.** El gráfico de torta representa la distribución porcentual de las distintas alteraciones orales encontradas.

La prevalencia de lesiones orales en los dos grupos de estudio se muestra en las figuras 5 y 6.



**Figura 5: Alteraciones orales entre los individuos xerostómicos con hiposialia y sin hiposialia.** El gráfico de barras representa la frecuencia absoluta de las distintas alteraciones observadas en los voluntarios.



**Figura 6: Alteraciones orales según grupo de estudio.** El gráfico de barras representa la frecuencia relativa de las distintas alteraciones observadas en los individuos en estudio.

Las frecuencias absolutas fueron tabuladas y analizadas para las distintas prevalencias entre los grupos Hiposiálicos y no Hiposiálicos. Un resumen de los resultados se aprecia en la tabla 3.

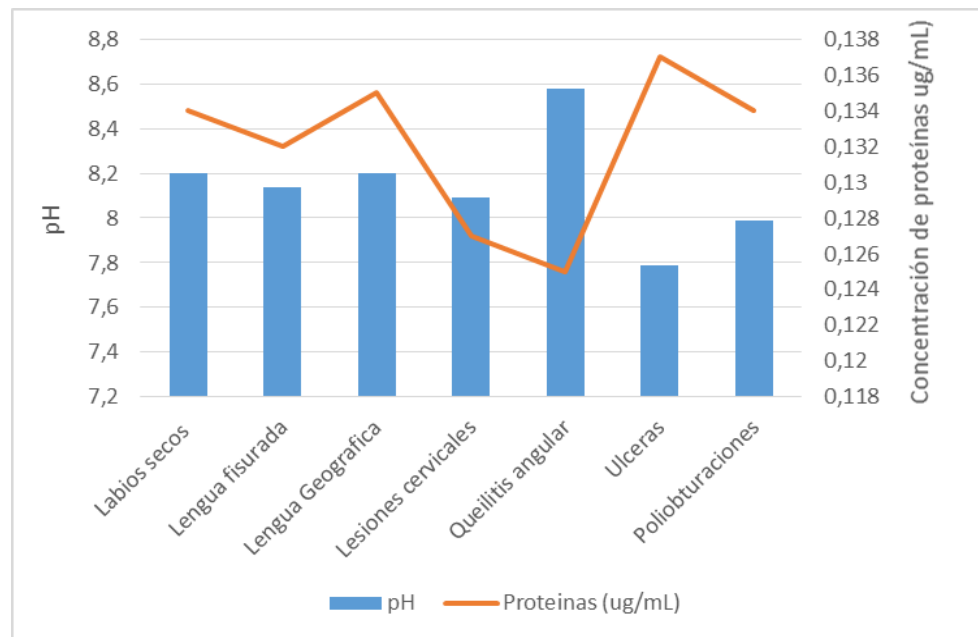
**Tabla 3: Comparación de la Prevalencia de alteraciones orales entre individuos xerostómicos con y sin hiposialia.**

	Hiposiálicos	No Hiposiálicos	p (*)
<b>Labios secos</b>	6	12	0,268
<b>Lengua Fisurada</b>	6	10	0,679
<b>Lengua Geográfica</b>	3	3	0,601
<b>Lesiones Cervicales</b>	3	3	0,601
<b>Queilitis angular</b>	2	0	0,076
<b>Ulceras</b>	1	5	0,174
<b>Poliobtuciones</b>	4	8	0,484

**(\*)Test utilizado: prueba  $\chi^2$  de Pearson**

## VI.6 RELACIÓN ENTRE ALTERACIONES DENTALES, DE MUCOSA Y LENGUA CON PH Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

En la figura 7 se observan la media de pH y concentración de proteínas del total de la muestra y su relación con las alteraciones orales encontradas.



**Figura 7: Relación entre alteraciones orales con la media de pH y concentración de proteínas del total de la muestra.** Las barras representan el pH salival promedio observado en cada alteración, la línea representa la concentración de proteínas salivales promedio observada en cada alteración.

Los datos sobre las alteraciones orales fueron organizados en una tabla donde se muestra el valor estadístico de la relación entre las variaciones de pH y concentración de proteínas con los grupos xerostómicos Hiposialicos y no Hiposialicos, como se observa en las tablas 4 y 5.



**Tabla 4: pH salival en alteraciones orales de sujetos hiposíalicos y no hiposíalicos**

	Hiposiálcos	No Hiposiálcos	p (*)
Labios secos	8,4 ± 0,6	7,8 ± 0,2	0,0249
Lengua Fisurada	8,2 ± 0,6	8,0 ± 0,4	0,219
Lengua Geográfica	8,3 ± 0,8	8,0 ± 0,5	0,3547
Lesiones Cervicales	8,3 ± 0,6	7,8 ± 0,3	0,061
Queilitis angular	8,5 ± 1	†	‡
Ulceras	7,64	7,8 ± 0,2	‡
Poliobturaciones	8,2 ± 0,5	7,9 ± 0,2	0,2049

(\*) Test utilizado: prueba t de Student († ausencia de individuos; ‡ no se puede realizar comparación por falta de datos.

**Tabla 5: Concentración de proteínas salivales promedio (µg/mL) en alteraciones orales de sujetos hiposíalicos y no hiposíalicos.**

	Hiposiálcos	No Hiposiálcos	p (*)
Labios secos	0,132 ± 0,017	0,131 ± 0,012	0,4873
Lengua Fisurada	0,128 ± 0,005	0,132 ± 0,016	0,6789
Lengua Geográfica	0,134 ± 0,011	0,136 ± 0,016	0,6951
Lesiones Cervicales	0,127 ± 0,008	0,127 ± 0,008	0,4557
Queilitis angular	0,125 ± 0,006	†	‡
Ulceras	0,147	0,135 ± 0,011	‡
Poliobturaciones	0,133 ± 0,022	0,134 ± 0,014	0,5178

(\*) Test utilizado: prueba t de Student († ausencia de individuos; ‡ no se puede realizar comparación por falta de datos.

## VII. DISCUSIÓN

La saliva es un fluido de crucial importancia para mantener un correcto funcionamiento de las funciones del sistema estomatognático. Alteraciones cualitativas o una alteración cuantitativa de ésta, asociadas a la xerostomía, pueden condicionar la aparición de diversas alteraciones orales. Es por lo anterior que nuestro estudio planteó asociar características como la velocidad de flujo, pH y concentración de proteínas salivales en sujetos xerostómicos hiposialicos y no hiposialicos con alteraciones dentales, de mucosa oral y lengua.

El presente trabajo arrojó que no existe una asociación significativa entre la prevalencia de alteraciones orales y el valor de flujo salival del individuo.

Respecto a las lesiones orales observadas (labios secos, lengua fisurada y geográfica, lesiones cervicales, queilitis angular y úlceras) se evidenció una tendencia a mayor presencia de queilitis angular en pacientes hiposialicos en comparación a los no hiposialicos la cual si bien no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,076$ ), nos podría llevar a pensar en una directa relación entre la presencia de esta patología y la disminución en el flujo salival, la que debería ser corroborada en futuros estudios con un número mayor de individuos. Cabe recordar que la queilitis angular es una entidad de origen multifactorial, por lo que nuestros resultados deben ser tomados con discreción debido al tamaño muestral y también a la posible presencia de otra patología que exacerbe este signo, como puede ser el síndrome de Sjögren el cual genera una hipofunción glandular que determina la presencia de hiposialia encontrada en estos individuos (García y cols., 2004). Al respecto, un 29,6% de los individuos de nuestro estudio tenía síndrome de Sjögren, lo que explicaría en parte nuestros resultados. En otros estudios se han relacionado estas lesiones con una disminución de la dimensión vertical oclusal (y el pliegue de labios que esta genera) como una de las causales para el acúmulo de saliva y formación de un nicho propicio para la colonización de *Candida albicans*, trastornos inmunológicos, nutricionales (déficit de vitaminas B2 y B6) y hematológicos como la anemia (García y cols., 2004).

Sería interesante a futuro realizar un estudio tomando en cuenta estas variables etiológicas y compararlas con los distintos tipos de queilitis potencialmente

presentes mejorando también la clasificación en sus distintos tipos y relacionándola finalmente con grupos de control en conjunto con un grupo xerostómico.

En lo que respecta la acidez salival, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el pH salival del grupo no hiposialico en comparación con el que presentaba hiposialia para la presencia de labios secos ( $p = 0,0249$ ), lo que nos hace pensar en una asociación positiva entre esta alteración con un pH más bajo en el grupo sin hiposialia, el que también tuvo una mayor prevalencia de sequedad labial. Este resultado discrepa en algunos aspectos con el estudio de Najat, el cual concuerda en que si bien, los labios secos son el signo más común en la xerostomía, variaciones en el pH y la capacidad tamponante no muestran una relación estadísticamente significativa con la presencia o ausencia de labio seco. Además, señala que los labios secos se relacionan positivamente con la presencia de menor flujo salival no estimulado (Najat, 2007).

Otro estudio (Wolff y Kleinberg, 1998) encontró diferencias estadísticamente significativas de pH, lo que los llevó a asociar una baja velocidad de flujo salival con menores valores de pH, resultado que no concuerda con nuestro trabajo. Esto último se podría deber a las diferencias metodológicas en la toma de pH, ya que en el estudio de Wolff y Kleinberg la recolección se realizó en un menor tiempo y se emplearon métodos adicionales, además las mediciones fueron realizadas con papeles medidores y en el nuestro con un medidor digital. Sería interesante realizar un nuevo estudio aumentando el tamaño de la muestra y agregando un grupo control sin xerostomía para corroborar estos resultados y ver las verdaderas implicancias de estas variaciones de pH (Wolff y Kleinberg, 1998).

Si bien las demás alteraciones, como lengua fisurada y lengua geográfica no mostraron diferencias estadísticamente significativas en relación al pH salival, podemos ver que en presencia de lesiones cervicales (erosiones y caries) se evidencia una tendencia ( $p = 0,06$ ), habiendo menores valores en el pH en estos individuos, lo que se condice con la literatura (Sue y Russel, 2001) la cual explica estos resultados como una consecuencia de una potencial desmineralización de las superficies dentarias por estas bajas de pH. Si bien los pH obtenidos en nuestro estudio se pueden considerar básicos en relación a los descritos por el estudio anteriormente citado y no ser suficientemente ácidos para explicar la alta prevalencia de lesiones cervicales, esto se puede explicar debido a que el pH en la

cavidad oral varía según región anatómica al igual que el flujo, teniendo una mayor relevancia el pH de la placa en relación a la película salival adquirida y la capacidad tamponante de la saliva al momento de relacionar una lesión de caries a un pH crítico (Sue y Russel, 2001). La referencia citada también señala que la presencia de los iones calcio, fosfato y proteínas como las estaterinas son cruciales en el proceso de remineralización. La lactoferrina por otro lado limita la disponibilidad de hierro para las bacterias cariogénicas como la *Streptococcus mutans*. Las lisosimas y las peroxidasas también son importantes para eliminar los restos tóxicos de los sistemas bacterianos. No hay que olvidar que la caries es una enfermedad multifactorial por lo que la aparición de las lesiones cariosas depende también de la alimentación del individuo, su cepillado y otro tipo de factores predisponentes. Estos son factores que sería interesante tomar en consideración en investigaciones posteriores ya que no fueron considerados en el presente estudio (Sue y Russel, 2001).

En relación a la cuantificación total de proteínas, también hubo una tendencia hacia una mayor concentración en el caso de las úlceras, pero sin llegar a ser estadísticamente significativa. Estudios al respecto señalan que la concentración de proteínas no varía significativamente cuando se asocia a la presencia o ausencia de un estado ulceroso, sin embargo hace hincapié en un aumento de la IgA, la cual si podría ser de valor predictivo para detectar patologías del espectro autoinmune en mucosa oral, por lo que sería interesante realizar una caracterización de proteínas salivales y así ver su influencia en esta y otras patologías (Oliveira y cols., 2007).

En la queilitis angular por otra parte se observó una menor concentración media de proteínas, lo que resulta interesante si comparamos con la literatura, en la cual no se encuentran estudios al respecto pero sin embargo aborda el tema desde otros dos puntos de vista.

Primero señala que en pacientes con candidiasis la hipofunción glandular es altamente prevalente (todos los pacientes con queilitis en nuestro estudio padecían síndrome de Sjögren) y que esta misma genera una disminución en la cantidad de proteínas antibacterianas y antifúngicas produciendo este sobrecrecimiento de cándida. (Tanida y cols., 2003)

El segundo punto de vista señala que los pacientes con síndrome de Sjögren que están sometidos bajo radioterapia presentan un aumento general de la cantidad de proteínas en saliva, exceptuando la IgA, lo que sería interesante corroborar en futuros estudios (Eliason y cols., 2005).

Hace algunos años se viene trabajando con la humedad de la mucosa yugal como posible medio de diagnóstico para detectar la presencia de hiposialia, ya que se ha visto una relación directa entre esta humedad con la velocidad de flujo, signo el cual puede presentarse en etapas tempranas de la hipofunción glandular funcionando como factor predictivo de ésta, signo que también sería de gran utilidad en futuras investigaciones. (Osailan y cols., 2011).

Las limitaciones de nuestra investigación se deben principalmente al tamaño muestral, y como vimos anteriormente, se observan leves tendencias que nos hacen pensar en que efectivamente la condición xerostómica se asocia tanto a alteraciones cuantitativas como cualitativas de la saliva, sin desmerecer tampoco otros factores asociados, como la presencia de enfermedades autoinmunes o tratamientos con una gran variedad de fármacos (Von Bültzingslöwen y cols., 2007; Agha-Hosseini y Moosavi, 2013).

Otra limitación es nuestro grupo de estudio, el cual consta solo de individuos xerostómicos debido a que este trabajo se adscribe a un proyecto FONIS el cual tenía como objetivo dar solución a la xerostomía de diverso origen. Es por lo anterior que a futuro sería interesante plantear un estudio con un grupo control de individuos sanos y otro con xerostomía para comparar parámetros salivales y también alteraciones orales y así determinar qué factores se asocian más a las diversas variaciones de la velocidad de flujo salival. Sin duda un mayor número de individuos en el estudio ayudaría a corroborar los resultados obtenidos en la presente investigación.

## VIII. CONCLUSIONES

- El pH del grupo no hiposialico fue significativamente menor respecto al de hiposialicos para la presencia de labios secos, lo que corrobora en parte la hipotesis planteada.

- No hubo diferencias significativas en relación a la prevalencia de alteraciones entre hiposialicos y no hiposialicos. Sin embargo existe una tendencia a una mayor presencia de queilitis angular en individuos hiposialicos.

- No hubo diferencias significativas al asociar el pH entre lesiones orales y grupos hiposialicos y no hiposialicos, aunque existe una leve tendencia a que las lesiones cervicales se asocien a un pH más bajo en el grupo de no hiposialicos en comparación a los hiposialicos.

- No hubo diferencias significativas al asociar alteraciones orales con la concentración total de proteínas salivales, aunque en las úlceras hubo una inclinación a asociarse con mayor concentración de proteínas, y la queilitis angular tuvo una tendencia a presentar menor concentración de proteínas salivales.

- En general, la evidencia respecto a las alteraciones cualitativas y cuantitativas salivales y su influencia en la presencia de alteraciones orales es escasa, por lo que son necesarios más estudios que, con los enfoques anteriormente planteados, permitan dilucidar el rol de estas características salivales en la aparición de alteraciones orales en el individuo con xerostomía.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agha-Hosseini F, Moosavi M (2013). An Evidence-Based Review Literature About Risk Indicators and Management of Unknown-Origin Xerostomia. *Journal of Dentistry* Vol. 10, No. 3.

Aguirre J (2002). Candidiasis orales. *Rev IberoamMicol* 19: 17-21.

Aitken J, Maturana A, Morales I, Hernández M, Rojas-Alcayaga G (2013). Estudio de confiabilidad de la prueba de sialometría para flujo no estimulado en sujetos adultos clínicamente sanos. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* Vol. 6(1); 25-28.

Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, Curran A, Barrow D, Barros S y cols. (2013). Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow and dry mouth. *J Prosthodont* 22(1): 13-22.

Araújo A.; Machado L.; Antoninha A.; José W. (2014) Environmental pH Influences *Candida Albicans* Biofilms Regarding Its Structure, Virulence And Susceptibility To Fluconazole. *MicrobialPathogenesis*. Aceptado 20 de Marzo de 2014.

Asociación Médica Mundial (1964). Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. [URL disponible en: [http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/17c\\_es.pdf](http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/17c_es.pdf) (acceso en abril de 2015)]

Bagán JV, Ceballos A, Bermejo A, Aguirre JM, Peñarrocha M. "Medicina Oral". 1995. Barcelona, España. Ed. Masson S.A. Parte IV. Cap. 24-29. Pág. 257-310.

Balasubramaniam R, Klasser GD, Delcanho R (2009). Separating oral burning from burning mouth syndrome: unravelling a diagnostic enigma. *Australian Dental Journal* 54: 293–299.

Bascones A, Tenovuo J, Ship J, Turner M, Mac-Veigh I, López-Ibor JM y cols. (2007). Conclusiones del Simposium 2007 de la Sociedad Española de Medicina Oral sobre "Xerostomía. Síndrome de Boca Seca. Boca Ardiente". *AvOdontoestomatol* 23(3):119-126.

Blanco A, Otero E (2014). Patología oral asociada a la sequedad bucal. *Av. Odontoestomatol* 30(3): 129-133.

Caplan D, Hunt R (1996). Salivary flow and risk of tooth loss in an elderly population. *Commun Dent Oral Epidemiol* 24:68-71.

Chimenos E (2014). Boca seca y bocaardiente. *Av. Odontoestomatol*; 30 (3): 117-120.

Ciancio G (1996). Medications as Risk Factors for Periodontal Disease; J Periodontol 67:1055-9.

Davis D. (2003). Adaptation To Environmental pH In Candida Albicans And Its Relation To Pathogenesis. Curr Genet 44: 1-7.

Eliasson L, Almståhl A, Lingström P, Wikström M, Carlén A (2005). Minor gland saliva flow rate and proteins in subjects with hyposalivation due to Sjogren's syndrome and radiation therapy. Arch Oral Biol 50(3):293-9.

Farnaud SJC, Kostić O, Getting SJ, Renshaw D (2010). Saliva: Physiology and Diagnostic Potential in Health and Disease. The Scientific World JOURNAL 10, 434–456.

Fenoll-Palomares C, Muñoz-Montagud JV, Sánchez V, Herreros B, Hernández V, Mínguez M, Benages A (2004). Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. Rev Esp Enferm Dig 96(11): 773-783.

Fox PC, Busch KA, Baum BJ (1987). Subjective reports of xerostomia and objective measures of salivary gland performance. J Am Dent Assoc 115:581–4.

García E, Blanco A, Rodríguez L, Reyes D, Sotres J. (2003). Queilitis. Revisión bibliográfica. Rev Cubana Estomatol v.41 n.2.

Gendreau L, Loewy ZG (2011). Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J Prosthodont 20: 251-260.

Glazar I, Urek MM, Brumini G, Pezelj-ribaric S (2010). Oral sensorial complaints, salivary flow rate and mucosal lesions in the institutionalized elderly. Journal of Oral Rehabilitation 37: 93–99.

Glore RJ, Spiteri-Staines K, Paleri V (2009). A patient with dry mouth. Clinical Otolaryngology 34:358–363.

Guggenheimer J, Moore PA (2003). Xerostomia: etiology, recognition and treatment. JADA 134: 61–69.

Han P, Suarez-Durall P, Mulligan R (2015). Dry mouth: A critical topic for older adult patients. Journal of Prosthodontic Research 59:6-19.

Henskens Y, van der Velden U, Veerman E, Nieuw Amerongen A (1993). Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis or periodontitis. J Periodontal Res. 28(1):43-8.

Huerta J, Silva N (1996). El Género Candida y su importancia en Patología Bucal. Revisión Actualizada. Rev Fac Odont Univ de Chile 14:27-37.

Jain K, Sharma P (2005). Comprehensive Objective Biology. Segunda edición New Dehli: Golden Bells.



Jain K, Kaur H (2015). Prevalence of oral lesions and measurement of salivary pH in the different trimesters of pregnancy. *Singapore Med J* 56(1): 53-57.

Jensen JL, Barkvoll P (1998). Clinical implications of the dry mouth. *Annals of the New York Academy of Sciences* 842:156-162.

Kivela J, Parkkila S, Metteri J, Parkkila A-M, Toivanen A, Rajaniemi H (1997). Salivary carbonic anhydrase VI concentrations and its relation to basic characteristics of saliva in young men. *ActaPhysiolScand* 161: 221-225.

Liu B, Dion MR, Jurassic MM, Gibson G, Jones JA (2012). Xerostomia and salivary hypofunction in vulnerable elders: Prevalence and etiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 114:52-60.

Llena-Puy C (2006). The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11:E449-55.

Mays JW, Sarmadi M, Moutsopoulos NM (2012). Oral manifestations of systemic autoimmune and inflammatory diseases: Diagnosis and clinical management. *J Evid Base Dent Pract S1*: [265-282].

Márton K, Madléna M, Bánóczy J, Varga G, Fejérdy P, Sreebny LM, y cols., (2008). Unstimulated whole saliva flow rate in relation to sicca symptoms in Hungary. *Oral Diseases* 14, 472–477.

Morales I, Ortega A, Rojas G, Aitken J, Salinas J, Lefimil C, y cols., (2015). Reporte preliminar sobre el efecto de un sustituto salival a base de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y linaza (*Linum usitatissimum*) en el alivio de la xerostomía en adultos mayores. [URL disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-01072015000200008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-01072015000200008&script=sci_arttext) (acceso en noviembre de 2015)]

Mulki S, G. Prakash P, Pushparaj S, (2013). Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis. *J Indian SocPeriodontol.* 17(1): 42–46.

Najat M, (2007). Signs of oral dryness in relation to salivary flow rate, pH, buffering capacity and dry mouth complaints. *BMC Oral Health* 7:15.

Napeñas JJ, Brennan MT, Fox PC (2009). Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). *Odontology* 97:76–83.

Närhi TO, Vehkalahti MM, Siukosaari P, Ainamo A (1998). Salivary findings, daily medication and root caries in the old elderly. *Caries Res* 32:5-9.

Navazesh M, Christensen C, Brightman V, (1992). Clinical Criteria for the Diagnosis of Salivary Gland Hypofunction. *J Dent Res* 71(7):1363-1369.

Navazesh M (1993). Methods for collecting saliva. *Ann N Y AcadSci* 694:72–7.

Oliveira K, Lúcio L, Bento J, (2007). Secretory A immunoglobulin, total proteins and salivary flow in Recurrent Aphthous Ulceration. *Rev Bras Otorrinolaringol* 73(3):323-8.

Osailan S, Pramanik R, Shirodaria S, Challacombe S, Proctor G, (2011). Investigating the relationship between hyposalivation and mucosal wetness. *Oral Diseases* 17, 109–114.

Perez Vallespir I (2015). Recuento y Diversidad de especies de levaduras del género *Candida* y su asociación con pH Salival en Pacientes Diabéticos tipo 2, con distinto grado de control metabólico (Trabajo de Investigación Requisito Para Optar al Título de Cirujano-Dentista). Departamento de patología y medicina oral. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Pink R, Simek J, Vondrakova J, Faber E, Michl P, Pazdera J y cols. (2009). Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub* 153(2):103–110.

Rodríguez J.; Miranda J.; Morejón H.; Santana J. (2002). Candidiasis De La Mucosa Bucal. Revisión Bibliográfica. *Rev Cubana Estomatol* V.39 N.2.

Rojas G, Latorre R, Ortega A (2000). Depresión mayor y salud oral: Rol de los fármacos antidepresivos. *Rev Chil Neuro-Psiquiat* 38(2): 126-130.

Silvestre-Donat FJ, Miralles-Jordá L, Martínez-Mihi V (2004). Tratamiento de la boca seca: puesta al día. *Med Oral* 9:273-279.

Sreebny LM, Banoczy J, Baum BJ, Edgar WM, Epstein JB, Fox PC y cols. (1991). Saliva. The Working Group of the Commission on Oral Health, Research and Epidemiology (CORE). *Federation Dentaire Internationale*. London: FDI World Dental Press.

Sue P., Russel T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 85:162-9.

Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E y cols. (2003). Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* 32: 586-94.

Tanner A, Maiden M, Macuch P, Murray L, Kent Jr. R (1998). Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 25:85-98.

Valdez IH, Fox PC (1993). Diagnosis and management of salivary dysfunction. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(3-4): 271-7.

Von Bültzingslöwen I, Sollecito TP, Fox PC, Daniels T, , Jonsson R, Lockhart PB, y cols., (2007). Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103(suppl 1):S57.e1-S57.e15.

Wolff M, Kleinberg I, (1998). Oral mucosa I wetness in hypo- and normosalivators. Archives of Oral Biology 43 455-462.

World Health Organization (2010). International Statistical Classification of Diseases And Related Health Problems. [URL disponible en: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2015/en> (acceso en abril de 2015)]

## X. ANEXOS

### Anexo 1: Encuesta de Xerostomía

Encuesta de Xerostomía (Fox y cols., 1987)		
Conteste las siguientes preguntas:	Si	No
¿Siente la boca seca usualmente?		
¿Siente la saliva espesa?		
¿Tiene sensación de ardor en la lengua?		
¿Necesita tomar líquidos para tragar la comida?		
¿Tiene dificultades para tragar?		

## Anexo 2: Consentimiento informado



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS  
ÁREA DE BIOQUÍMICA  
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL

Fonis  
FONDO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN  
Y DESARROLLO EN SALUD

### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROYECTO DE INVESTIGACION

Esta acta de consentimiento tiene como fin entregar a Ud. toda la información necesaria y explicitar los compromisos suyos, como paciente y el de los investigadores, para que su participación en este estudio sea libre, informada y voluntaria.

INSTITUCIÓN PATROCINANTE: Fondo Nacional de Investigación y desarrollo en Salud (FONIS), Programa de CONICYT, Gobierno de Chile.

TÍTULO DEL ESTUDIO: "ENSAYO CLINICO ALEATORIZADO PARA EVALUAR LA EFICACIA DE UN SUSTITUTO SALIVAL CASERO, EN BASE A MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) Y SEMILLAS DE ACEITE DE LINAZA (*Linum usitatissimum*), EN EL ALIVIO DE LA SENSACIÓN DE BOCA SECA DE DISTINTO ORIGEN".

OBJETIVO DEL ESTUDIO: El principal objetivo de este estudio es determinar la eficacia de un sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de aceite de linaza (*Linum usitatissimum*), en el alivio de la sensación de boca seca de cualquier origen en individuos adultos mayores.

MODALIDAD DE PARTICIPACIÓN DE LOS VOLUNTARIOS. Los sujetos seleccionados participarán en un ensayo clínico aleatorizado, cruzado, con blanqueamiento y con modalidad de análisis por intención de tratar. Se les realizará un examen clínico intra y extraoral por parte de Cirujanos-Dentistas calibrados. Posteriormente, serán seleccionados mediante el uso de una encuesta validada para xerostomía (Encuesta de Fox) y separados en dos grupos de tratamiento (aquellos tratados con el sustituto salival convencional y los individuos tratados con el sustituto salival casero). No se incluirán personas analfabetas. El estudio durará 14 semanas en total, que incluirán 2 semanas de fase de blanqueamiento. Los participantes del estudio deberán contestar dos encuestas; una encuesta previa y una encuesta posterior, con cada sustituto. Los sustitutos salivales serán entregados por los investigadores y los gastos de traslado serán por cuenta del proyecto. Durante el ensayo clínico, los participantes deberán entregar muestras de saliva para medir el flujo salival. A los individuos no seleccionados para participar en el ensayo se les informará del estado de su salud bucal y en caso de ser necesario se les orientará sobre como proceder para su posterior atención y tratamiento.

A continuación usted declara que:

1. Al firmar este documento, voluntariamente doy mi consentimiento para participar de una investigación cuyo profesional responsable es la Dra. Irene Morales, y que es realizado conjuntamente por la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, la Unidad Dental del Centro de Referencia de Salud de Peñalolén Cordillera Oriente y el Fondo Nacional para la Investigación y Desarrollo en Salud (FONIS).



Ed: 12/09/2012

2. Estoy en conocimiento que esta investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de un sustituto salival casero, sobre la sensación de boca seca de individuos afectados con dicha condición.
3. Comprendo que se me realizarán tres entrevistas en que se me preguntarán antecedentes personales, antecedentes médicos, y opiniones. Además comprendo que se me realizará un examen clínico bucal y toma de muestra de saliva por parte de un Cirujano-Dentista al que autorizo expresamente para realizar dicho procedimiento.
4. Estoy en conocimiento de que por el hecho de participar en esta investigación, tendré que usar un producto bucal en forma diaria durante seis semanas, tiempo posterior al cual se me volverá a realizar una entrevista. Entiendo que después de 2 semanas, tendré que usar otro producto en forma diaria por seis semanas, tiempo posterior al cual se me volverá a realizar una entrevista.
5. Sé que ninguno de los procedimientos mencionados (examen clínico, entrevista y uso del producto bucal) tendrá costo para mi persona.
6. Declaro que mi participación en este estudio es libre y voluntaria, pudiendo incluso dejar de participar en él cuando lo desee. Sé que la información obtenida de mi persona será manejada de manera absolutamente confidencial, y únicamente utilizada para fines de investigación sin fines de lucro. Entiendo que mi nombre y mis datos personales no serán jamás identificados públicamente.
7. Por mi condición de voluntario, entiendo que no recibiré ningún pago de dinero y que mi participación en este estudio no obliga de manera alguna a los investigadores a hacerse cargo en forma gratuita del tratamiento de posibles enfermedades bucales. Entiendo sí, que se me entregará el dinero necesario para los gastos de movilización asociados al estudio.
8. Entiendo sí, que por el hecho de participar en el estudio, tengo derecho a que se me informe sobre los resultados de los exámenes que se me realicen y a realizar cualquier tipo de preguntas relacionadas con dudas que me surjan acerca de la investigación antes, durante y después del ensayo.
9. Comprendo que los beneficios para mi persona por el hecho de participar en esta investigación serán: 1) tener información de mi estado de salud bucal y de posibles infecciones bucales 2) que usar el producto bucal podría ayudar a tener mi boca en mejores condiciones de salud.
10. Me han informado que, el uso del producto bucal podría eventualmente provocar reacciones no deseables que en general son de muy baja ocurrencia, tales como alteración del gusto (sabor de los alimentos), irritación, ardor y reacción alérgica. En tal caso DEBO SUSPENDER SU USO y comunicarme con el equipo investigador lo antes posible, quienes obligatoriamente realizarán el diagnóstico y tratamiento de esas molestias con cargo al Equipo de investigadores de la Facultad de Odontología.
11. Me han informado que, en caso de sufrir algún daño relacionado directamente con el estudio, la compensación de estos daños estará a cargo del Equipo de investigadores de la Facultad de Odontología.



Ed:12/09/2012

12. Entiendo que si el producto en estudio resulta eficaz en aliviarme los síntomas de boca seca, la información de su preparación y uso estará disponible en los Centros de Atención Primaria del Servicio de Salud.
13. Si necesito cualquier aclaración o información adicional sobre esta investigación y de mi participación en él, debo dirigirme a la Dra. Irene Morales al teléfono 9781794 o al Dr. Gonzalo Rojas al teléfono 9781811.
14. Entiendo que si ocurriese cualquier evento fortuito o inesperado, relacionado o no con el estudio, debo comunicarlo al Médico del Equipo de investigadores Dr. José Manuel Manríquez, al teléfono 9781775 o al 9781712.
15. Para cualquier aclaración sobre mis derechos como voluntario para esta investigación, puedo tomar contacto con el Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Profesor Dr. Juan Cortés Araya. Dirección Sergio Livingstone Polhammer (exOlivos) 943, Independencia. Teléfono: 9781702.

Fecha de aplicación: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Nombre del Voluntario Participante en el Estudio Firma  
 FONO: \_\_\_\_\_ RUT: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Nombre del Investigador que toma el Consentimiento Informado Firma

\_\_\_\_\_  
 Nombre del Investigador Responsable del Proyecto Firma



**Anexo 3: Acta de aprobación proyecto FONIS SA12I2207 “Ensayo clínico aleatorizado para evaluar la eficacia de un sustituto salival casero, en base a Manzanilla (Matricaria chamomilla) y semillas de aceite de linaza (Linum usitatissimum), en el alivio de la sensación de boca seca de distinto origen”**

Santiago, 12 de octubre 2012

Señora  
IRENE MORALES  
Investigador/a Principal  
Propuesta Proyecto FONIS: SA12I2207  
Presente

Estimada Sra. Morales,

A través de la presente, tengo a bien informar a usted que ha concluido el proceso de evaluación y selección del IX Concurso de Proyectos de Investigación y Desarrollo en Salud, FONIS 2012.

Dicho proceso se realizó a través de la conformación y funcionamiento de Comités de Evaluación, los que trabajaron en paneles, solicitándose además la opinión de evaluadores externos para algunas propuestas en particular. Se contó también con la contribución del Comité Asesor y los resultados emanados de dicho proceso, fueron finalmente sancionados por el Consejo del FONIS.

Este año se presentaron en la segunda etapa del concurso 120 proyectos y, de acuerdo al análisis de la información generada en el proceso de evaluación, el Consejo FONIS ha resuelto aprobar 41 de éstos para ser adjudicados. Esto equivale aproximadamente a un 34,2% de los presentados a esta etapa del concurso 2012.

Me es muy grato informarle que, en esta oportunidad, el proyecto que usted postuló como Investigador/a Principal fue seleccionado para ser adjudicado. Le recuerdo que esta aprobación puede estar sujeta a condiciones de adjudicación, las que serán estipuladas en la síntesis de evaluación que le enviaremos próximamente.

Felicitando a usted y a su equipo por el éxito alcanzado en este concurso y agradeciendo su interés por participar en el Concurso de proyectos FONIS.

Le saluda muy atentamente,

María Ximena Luengo Charath  
Directora Ejecutiva  
Programa FONIS de CONICYT/MINSAL  
Tel.: (56-2) 365 4604 – 365 4678  
Fax: (56-2) 655 1394  
email: [mluengo@conicyt.cl](mailto:mluengo@conicyt.cl)<mailto:[mluengo@conicyt.cl](mailto:mluengo@conicyt.cl)>  
[www.conicyt.cl](http://www.conicyt.cl)<<http://www.conicyt.cl>>



## **Anexo 4: Clasificación de enfermedades**

Según la Clasificación Internacional de Enfermedades (determinada y regulada por la OMS) las lesiones que se intentarán pesquisar en nuestro estudio se encuentran en el apartado “Enfermedades del aparato digestivo” cuyos códigos van desde K00 al K93. En el caso de la úlcera traumática por la posibilidad de tener un origen no dentario se consignó en el código de otras lesiones no especificadas (K13.7), quedando finalmente de esta manera:

**K02:** Caries dental

**K03:** Otras enfermedades de los tejidos duros del diente (lesiones cervicales)

### **K13: Enfermedades de los labios**

**K13.0** Queilitis angular

**K13.1** Mordedura de labio y mejilla (úlceras traumáticas)

**K13.7** Otras lesiones y las no especificadas de la mucosa bucal (úlceras traumáticas de origen no dentario)

### **K14: Enfermedades de la lengua**

**K14.1** Lengua geográfica (Glositis migratoria benigna)

**K14.5** Lengua plegada (Lengua fisurada)

## Anexo 5: Manual Kit Bio Rad Protein Assay



# Bio-Rad Protein Assay

For Technical Service  
Call Your Local Bio-Rad Office or  
in the U.S. Call **1-800-4BIORAD**  
(1-800-424-6723)

**BIO-RAD**

## Table of Contents

<b>Section 1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1	Principle .....	1
1.2	Product Description.....	3
1.3	Materials Required but Not Supplied.....	3
<b>Section 2</b>	<b>Instructions</b> .....	<b>4</b>
2.1	Reconstituting the Standard .....	4
2.2	Standard Procedure .....	4
2.3	Microassay Procedure .....	5
2.4	Microtiter Plate Protocols .....	6
<b>Section 3</b>	<b>Common Questions</b> .....	<b>8</b>
<b>Section 4</b>	<b>Troubleshooting Guide</b> .....	<b>12</b>
<b>Section 5</b>	<b>Ordering Information</b> .....	<b>13</b>
<b>Section 6</b>	<b>Safety Information</b> .....	<b>14</b>
<b>Section 7</b>	<b>References</b> .....	<b>24</b>

## Section 1

### Introduction

The Bio-Rad Protein Assay, based on the method of Bradford, is a simple and accurate procedure for determining concentration of solubilized protein. It involves the addition of an acidic dye to protein solution, and subsequent measurement at 595 nm with a spectrophotometer or microplate reader. Comparison to a standard curve provides a relative measurement of protein concentration.

#### 1.1 Principle

The Bio-Rad Protein Assay is a dye-binding assay in which a differential color change of a dye occurs in response to various concentrations of protein.<sup>1</sup> The absorbance maximum for an acidic solution of Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue G-250 dye shifts from 465 nm to 595 nm when binding to protein occurs.<sup>2,3,4</sup> The Coomassie blue dye binds to primarily basic and aromatic amino acid residues, especially arginine.<sup>5</sup> Spector<sup>6</sup> found that the extinction coefficient of a dye-albumin complex solution was constant over a 10-fold concentration range. Thus, Beer's law may be applied for accurate quantitation of protein by selecting an appropriate ratio of dye volume to sample concentration.

Interferences may be caused by chemical-protein and/or chemical-dye interactions. Table 1 lists those chemical reagents not directly affecting the development of dye color. (Note: Basic buffer conditions and detergents interfere with this assay.) Since every protein-chemical reagent combination has not been assayed, it is possible that some of the listed reagents produce interference in combination with certain proteins. However, with respect to proteins such as bovine serum albumin and gamma globulin, the listed reagents show little or no interference. The acceptable concentrations of reagents for the Standard Procedure are shown in Table 1. Equivalent concentrations of reagents for the Microassay Procedure (see Section 2) are 1/40 of those listed in this table, due to the difference of sample-to-dye ratios between the Standard and Microassay Procedures.

**Table 1. Reagents Compatible with the Bio-Rad Protein Assay When Using the Standard Procedure.\***

Acetate, 0.6 M	KCl, 1.0 M
Acetone	Malic acid, 0.2 M
Adenosine, 1 mM	MgCl <sub>2</sub> , 1.0 M
Amino Acids	Mercaptoethanol, 1.0 M
Ammonium sulfate, 1.0 M	MES, 0.7 M
Ampholytes, 0.5%	Methanol
Acid pH	MOPS, 0.2 M
ATP, 1 mM	NaCl, 5 M
Barbital	NAD, 1 mM
BES, 2.5 M	NaSCN, 3 M
Boric acid	Peptones
Cacodylate-Tris, 0.1 M	Phenol, 5%
CDTA, 0.05 M	Phosphate, 1.0 M
Citrate, 0.05 M	PIPES, 0.5 M
Deoxycholate, 0.1%	Polyadenylic acid, 1 mM
Dithiothreitol, 1 M	Polypeptides (MW<3000)
DNA, 1 mg/ml	Pyrophosphate, 0.2 M
EDTA, 0.1 M	rRNA, 0.25 mg/ml
EGTA, 0.05 M	tRNA, 0.4 mg/ml
Ethanol	total RNA, 0.30 mg/ml
Eagle's MEM	SDS, 0.1%
Earle's salt solution	Sodium phosphate
Formic acid, 1.0 M	Streptomycin sulfate, 20%
Fructose	Triton X-100, 0.1%
Glucose	Tricine
Glutathione	Tyrosine, 1 mM
Glycerol, 99%	Thymidine, 1 mM
Glycine, 0.1 M	Tris, 2.0 M
Guanidine-HCl	Urea, 6 M
Hank's salt solution	Vitamins
HEPES buffer, 0.1 M	

\* Interference may be caused by chemical-protein and/or chemical-dye interactions. Table 1 lists those chemical reagents not directly affecting the development of dye color. Since every protein-chemical reagent combination has not been assayed, it is possible that some of the listed reagents produce interference in combination with certain proteins. However, with respect to proteins such as bovine albumin and globulin, the above listed reagents show little or no interference.

## 1.2 Product Description

Protein Assay Dye Reagent Concentrate (catalog number 500-0006) contains 450 ml of solution containing dye, phosphoric acid, and methanol. One bottle of dye reagent concentrate is sufficient for 450 assays using the standard assay procedure, or 2,250 assays using the microassay procedure.

The Dye Reagent Concentrate can be purchased in a kit with one of two standards: Bovine gamma globulin (Kit I, catalog number 500-0001) or bovine serum albumin (Kit II, catalog number 500-0002).

The Bio-Rad Protein Assay is for research use only.

## 1.3 Materials Required but Not Supplied

### For standard assay

Spectrophotometer set to 595 nm

Cuvettes with 1 cm path length matched to laboratory spectrophotometer. Bio-Rad's disposable polystyrene cuvettes (catalog number 223-9950) are recommended

13 x 100 mm test tubes

Test tube rack for 13 x 100 mm test tubes

Vortex mixer

Whatman #1 filter (or equivalent) and funnel for dye reagent preparation

Graduated cylinders, pipets, and containers for reagent preparation and storage

Pipets accurately delivering 100  $\mu$ l and 5.0 ml

### For microplate assay

Microtiter plates

Pipets accurately delivering 200  $\mu$ l and 800  $\mu$ l

## Section 2

### Instructions

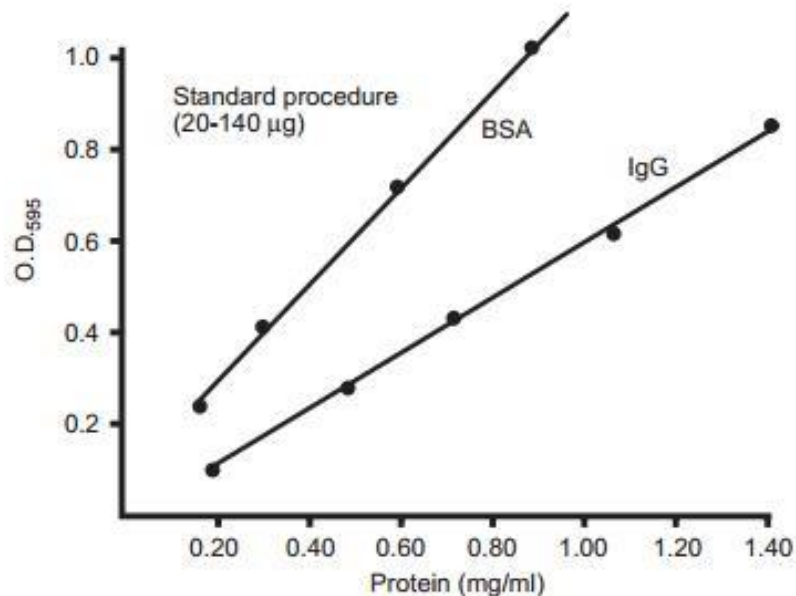
#### 2.1 Reconstituting the Standard

To reconstitute the lyophilized bovine gamma globulin and bovine serum albumin standards, add 20 ml of deionized water and mix until dissolved. If the standard will not be used within 60 days, it should be aliquoted and frozen at -20 °C.

Note: The standards contain buffer salts required for solubilizing the protein.

#### 2.2 Standard Procedure

1. Prepare dye reagent by diluting 1 part Dye Reagent Concentrate with 4 parts distilled, deionized (DDI) water. Filter through Whatman #1 filter (or equivalent) to remove particulates. This diluted reagent may be used for approximately 2 weeks when kept at room temperature.
2. Prepare three to five dilutions of a protein standard, which is representative of the protein solution to be tested. The linear range of the assay for BSA is 0.2 to 0.9 mg/ml, whereas with IgG the linear range is 0.2 to 1.5 mg/ml. (See Common Questions, question 4, for more information.)
3. Pipet 100  $\mu$ l of each standard and sample solution into a clean, dry test tube. Protein solutions are normally assayed in duplicate or triplicate.
4. Add 5.0 ml of diluted dye reagent to each tube and vortex.
5. Incubate at room temperature for at least 5 minutes. Absorbance will increase over time; samples should incubate at room temperature for no more than 1 hour.
6. Measure absorbance at 595 nm.

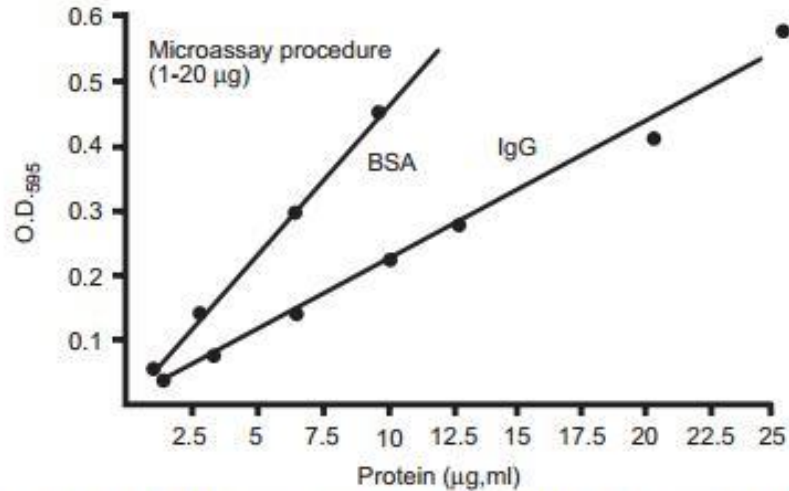


**Fig. 1. Typical standard curve for the Bio-Rad Protein Assay, bovine gamma globulin (standard I), bovine serum albumin (standard II).** O.D.<sub>595</sub> corrected for blank - 200-1,400 µg/ml x 0.1 ml = 20-140 µg protein.

### 2.3 Microassay Procedure

1. Prepare three to five dilutions of a protein standard which is representative of the protein solution to be tested. The linear range of the assay for BSA is 1.2 to 10.0 µg/ml, whereas with IgG the linear range is 1.2 to 25 µg/ml. (See Common Questions, question 4, for more information.)
2. Pipet 800 µl of each standard and sample solution into a clean, dry test tube. Protein solutions are normally assayed in duplicate or triplicate.
3. Add 200 µl of dye reagent concentrate to each tube and vortex.
4. Incubate at room temperature for at least 5 minutes. Absorbance will increase over time; samples should incubate at room temperature for no more than 1 hour.
5. Measure absorbance at 595 nm.





**Fig. 2. Typical standard curve for the Bio-Rad Protein Microassay (1-20 µg/ml), bovine gamma globulin (standard I), bovine serum albumin (standard II).**  
 O.D.<sub>595</sub> corrected for blank. 1.25-25 µg/ml x 0.8 ml = 1-20 µg protein.

## 2.4 Microtiter Plate Protocols

The Bio-Rad Protein Assay can also be used with a microplate reader, such as Bio-Rad's Model 450 and 3550 Microplate Readers. The linear range of the Standard and Microassay procedures when used in the microtiter plate format is slightly changed, since the ratio of sample to dye is modified.

### Standard Procedure for Microtiter Plates

1. Prepare dye reagent by diluting 1 part Dye Reagent Concentrate with 4 parts DDI water. Filter through a Whatman #1 filter (or equivalent) to remove particulates. This diluted reagent may be used for about 2 weeks when kept at room temperature.
2. Prepare three to five dilutions of a protein standard, which is representative of the protein solution to be tested. The linear range of this microtiter plate assay is 0.05 mg/ml to approximately 0.5 mg/ml. Protein solutions are normally assayed in duplicate or triplicate.

3. Pipet 10  $\mu\text{l}$  of each standard and sample solution into separate microtiter plate wells.
4. Add 200  $\mu\text{l}$  of diluted dye reagent to each well. Mix the sample and reagent thoroughly using a microplate mixer. Alternatively, use a multi-channel pipet to dispense the reagent. Depress the plunger repeatedly to mix the sample and reagent in the well. Replace with clean tips and add reagent to the next set of wells.
5. Incubate at room temperature for at least 5 minutes. Absorbance will increase over time; samples should incubate at room temperature for no more than 1 hour.
6. Measure absorbance at 595 nm.

#### **Microassay Procedure for Microtiter Plates**

1. Prepare three to five dilutions of a protein standard, which is representative of the protein solution to be tested. The linear range of the assay is 8.0  $\mu\text{g/ml}$  to approximately 80  $\mu\text{g/ml}$ . Protein solutions are normally assayed in duplicate or triplicate.
2. Pipet 160  $\mu\text{l}$  of each standard and sample solution into separate microtiter plate wells.
3. Add 40  $\mu\text{l}$  of dye reagent concentrate to each well. Mix the sample and reagent thoroughly using a microplate mixer. Alternatively, use a multi-channel pipet to dispense the reagent. Depress the plunger repeatedly to mix the sample and reagent in the well. Replace with clean tips and add reagent to the next set of wells.
4. Incubate at room temperature for at least 5 minutes. Absorbance will increase over time; samples should incubate at room temperature for no more than 1 hour.
5. Measure absorbance at 595 nm.

## Section 3

### Common Questions

1. The buffer that I normally use is not listed in the reagent compatibility list. How will I know if it interferes with the Bio-Rad Protein Assay?

It is best to run two standard curves, one with protein in the same buffer as your sample and one with protein in water, and then plot a graph of protein concentration versus absorbance. If the buffer does not interfere, the two graphs of the standard curve will have identical slope. Partial interference can be compensated for by adding the buffer or interfering component to the standard curve for the actual protein assay.

2. My sample contains a detergent concentration which is incompatible with the Bio-Rad Protein Assay. How can I assay for protein?

If the protein concentration is high enough, a sample with detergent can be diluted so that the concentration of detergent is reduced to 0.1% or less. Excess detergent can also be removed from a protein solution with Bio-Beads<sup>®</sup> SM-2 adsorbent.

Alternatively, the Bio-Rad *DC* (detergent compatible) Protein Assay can be used. The *DC* Protein Assay is a modified Lowry assay which works in the presence of 1% ionic or nonionic detergent. This two-step method is ready to evaluate in just 15 minutes, and each kit will assay up to 500 samples with the standard method, or 10,000 samples with the microplate method.

3. Which protein assay method should I choose, the Bio-Rad (Bradford) Protein Assay or the *DC* (detergent compatible) Protein Assay?

There are distinct advantages for each assay depending upon the application. The Bio-Rad Protein Assay, based on the Bradford method, can be used in the presence of sugars, DTT, and 2-mercaptoethanol which may interfere with the Bio-Rad *DC* Protein Assay. Alternatively, the Bio-Rad *DC* Protein Assay can be used in the presence of detergents and sodium hydroxide, two components known to interfere with the Bradford assay. If the sample is in a buffer that is compatible with both assays, then either may be used.

4. My sample is a mixture of proteins. Which protein standard should I use to generate the standard curve?

In any protein assay, the best protein to use as a standard is a purified preparation of the protein being assayed. In the absence of such an absolute reference protein, one must select another protein as a **relative** standard. The best relative standard to use is one which has similar properties to, and which gives a color yield similar to that of, the protein(s) being assayed.

Any purified protein can be selected as a reference standard if only *relative* protein values are desired. Bio-Rad offers two standards, Bovine gamma globulin (Standard I, catalog number 500-0005) and bovine serum albumin (Standard II, catalog number 500-0007).

5. How does the Bio-Rad Protein Assay compare to other assay methods?

The Bio-Rad Protein Assay compares favorably with two other protein assay methods, the Biuret and the Lowry. In the table below, results are tabulated from dilutions made to gravimetrically prepared 10 mg/ml solutions of commercially available proteins. Bio-Rad Protein Standard I (bovine gamma globulin) was used for the Lowry and Bio-Rad Protein Assays, with bovine serum albumin was used for the Biuret method. All three assays display considerable variation in response to different proteins, but the averages were comparable.

**Table 2. Comparison of Bio-Rad, Lowry, and Biuret Protein Assays for 23 Proteins**

All assays were performed on appropriate dilutions of gravimetrically prepared 10 mg/ml solutions of commercially obtained proteins. Standards were as described in the text.

		<b>Assay Results (Protein mg/ml)</b>		
		<b>Biuret</b>	<b>Lowry</b>	<b>Bio-Rad</b>
1.	Alcohol dehydrogenase	5.8	5.0	7.8
2.	$\alpha$ -Amylase	6.8	6.0	8.3
3.	Bovine serum albumin	9.7	8.4	21.1
4.	Carbonic anhydrase	8.8	8.9	13.0
5.	Catalase	7.6	6.3	9.7
6.	$\alpha$ -Chymotrypsin	9.4	11.6	7.8
7.	Cytochrome c*	25.7	11.3	25.3
8.	Ovalbumin	10.2	10.1	9.4
9.	Fibrinogen	6.2	7.3	7.8
10.	Gamma globulin (rabbit)	9.4	11.8	8.0
11.	$\beta$ -Galactosidase	9.5	9.9	7.9
12.	Hemoglobin (bovine)*	16.2	8.3	19.9
13.	Histones	9.7	9.2	15.8
14.	Hemocyanin	6.6	5.4	9.2
15.	Lysozyme	10.4	12.6	9.9
16.	Myoglobin*	13.7	7.9	20.7
17.	Ovomucoid	7.8	8.3	5.9
18.	Pepsin	9.8	12.4	4.1
19.	Ribonuclease	11.8	15.9	5.3
20.	Trypsin inhibitor (soy)	9.1	10.3	6.1
21.	Transferrin	8.5	9.0	12.6
22.	Trypsin	11.4	15.5	4.9
23.	Thyroglobulin	7.7	8.2	9.3
Average		10.1	9.5	10.9
*Average		8.8	9.6	9.2

\* The second average eliminates from the figures the values for the three colored proteins shown by asterisks.

6. Is any sample preparation required?

In general, no. However, the protein must be solubilized. (The sample can not be a suspension or an unfiltered homogenate.)

7. Can protein bound to a solid phase be quantitated?

Yes, according to a recent reference in *Analytical Biochemistry*. Consult *Anal. Biochem.* **200**, 195 (1992) for additional information.

8. What is the shelf life of the dye reagent concentrate and the standards?

The Dye Reagent Concentrate is stable for 1 year. For optimum shelf life, store at 4 °C.

Lyophilized preparations of Protein Standard I (bovine gamma globulin) and Protein Standard II (bovine serum albumin), if included, should be refrigerated upon arrival. These lyophilized preparations have a shelf life of 1 year at 4 °C. Rehydrated and stored at 4 °C, the protein solutions should be used within 60 days. Rehydrated and stored in aliquots at -20 °C, the protein solutions should be used within 5 years. Avoid repeated freeze and thaw cycles of the protein standard.

9. Does the binding of the blue dye to cuvettes skew results?

The amount of dye that binds to cuvettes, especially quartz cuvettes, is negligible.<sup>1</sup> Therefore, removal of the residual blue color between each sample reading is unnecessary. However, since the cuvettes may be used for subsequent procedures, there are several recommended treatments for dye removal:

- (a) Rinse cuvette with methanol, or
- (b) Rinse cuvette with concentrated glassware detergent, followed by DDI water, then acetone, or
- (c) Soak cuvette in 0.1 N HCl for a few hours, then wash as in (b).

Bio-Rad's disposable polystyrene cuvettes (catalog number 223-9950) are recommended for the protein assay. They absorb less blue dye than glass cuvettes, and the cuvettes can be used as the mixing vessels for the standard assay if sample and reagent volumes are reduced to 50 µl and 2.50 ml, respectively. This technique eliminates the need for test tubes, and yields twice as many assays per bottle of reagent.

## Section 4

### Troubleshooting Guide

1. How can protein with a typical low dye response be assayed?

Occasionally a protein will be assayed which yields exceptionally low color response to the Bio-Rad Protein Assay. One such protein is gelatin. Although the standard range (20-140  $\mu\text{g}$ ) is not detectable when the standard assay procedure is used, quantitation of the protein is possible when the sample-to-dye ratio is changed. By using the sample-to-dye ratio of the microassay procedure (800  $\mu\text{l}$  sample + 200  $\mu\text{l}$  dye reagent concentrate) a usable standard curve for moderate concentrations of gelatin is produced.

Therefore, for a protein which yields exceptionally low color response to the Bio-Rad Protein Assay, quantitation in the standard range may be possible when the microassay sample-to-dye ratio is used.

Other modifications of this dye binding assay to increase sensitivity have been reported.<sup>7,8</sup>

2. Absorbance of the protein solution is very low. What is the likely cause?

The dye reagent concentrate may be old. If it is over 1 year old, replace with a new bottle of reagent.

The sample may contain a substance which interferes with the reaction, such as detergent or sodium hydroxide. Check the compatibility guide (Table 1). Dilute the sample or switch to the *DC* Protein Assay if necessary.

The molecular weight of the protein is low; the lower limit of detection for this method is approximately 3,000 to 5,000 daltons.

## Section 5 Ordering Information

<b>Catalog Number</b>	<b>Description</b>
500-0001	<b>Bio-Rad Protein Assay Kit I</b> , includes 450 ml dye reagent concentrate and lyophilized bovine gamma globulin standard
500-0002	<b>Bio-Rad Protein Assay Kit II</b> , includes 450 ml dye reagent concentrate and lyophilized bovine serum albumin standard
500-0006	<b>Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate</b> , 450 ml

### **Related Materials**

500-0005	<b>Protein Standard I</b> , bovine gamma globulin, lyophilized. When reconstituted, it provides 20 ml of $1.4 \pm 0.2$ mg/ml solution.
500-0007	<b>Protein Standard II</b> , bovine serum albumin, lyophilized. When reconstituted, it provides 20 ml of $1.4 \pm 0.2$ mg/ml solution.
500-0116	<b>Bio-Rad DC Protein Assay Reagents Package</b> , includes 250 ml Reagent A, 2000 ml Reagent B, and 5 ml Reagent S.
500-0111	<b>Bio-Rad DC Protein Assay Kit I</b> , includes contents of Reagents Package (catalog 500-0116) and lyophilized bovine gamma globulin standard.
500-0112	<b>Bio-Rad DC Protein Assay Kit II</b> , includes contents of Reagents Package (catalog 500-0116) and lyophilized bovine serum albumin standard.
223-9950	<b>Disposable Polystyrene Cuvettes</b> , 100 - 3.5 ml cuvettes
223-9955	<b>Disposable Polystyrene Cuvettes</b> , 100 - 1.5 ml cuvettes
224-0096	<b>Costar 96 Well Flat Bottom EIA Plate</b> , polystyrene microtiter plates, 5 per package, carton of 100



## Section 6 Safety Information

### MATERIAL SAFETY DATA SHEET

#### I. PRODUCT IDENTIFICATION

**TRADE NAME:** Methanol (as used in Protein Assay Kits I and II and Dye Reagent Concentrate)

**Catalog No.:** 500-0001, 500-0002, 500-0006

**Chemical identity, Common names:** Methanol; Methyl alcohol; Carbinol; Wood alcohol; Wood naphtha, Methyl hydroxide.

**Formula:** CH<sub>3</sub>OH

**M.W.:** 32.04

**MANUFACTURER'S NAME:**

**BIO-RAD LABORATORIES  
2000 ALFRED NOBEL DRIVE  
HERCULES, CALIFORNIA 94547**

**EMERGENCY PHONE No:  
510/741-1000**

**DATE PREPARED OR REVISED:** March 24, 1994

**NAME OF PREPARER:** Roy Wood

#### II. HAZARDOUS INGREDIENTS

This product contains the following toxic chemical subject to the reporting requirements of section 313 of the Emergency Planning and Community Right-To-Know Act of 1986 and of 40 CFR 372:

Chemical Names	CAS Numbers	Percent*	Exposure Limits in Air		
			ACGIH TLV (TWA)	OSHA PEL (TWA)	Other
Methanol	67-56-1	25%	200 ppm (TWA)	200 ppm (TWA)	ACGIH TLV 250 ppm (STEL)

LD50:5628 mg/kg oral-rat (RTECS)

TWA = 8-hour Time Weighted Average

STEL = Short Term Exposure Limit (15 minute)

\* The other 75% of the mix is 25% water and 50% phosphoric acid  
[see MSDS #500-0001(b)].

### III. PHYSICAL/CHEMICAL CHARACTERISTICS

**BOILING POINT:** 64.5 °C (148 °F)

**VAPOR PRESSURE:** 97 mm Hg at 20 °C

**EVAPORATION RATE (BUTYL ACETATE = 1):** 5.9

**SOLUBILITY IN WATER:** Complete

**APPEARANCE AND COLOR:** Clear liquid, alcohol odor.

**SPECIFIC GRAVITY(H<sub>2</sub>O = 1):** 0.79

**MELTING POINT:** -98 °C (-144 °F)

**VAPOR DENSITY(AIR = 1):** 1.1

### IV. FIRE AND EXPLOSION HAZARD DATA

**FLASH POINT:** 101 °F (for a 25% solution)

(METHOD USED): Closed Cup

**FLAMMABLE LIMITS:** LEL=6% UEL=36%

**EXTINGUISHING MEDIA:** Alcohol foam, carbon dioxide, dry chemical, or water fog.

**SPECIAL FIRE FIGHTING PROCEDURES:** Fire fighters should wear full protective clothing and self-contained breathing apparatus with full facepiece. Use water to keep fire-exposed containers cool.

**UNUSUAL FIRE AND EXPLOSION HAZARDS:** Vapor is heavier than air and may travel along the ground. Never use a welding or cutting torch near container (even empty). This material may burn with a flame which is invisible in daylight.

### V. HEALTH HAZARD INFORMATION

**SYMPTOMS OF OVEREXPOSURE** (for each potential route of exposure):

**INHALED:** Excessive inhalation can cause nasal and respiratory irritation, visual disturbance, blurred vision, dizziness, giddiness, weakness, fatigue, nausea, vomiting, headache, possible unconsciousness, and asphyxiation.

**CONTACT WITH SKIN OR EYES:** Can cause irritation, tearing, blurred vision, drying of skin, and dermatitis.

**ABSORBED THROUGH SKIN:** May be absorbed through intact skin and produce systemic effects.

**SWALLOWED:** Can cause gastrointestinal irritation, headache, nausea, vomiting, blindness, unconsciousness, and death.

---

### **HEALTH EFFECTS OR RISKS FROM EXPOSURE**

**ACUTE:** Poison! Swallowing or breathing high concentrations of methanol may produce headache, vomiting, nausea, irritation, dizziness, weakness, fatigue, giddiness, blurred vision, unconsciousness, blindness, and death. Methanol is extremely corrosive to the eyes.

Brief eye contact with the liquid or mist will severely damage the eyes and prolonged eye contact can cause permanent eye injury which may be followed by blindness.

Skin contact may irritate the skin, causing dermatitis. Methanol may be absorbed through intact skin, causing systemic effects.

**CHRONIC:** Marked impairment of vision, central nervous system damage, and death have been reported after prolonged or repeated exposure. Methyl alcohol may cause liver damage.

---

### **FIRST AID: EMERGENCY PROCEDURES**

**EYE CONTACT:** Flush with large amounts of water for at least 15 minutes, lifting upper and lower lids occasionally. Get medical attention.

**SKIN CONTACT:** Flush skin with large amounts of water for at least 15 minutes, while removing contaminated clothing and shoes. Wash clothes before reuse. Get medical attention.

**INHALED:** Remove victim to fresh air. If breathing has stopped, give artificial respiration. Keep person warm. Get medical attention.

**SWALLOWED:** If conscious, immediately induce vomiting by giving two glasses of water and sticking a finger down the throat. After vomiting, give milk or water. Never give anything by mouth to an unconscious or convulsing person. Get medical attention immediately.

---

**SUSPECTED CANCER AGENT**

X  NO: THIS PRODUCT'S INGREDIENTS ARE NOT FOUND IN THE LISTS BELOW.

YES: \_\_\_\_\_ FEDERAL OSHA \_\_\_\_\_ NTP \_\_\_\_\_ IARC

**MEDICAL CONDITIONS AGGRAVATED BY EXPOSURE**

Those individuals with diseases of the eyes, liver, kidneys, and skin may be at increased risk from exposure.

**VI. REACTIVITY DATA**

STABLE  X  UNSTABLE \_\_\_\_\_

**CONDITIONS TO AVOID:** Heat, sparks, and open flame.

**INCOMPATIBILITY**(Materials to avoid): Strong oxidizing agents, many metals, certain plastics, chloroform.

**HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS:** Carbon oxides and formaldehyde may form when heated to decomposition.

**HAZARDOUS POLYMERIZATION MAY OCCUR** \_\_\_\_\_ **WILL NOT OCCUR**  X

**CONDITIONS TO AVOID:** Heat, sparks, and open flame.

**VII. SPILL, LEAK, AND DISPOSAL PROCEDURES**

**SPILL RESPONSE PROCEDURES:** Dike and cover spill with non-combustible absorbent. Wear protective clothing including rubber apron, rubber gloves, rubber boots, chemical goggles, and face shield. Wear an appropriate NIOSH-approved respirator. Eliminate all ignition sources.

**PREPARING WASTES FOR DISPOSAL:** Comply with all applicable federal, state, and local regulations on spill reporting, waste handling, and waste disposal.

## VIII. SPECIAL HANDLING INFORMATION

**VENTILATION AND ENGINEERING CONTROLS:** Provide sufficient mechanical explosion-proof ventilation to maintain exposure below exposure limits.

**RESPIRATORY CONTROLS:** Wear a NIOSH-approved respirator appropriate for the vapor concentration at the point of use. Appropriate respirators may be a supplied-air respirator or a self-contained breathing apparatus.

**EYE PROTECTION:** Chemical splash goggles or face shield.

**GLOVES:** Wear resistant gloves such as neoprene.

**OTHER CLOTHING AND EQUIPMENT:** Impervious clothing and boots.

**WORK PRACTICES, HYGIENIC PRACTICES:** Use good laboratory practices. Wash hands after using and before eating. Do not eat, drink, or smoke in the work area. Keep product away from heat, sparks, and flames.

**OTHER HANDLING AND STORAGE REQUIREMENTS:** Store in closed containers. All handling equipment should be electrically grounded. Store in a cool, dry, well-ventilated place away from incompatible materials. Store in a flammable liquid storage area or cabinet. An eye wash and safety shower should be nearby and ready for use.

**PROTECTIVE MEASURES DURING MAINTENANCE OF CONTAMINATED EQUIPMENT:** Protective clothing and appropriate respiratory protection should be worn. Do not cut, grind, weld, or drill on or near containers. Electrically ground all equipment and use only non-sparking tools.

---

We believe that the information contained herein is current as of the date of this Material Safety Data Sheet. Since the use of this information and conditions of use of the product are not within the control of Bio-Rad, it is the user's responsibility to handle the product under conditions of safe use.

## MATERIAL SAFETY DATA SHEET

### I. PRODUCT IDENTIFICATION

**TRADE NAME:** Phosphoric Acid (as used in Protein Assay Kits I & II and the Dye Reagent Concentrate).

**Catalog No.:** 500-0001, 500-0002, 500-0006

**Chemical identity, Common names:** Phosphoric acid, ortho-phosphoric acid, white phosphoric acid.

**Formula:**  $H_3PO_4$

**M.W.:** 98.00

**MANUFACTURER'S NAME:**

**BIO-RAD LABORATORIES**  
**2000 ALFRED NOBEL DRIVE**  
**HERCULES, CALIFORNIA 94547**

**EMERGENCY PHONE No:**  
**510/741-1000**

**DATE PREPARED OR REVISED:** March 31, 1993

**NAME OF PREPARER:** Roy Wood

### II. HAZARDOUS INGREDIENTS

This product contains the following toxic chemical subject to the reporting requirements of section 313 of the Emergency Planning and Community Right-To-Know Act of 1986 and of 40 CFR 372:

Chemical Names	CAS Numbers	Percent*	Exposure Limits in Air		
			ACGIH TLV (TWA)	OSHA PEL (TWA)	Other
Phosphoric acid	7664-38-2	50% (in mix)	1 mg/m <sup>3</sup> (TWA)	1 mg/m <sup>3</sup> (TWA)	ACGIH TLV 3 mg/m <sup>3</sup> (STEL)

TWA=8-hour Time Weighted Average

STEL=Short Term Exposure Limit (15 minute)

\* The other 50% of the mix is 25% water and 25% methanol  
 [see MSDS #500-0001(a)].

### III. PHYSICAL/CHEMICAL CHARACTERISTICS

**BOILING POINT:** 158 °C (316 °F)

**VAPOR PRESSURE:** 0.03 mm Hg at 20 °C

**EVAPORATION RATE (BUTYL ACETATE = 1):** N/A

**SOLUBILITY IN WATER:** Complete

**APPEARANCE AND COLOR:** Clear, colorless, syrupy liquid.  
Odorless.

**SPECIFIC GRAVITY(H<sub>2</sub>O = 1):** 1.69

**MELTING POINT:** 21 °C (70 °F)

**VAPOR DENSITY(AIR = 1):** 3.4

### IV. FIRE AND EXPLOSION HAZARD DATA

**FLASH POINT:** N/A (not flammable)      **FLAMMABLE LIMITS:** N/A

**(METHOD USED):** N/A

**EXTINGUISHING MEDIA:** Water fog or water spray

**SPECIAL FIRE FIGHTING PROCEDURES:** Water may be used to keep fire-exposed containers cool until fire is out. Fire fighters should wear full protective clothing and self-contained breathing apparatus with full facepiece.

**UNUSUAL FIRE AND EXPLOSION HAZARDS:** Phosphoric acid reacts with most metals to release hydrogen gas which can form explosive mixtures with air.

### V. HEALTH HAZARD INFORMATION

**SYMPTOMS OF OVEREXPOSURE** (for each potential route of exposure):

**INHALED:** Irritation to nose, throat, and respiratory tract; coughing, chest pain, and difficulty in breathing.

**CONTACT WITH SKIN OR EYES:** Corrosive; may cause redness, burns, pain, blurred vision, severe irritation, and tissue damage.

**ABSORBED THROUGH SKIN:** Liquid can cause severe irritation and burns to the skin.

**SWALLOWED:** Corrosive; may cause sore throat, abdominal pain, nausea, and severe burns.

---

### **HEALTH EFFECTS OR RISKS FROM EXPOSURE**

**ACUTE:** Phosphoric acid is extremely corrosive to the eyes, skin, nose, mouth, throat, and mucous membranes. Bronchitis, pulmonary edema, and chemical pneumonitis may occur with inhalation of vapors or mists. Breathing high concentrations may result in death. Brief eye contact with the liquid or mists will severely damage the eyes and prolonged contact may cause permanent eye injury which may be followed by blindness. Vapors will severely irritate skin.

Liquid and mists will severely burn the skin. Prolonged liquid contact will burn or destroy surrounding tissue and death may occur if burns extend over large portions of the body. Swallowing the liquid burns the tissues, causes severe abdominal pain, nausea, vomiting, and collapse. Swallowing large quantities can cause death.

**CHRONIC:** Skin contact may result in areas of destruction of skin tissue or primary irritant dermatitis. Similarly, inhalation of vapors or mists may cause damage to tissues and increase susceptibility to respiratory illness.

---

### **FIRST AID: EMERGENCY PROCEDURES**

**EYE CONTACT:** Flush with large amounts of water for at least 15 minutes, lifting upper and lower lids occasionally. Get medical attention.

**SKIN CONTACT:** Flush skin with large amounts of water for at least 15 minutes, while removing contaminated clothing and shoes. Wash clothes before reuse. Get medical attention.

**INHALED:** Remove to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. Get medical attention.

**SWALLOWED:** DO NOT induce vomiting. If conscious, give large quantities of milk or water. Never give anything by mouth to an unconscious or convulsing person. Get medical attention immediately.

---



**SUSPECTED CANCER AGENT**

NO: THIS PRODUCT'S INGREDIENTS ARE NOT FOUND IN THE LISTS BELOW.

YES:  FEDERAL OSHA  NTP  IARC

---

**MEDICAL CONDITIONS AGGRAVATED BY EXPOSURE**

History of respiratory or skin disease may increase risk from exposures.

**VI. REACTIVITY DATA**

STABLE  UNSTABLE

**CONDITIONS TO AVOID:** Contact with metals can form hydrogen gas and be an explosion hazard.

**INCOMPATIBILITY**(Materials to avoid): Strong caustics, metals, cyanides, sulfides, and sulfites. A strong mineral acid, contact with water can cause heat generation and violent splattering.

**HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS:** Toxic fumes of phosphorous oxides.

**HAZARDOUS POLYMERIZATION MAY OCCUR**  **WILL NOT OCCUR**

**CONDITIONS TO AVOID:** N/A

**VII. SPILL, LEAK, AND DISPOSAL PROCEDURES**

**SPILL RESPONSE PROCEDURES:** Dike and cover spill with absorbent. Small spills can be carefully neutralized with sodium bicarbonate of lime. Wear protective clothing including an acid resistant suit, rubber gloves, rubber boots, chemical goggles, and face shield. Wear an appropriate NIOSH-approved respirator.

**PREPARING WASTES FOR DISPOSAL:** Comply with all applicable federal, state, and local regulations on spill reporting, waste handling, and waste disposal.

## VIII. SPECIAL HANDLING INFORMATION

**VENTILATION AND ENGINEERING CONTROLS:** A local exhaust system is recommended to maintain levels below exposure limits.

**RESPIRATORY CONTROLS:** Wear a NIOSH-approved respirator appropriate for the vapor or mist concentration at the point of use. Appropriate respirators may be a full facepiece air-purifying respirator equipped with high efficiency cartridges, a supplied-air respirator, or a self-contained breathing apparatus.

**EYE PROTECTION:** Wear chemical safety goggles and a full face shield, where splashing is possible. Contact lenses should not be worn when working with this material.

**GLOVES:** Wear chemical resistant gloves such as neoprene, nitrile rubber, or natural rubber.

**OTHER CLOTHING AND EQUIPMENT:** Impervious protective clothing and boots.

**WORK PRACTICES, HYGIENIC PRACTICES:** Use good laboratory practices. Wash hands after using and before eating. Do not eat, drink, or smoke in the work area.

**OTHER HANDLING AND STORAGE REQUIREMENTS:** Keep in tightly sealed container. Store in a cool, dry, well-ventilated place away from incompatible materials. Corrosive to mild steel. Store in rubber lined or 316 stainless steel. An eye wash and safety shower should be nearby and ready for use.

**PROTECTIVE MEASURES DURING MAINTENANCE OF CONTAMINATED EQUIPMENT:** Protective clothing and appropriate respiratory protection should be worn. Do not cut, grind, weld, or drill on or near containers.

---

We believe that the information contained herein is current as of the date of this Material Safety Data Sheet. Since the use of this information and conditions of use of the product are not within the control of Bio-Rad, it is the user's responsibility to handle the product under conditions of safe use.

## Section 7

### References

1. Bradford, M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
2. Reisner, A. H., Nemes, P. and Bucholtz, C., *Anal. Biochem.*, **64**, 509 (1975).
3. Fazakes de St. Groth, S. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 377 (1963).
4. Sedmack, J. J. and Grossberg, S. E., *Anal. Biochem.*, **79**, 544 (1977).
5. Compton, S. J. and Jones, C. G., *Anal. Biochem.*, **151**, 369 (1985).
6. Spector, T., *Anal. Biochem.*, **86**, 142 (1978).
7. Duhamel, R. C., Meezan, E. and Brendal, K., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **5**, 67 (1981).
8. Macart, M. and Gerbaut, L., *Clin. Chim. Acta*, **122**, 93 (1982).

\*Coomassie is a trademark of ICI.

**BIO-RAD****Bio-Rad  
Laboratories***Life Science  
Group*

U.S. (800) 4BIORAD • California Ph. (510) 741-1000 • New York  
Ph. (516) 756-2575 • Australia Ph. 02-805-5000 • Austria Ph. (1) 877  
89 01 • Belgium Ph. 09-385 55 11 • Canada Ph. (905) 712-2771 •  
China Ph. (01) 2046622 • Denmark Ph. 45-39 17 99 47 • France  
Ph. (1) 49 60 68 34 • Germany Ph. 089 31884-0 • India Ph. 91-11-461-  
0103 • Italy Ph. 02-21609 1 • Japan Ph. 03-3534-7665 • Hong Kong  
Ph. 7893300 • The Netherlands Ph. 0318-540666 • New Zealand  
Ph. 09-443 3099 • Singapore Ph. (65) 4432529 • Spain Ph. (91) 661 70  
85 • Sweden Ph. 46 (0) 735 83 00 • Switzerland Ph. 01-809 55 55 •  
United Kingdom Ph. 0800 181134

SIG 093094 Printed in USA

LIT33 Rev C