

Determinación de pH por colorimetría en muestras pequeñas de lágrima. Método simple para medición en enfermedades oftalmológicas de la superficie ocular anterior

Determination of pH by colorimetry in small tear samples. Simple method for pH measuring in ophthalmological diseases of the anterior ocular surface

Luis Fernando Barba-Gallardo*, Marín Humberto Muñoz-Ortega**, Guillermo Andrés Díaz-Parra***, Pedro Garzón de la Mora***, Sergio Alberto Ramírez-García****, José Rafael Villafán-Bernal*****✉

Barba-Gallardo, L. F., Muñoz-Ortega, M. H., Díaz-Parra, G. A., Garzón de la Mora, P., Ramírez-García, S. A., & Villafán-Bernal, J. R. (2019). Determinación de pH por colorimetría en muestras pequeñas de lágrima. Método simple para medición en enfermedades oftalmológicas de la superficie ocular anterior. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 27(76), 41-48.

RESUMEN

No existen métodos sencillos en la práctica clínica para cuantificar el pH de lágrima. El objetivo fue estandarizar un método para la determinación del pH en pequeñas muestras de lágrima de pacientes. Se construyó una escala colorimétrica en un rango de pH de 6 a 8.0 utilizando como indicador azul de bromotimol, con KH_2PO_4 0.1M (constante) y volúmenes ascendentes de NaOH

0.1M. El método se validó en 20 uL de lágrima de 73 sujetos, en quienes permitió distinguir cambios en el pH de 0.2 en 0.2 en un rango de 6.0 a 8.0 con un coeficiente de variación intrasujeto de 0.8 a 4.0%. El método aquí presentado, es preciso, con baja variación interensayo. Esto, aunado a su simpleza, bajo costo y poco volumen de muestra necesario, lo convierten en una alternativa para el monitoreo del pH de la lágrima, ya sea en la cama del paciente o el consultorio.

Palabras clave: azul de bromotimol; superficie ocular anterior; lágrima; pH.

Keywords: bromothymol blue; anterior ocular surface; tear; pH.

Recibido: 8 de junio de 2018, aceptado: 21 de noviembre de 2018

* Departamento de Optometría, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, C. P. 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, México. Correo electrónico: barbaluis@yahoo.com. ORCID: orcid.org/0000-0002-1514-8230

** Departamento de Química, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, C. P. 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, México. Correo electrónico: mhmunoz@correo.uaa.mx. ORCID: orcid.org/0000-0002-1961-6919

*** Departamento de Biología Molecular, Universidad de Guadalajara. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, C. P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México. Correo electrónico: guillermo.andres.dp@hotmail.com; pgarzonm@yahoo.com. ORCID: orcid.org/0000-0001-7502-4152; orcid.org/0000-0002-6823-9208

**** Instituto de Investigación sobre la Salud Pública, Universidad de la Sierra Sur, Sistema de Universidades Estatales de Oaxaca (SUNEO). Calle Guillermo Rojas Mijangos s/n, esq. Av. Universidad, Col. Ciudad Universitaria, C. P. 70800, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México. Correo electrónico: sergio7genetica@hotmail.com. ORCID: orcid.org/0000-0002-6343-9278

***** Cátedras CONACYT-Departamento de Cirugía, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, C. P. 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, México. Correo electrónico: joravibe@hotmail.com. ORCID: orcid.org/0000-0002-6135-4270

✉ Autor para correspondencia

ABSTRACT

There are no simple methods in clinical practice to quantify tear pH. Our objective was to standardize a method for the determination of pH in small tear samples of patients. A colorimetric scale was constructed in a pH range of 6 to 8.0 using bromothymol blue as indicator, with 0.1M KH_2PO_4 (constant) and ascending volumes of 0.1M NaOH. The method was validated in 20 uL of tear of 73 subjects, in whom it was possible to distinguish changes in the pH from 0.2 in 0.2 in a range of 6.0 to 8.0 with a coefficient of intrasubject variation of 0.8 to 4.0%. The method presented here is precise, with low inter-assay variation. This, combined with its simplicity, low cost and small sample volume, make it an alternative for monitoring the pH of the tear either, in the patient's bed or in primary care.

INTRODUCCIÓN

El pH de la lágrima normal se considera de 7.45, con un rango entre 7.14 y 7.82 (Carney & Hill, 1976; Holly & Lemp, 1977). El mantenimiento del pH de la

lágrima dentro del rango fisiológico por el sistema de amortiguación contribuye a mantener la homeostasis del segmento o superficie ocular anterior del ojo (Carney, Mauger, & Hill, 1989). En pacientes con uso extendido de lentes de contacto, el pH tiende a disminuir, lo que tiene implicaciones en el desarrollo de patologías e infecciones (Carney, Mauger, & Hill, 1990). Otras situaciones en las que cambia el pH lagrimal es en el post-operatorio de cirugía de catarata (Thygesen & Jensen, 1987), y con el uso de lubricantes oculares como la hipromelosa, cuyo pH es alcalino (8.34) (Rahman, Chuah, Macdonald, Trusler, & Ramaesh, 2012).

Los cambios anormales del pH de la lágrima pueden afectar el grado de ionización de fármacos tópicos (Iwata, 1973; Longwell, Birss, Keller, & Moore, 1976), alterar la barrera epitelial y los mecanismos anti-adherencia contra patógenos, lo que aumenta el riesgo de infecciones (Bergmanson, Söderberg, & Estrada, 1987; Fleiszig, Zaidi, Ramphal, & Pier, 1994), asimismo, podrían favorecer cambios conformacionales en proteínas (Rahman et al., 2012), alterar las propiedades de la película lagrimal (Murube, Paterson, & Murube, 1996), y contribuir a la aparición de patologías oculares como úlceras corneales, penfigoide, distrofia endotelial, conjuntivitis alérgica, estenosis de la vía lagrimal y queratitis, entre otras enfermedades del campo de trabajo del cirujano oftalmólogo y optometrista (Sullivan, Dartt, & Meneray, 1996).

Por tanto, en la práctica clínica de la oftalmología y optometría se requiere un método simple y rápido para la medición de pH a partir de volúmenes pequeños de lágrima. En especial porque en condiciones basales la lágrima puede obtenerse en poco volumen y no debe estimularse el lagrimeo reflejo para poder conocer el pH real de la lágrima. Un método óptimo para la determinación del pH en lágrima es el colorimétrico, que se basa en cambios de coloración de un indicador de pH, en este caso azul de bromotimol, al mezclarse con una muestra de lágrima.

El azul de bromotimol es un colorante con propiedades de ácido o base débil, cuya forma disociada tiene diferente color a la forma sin disociar, ello se debe a que está formado por sistemas resonantes aromáticos, que pueden modificar la distribución de carga según la forma que adopten. Esta alteración por el desplazamiento hacia una

forma más o menos disociada hace que la absorción energética del sistema se modifique y con ello el color cambie su intensidad de acuerdo con los cambios del pH (Izquierdo-Sañudo, Peral-Fernández, Plaza-Pérez, & Trotino-Núñez, 2003).

El presente trabajo tiene como finalidad estandarizar un método colorimétrico para la determinación del pH en pequeñas muestras de lágrima de pacientes utilizando azul de bromotimol.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Instrumentación

Se utilizó un espectrofotómetro marca Clima Plus (RAL-Barcelona, Spain) para la lectura de absorbancias de las soluciones, tanto de las curvas de calibración como de las muestras de lágrima. También se utilizó el potenciómetro portátil modelo HI 8915 MV/°C (Hanna, Madrid, España) como herramienta para medir el pH de las soluciones de la curva colorimétrica.

b) Reactivos

Se utilizaron los siguientes materiales y reactivos: fosfato monobásico de potasio 0.1M (KH_2PO_4 ; 3246-01, JT Baker, Center Valley, PA, EE. UU.), hidróxido de sodio 0.1M (NaOH, 6697-01, JT Baker, Center Valley, PA, EE. UU.), azul de bromotimol (114413, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), etanol absoluto (8025.1000, JT Baker, EE. UU., Center Valley, PA, EE. UU.) y agua destilada desionizada (AG4029-4220-20, JT Baker, Center Valley, PA, EE. UU.). Se preparó una solución 0.1% de azul de bromotimol más etanol (relación 1:10) con 0.1 gr de azul de bromotimol más 1 mL de etanol absoluto.

c) Preparación de la escala colorimétrica en un rango de pH de 6-8

Para la construcción de la escala colorimétrica en un rango de pH de 6 a 8.0 primero se seleccionó un indicador (azul de bromotimol) con actividad iónica en este rango de pH, sensible a cambios de 0.2 en 0.2 (tabla 1). Para ello se prepararon 11 tubos con un rango de pH conocido (6.0 – 8.0), utilizando un volumen constante de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0.1M (pH= 5.4 a 25 °C) mezclado con volúmenes ascendentes de hidróxido de sodio 0.1M y ajustándose a 5 ml con agua destilada (tabla 2). El cambio del pH con la adición de cantidades ascendentes de NaOH y su ajuste al valor deseado fue verificado por el potenciómetro. Posteriormente

se adicionaron 100 uL de azul de bromotimol a cada tubo y tras una agitación en el vórtex 30 segundos se logró que la mezcla adquiriera un color desde amarillo (a pH 6.0) hasta azul (a pH 8.0; figura 1A),

en donde permaneció el color estable por al menos 2 h a temperatura ambiente. Una vez obtenida la escala colorimétrica se valoró la absorbancia del vire de color utilizando un espectrofotómetro UV visible (tabla 3).

Tabla 1
Indicadores, colores y rango de útil pH (Izquierdo-Sañudo, Peral-Fernández, Plaza-Pérez, & Trotino-Núñez, 2003)

Nombre común	pK	Color	pH mínimo	Color	pH máximo
Azul de timol	1.7	Rojo	1.2	Amarillo	2.8
Anaranjado de metilo	3.5	Rojo	3.1	Amarillo	4.4
Verde de bromocresol	4.7	Amarillo	3.8	Azul	5.5
Azul de bromofenol	4.0	Amarillo	3.0	Azul	4.6
Rojo de metilo	5.1	Rojo	4.2	Amarillo	6.3
Rojo de clorofenol	6.0	Amarillo	5.1	Rojo	6.7
Púrpura de bromocresol	6.2	Amarillo	5.4	Púrpura	7.0
Azul de bromotimol	7.0	Amarillo	6.0	Azul	8.0
Rojo de fenol	7.9	Amarillo	6.8	Rojo	8.4
Rojo de cresol	8.3	Amarillo	7.2	Rojo	8.8
Azul de timol	8.9	Amarillo	8.0	Azul	9.6
Fenolftaleína	9.7	Incoloro	8.3	Rojo	10.0
Timolftaleína	9.9	Amarillo	9.3	Azul	10.5
Rojo neutro	6.85	Amarillo	6.8	Naranja	8.0

Nota: Elaboración propia.

Tabla 2
Preparación de soluciones para la escala colorimétrica

No. de tubo	pH a preparar	KH ₂ PO ₄ 0.1 M	NaOH 0.1 M	H ₂ O destilada
1	6.0	5 ml	0.6 ml	4.4 ml
2	6.2	5 ml	0.8 ml	4.2 ml
3	6.4	5 ml	1.2 ml	3.8 ml
4	6.6	5 ml	1.7 ml	3.3 ml
5	6.8	5 ml	2.3 ml	2.7 ml
6	7.0	5 ml	2.9 ml	2.1 ml
7	7.2	5 ml	3.4 ml	1.6 ml
8	7.4	5 ml	3.9 ml	1.1 ml
9	7.6	5 ml	4.2 ml	0.8 ml
10	7.8	5 ml	4.5 ml	0.5 ml
11	8.0	5 ml	4.6 ml	0.4 ml
		Adicionar en 1° lugar	Adicionar en 2° lugar	Adicionar en 3° lugar

Nota: Elaboración propia.

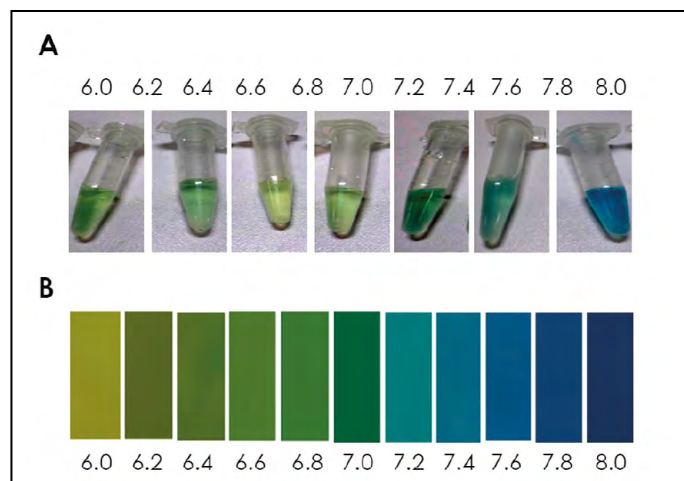


Figura 1. A) Adquisición de colores según el nivel de pH en la mezcla. B) Escala de colores de referencia en el rango de pH 6.0-8.0. Elaboración propia.

Tabla 3
 Absorbancia a 445 nm según la escala de pH

pH	Absorbancia a 445 nm
6.0	0.106
6.2	0.127
6.4	0.144
6.6	0.184
6.8	0.242
7.0	0.339
7.2	0.398
7.4	0.407
7.6	0.55
7.8	0.654
8.0	0.770

Nota: Elaboración propia.

d) Extracción de la muestra de lágrima

Las muestras de lágrimas se recolectaron durante un periodo de 3 h (entre las 8:00 y 11:00 a. m.) del menisco lagrimal inferior sin tocar el ojo ni los párpados con una pipeta manual con bulbo (BRAND®, número de catálogo BR747775; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). En total se obtuvo una muestra de 20 µl por vez. Inmediatamente después de la recolección las muestras se colocaron en el tubo correspondiente para la cuantificación del pH.

Todos los sujetos incluidos eran individuos sanos, con peso normal, menores de 30 años porque en este grupo de edad son comunes alteraciones

Tabla 4
 Características generales de los sujetos de estudio

Características de los sujetos	Total (n= 50)
Edad (años)	20.5 ± 0.5 (18.8 -22.2)
% femeninos/masculinos	50/50
IMC	22.78 ± 1.2 (18.1-24.2)
Peso (kg)	69.25 ± 8.9 (54.9-94.7)
Talla (m)	1.78 ± 0.9 (1.59-1.82)

Nota: Los valores se presentan como media, ± DE, rango o porcentaje cuando así se indica. Elaboración propia.

que cursan con cambios en pH como es el uso de lentes de contacto. Fueron excluidos pacientes que padecían enfermedades sistémicas como diabetes mellitus, hipertensión, falla renal crónica o neoplasias. También aquellos con diagnóstico previo de enfermedades oculares tipo infecciosas, inflamatorias, alérgicas, congénitas ni glaucoma, o patologías corneales o que a la exploración física tuvieron signos de enfermedades del ojo. Las características demográficas y antropométricas de los participantes se presentan en la tabla 4.

El tamaño de muestra se calculó con el software MedCalc (MedCalc, Ostende, Bélgica) de acuerdo con las recomendaciones de Machin y Campbell para estudios de coeficiente de variación para mediciones por duplicado; con intervalo de confianza de 95%, coeficiente de variación máximo esperado de 6% con ancho de intervalo de confianza de 4%, dando una *n* mínima de 21. Sin embargo, se incluyeron más pacientes a petición de los revisores (Machin, Campbell, Tan, & Tan, 2009).

e) Consideraciones éticas

El presente estudio se realizó de acuerdo a las recomendaciones para investigación médica en seres humanos establecidas en la declaración de Helsinki y al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Seres Humanos de los Estados Unidos Mexicanos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

RESULTADOS

A partir de las lecturas de absorbancia del espectrofotómetro de cada uno de los 11 tubos con cantidades de fosfato de sodio monobásico e

hidróxido de sodio, se construyó una curva que al compararse con el pH de soluciones conocidas se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.94 (figura 2). Por tanto, se construyó una regleta de colores de referencia (figura 1B) y, con base en el color adquirido en la mezcla lágrima-solución indicadora, se obtuvo el valor de pH de cada paciente.

Para evaluar el desempeño del método en lágrima de humano se determinó el pH en lágrima de 50 sujetos sanos por triplicado, colocando 20 µl de lágrima en la mezcla de KH₂PO₄ 0.1 M, NaOH 0.1 M y agua destilada (tabla 5). El coeficiente de variación (% CV) osciló de 0.8 a 4.4, con un promedio de 2.5%. Se pueden observar los valores de pH por triplicado, la media de las tres mediciones, la desviación estándar de las tres medidas y el porcentaje de variación de las tres lecturas, donde se puede demostrar que la variación tuvo como mayor valor 4.4% y como menor

valor 0.8%, con lo que se obtuvo el coeficiente de variación intrasujeto.

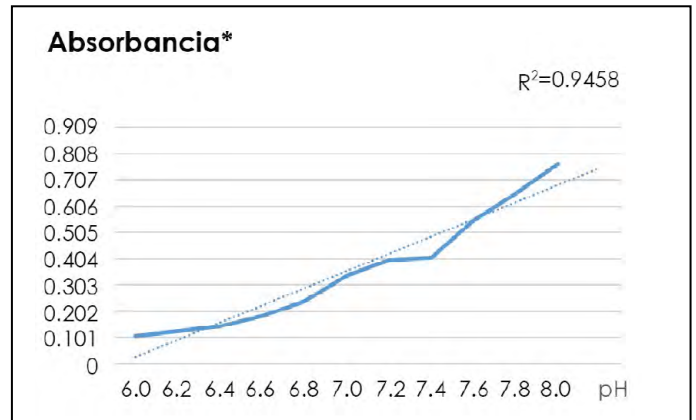


Figura 2. Curva de absorbancia según la escala de pH (* a 445 nm). Elaboración propia.

Tabla 5
 Lecturas de pH de lágrima por triplicado de 21 pacientes sanos, con su media, DS y %CV intrasujeto

	pH 1	pH2	pH3	Media de tres lecturas	DE de tres lecturas	% CV intrasujeto
1	7.3	7.5	7	7.3	0.3	3.5
2	7.4	7.6	7.3	7.4	0.2	2.1
3	7.5	7.8	7.2	7.5	0.3	4
4	7.2	7.7	7.2	7.4	0.3	3.9
5	7.5	7.4	7.4	7.4	0.1	0.8
6	7.6	7.4	7.3	7.4	0.2	2.1
7	7.1	7.3	7.4	7.3	0.2	2.1
8	7.5	7.5	7.3	7.4	0.1	1.6
9	7.4	7.3	7.2	7.3	0.1	1.4
10	7.3	7.2	7.2	7.2	0.1	0.8
11	7.5	7.5	7.2	7.4	0.2	2.3
12	7.4	7.6	7.4	7.5	0.1	1.5
13	7.2	7.4	7.3	7.3	0.1	1.4
14	7.4	7.5	7.4	7.4	0.1	0.8
15	7.5	7.4	7.3	7.4	0.1	1.4
16	7.6	7.3	7.3	7.4	0.2	2.3
17	7.1	7.4	7.2	7.2	0.2	2.1
18	7.2	7.4	7.1	7.2	0.2	2.1
19	7.5	7.3	7.3	7.4	0.1	1.6
20	7.6	7.2	7.4	7.4	0.2	2.7
21	7.5	7.5	7.4	7.5	0.1	0.8

Continuación de la tabla 5

22	7.8	7.5	7.2	7.5	0.3	4
23	7.4	7.4	7.6	7.5	0.1	1.5
24	7.3	7.6	7.4	7.4	0.2	2.1
25	7.1	7.3	7.4	7.3	0.2	2.1
26	7.2	7.4	7	7.2	0.2	2.8
27	7.3	7.2	7.1	7.2	0.1	1.4
28	7.4	7.6	7.8	7.6	0.2	2.6
29	7	7	7.2	7.1	0.1	1.6
30	7.4	7.4	7.2	7.3	0.1	1.6
31	7.6	7.3	7.5	7.5	0.2	2
32	7.8	7.4	7.6	7.6	0.2	2.6
33	7.8	7.4	7.6	7.6	0.2	2.6
34	7.4	7	7.2	7.2	0.2	2.8
35	7	7.2	6.8	7	0.2	2.9
36	7.4	6.8	7.2	7.1	0.3	4.3
37	7	6.6	6.8	6.8	0.2	2.9
38	7.2	6.8	6.6	6.9	0.3	4.4
39	7.6	7.8	8	7.8	0.2	2.6
40	7.4	7.2	6.8	7.1	0.3	4.3
41	7	6.8	7.4	7.1	0.3	4.3
42	6.8	7	7.2	7	0.2	2.9
43	7	7.6	7.4	7.3	0.3	4.2
44	6.8	6.6	7	6.8	0.2	2.9
45	7.2	7	6.6	6.9	0.3	4.4
46	7.4	7	7.2	7.2	0.2	2.8
47	7	7.2	7.4	7.2	0.2	2.8
48	7.6	7.8	7.4	7.6	0.2	2.6
49	7.6	7.4	7.2	7.4	0.2	2.7
50	7	7.6	7.2	7.3	0.3	4.2
Promedio	7.3	7.3	7.3	7.3	0.2	2.5

Nota: DE= Desviación estándar, % CV= Coeficiente de variación.
 Elaboración propia.

DISCUSIÓN

Este estudio aporta un método simple no invasivo para cuantificar pH de lágrima en humanos, que podría ayudar a detectar cambios en pacientes con patologías oftalmológicas de la superficie ocular anterior. El método descrito es altamente preciso con desviaciones estándar bajas y coeficientes de variación intraensayo inferiores a 3%, lo que, aunado a su simpleza y bajo costo, lo convierten en una alternativa para el biomonitorio en el hospital o en el consultorio. Las patologías que cursan con

desviaciones del pH de la lágrima son la presencia de infecciones, rosácea, alergia, ojo seco.

Las desviaciones anormales de pH, además de predisponer a estas patologías, podrían afectar la respuesta terapéutica a antibióticos y la intolerancia a lentes de contacto. Por tanto, el monitoreo del pH en la práctica clínica podría ser de gran utilidad (Coles & Jaros, 1984; Pinna, Usai, Sechi, Carta, & Zanetti, 2011; Yetisen, Jiang, Tamayol, Ruiz-Esparza, & Zhang, 2017). Además, en usuarios nuevos o crónicos de lente de contacto, conocer y modular el pH de

la lágrima podría favorecer una adaptación más suave al lente, dado que la aceptación de este es más confortable en aquellos casos en que el pH es más alcalino (cercano a 8.0) (Motolko & Breslin, 1981).

Pocos métodos se han desarrollado para evaluar el pH en la lágrima, entre los que se encuentran el uso de un microelectrodo de cristal colocado en el fórnix lateral inferior, que después de 5 a 10 s de periodo de estabilización hace la lectura del pH; misma que se realiza por triplicado y se obtiene una media (Coles & Jaros, 1984). Sin embargo, este método es considerado invasivo pues se introduce en el saco conjuntival inferior y es probablemente afectado por las capas totales de la película lagrimal y por el metabolismo de las células epiteliales (Coles & Jaros, 1984). Además, existe riesgo de tocar la conjuntiva con el microelectrodo y en consecuencia estimular el parpadeo reflejo e inducir la liberación de una mayor cantidad de lágrima refleja, afectándose así la obtención de lágrima basal (Abelson, Sadun, Udell, & Weston, 1980). A diferencia de lo que ocurre con el microelectrodo, con el método aquí reportado no se estimula la respuesta refleja porque se toma lágrima basal y aún más, por su sencillez y bajo costo, tiene el potencial de transferir a un método colorimétrico de aplicación a la práctica clínica diaria.

Carney et al. (1989) reportaron un método mediante una cámara cerrada con microelectrodos y temperatura estabilizada (36 °C) para la medición de pH de lágrima con alta precisión y exactitud, al comparar las lecturas con las de seis buffers estándar de pH conocido (Carney et al., 1989). Sin embargo, el uso de microelectrodos para la medición de pH no se ha transferido a un dispositivo comercializable y por ello no se utiliza en la práctica clínica diaria.

En otro estudio Avetisov, Safonova, Novikov, Pateiuk y Griboedova (2014) diseñaron tiras reactivas

con papel tornasol que tras la colocación de la lágrima cambiaban de color, después de lo cual mediante un programa computacional determinaban el pH analizando los colores adquiridos por la tira, esto debido a que el papel tornasol adquiere tonalidades (según el pH) difíciles de diferenciar a simple vista, que hacen indispensable el uso de dicho programa (Avetisov et al., 2014). Con el método reportado en el presente trabajo, por realizarse con soluciones, se obtienen colores más nítidos y homogéneos en el tubo Eppendorf o de ensaye, que son más fáciles de interpretar al compararlos con la escala de colores de referencia.

El método aquí reportado deberá aplicarse en estudios ulteriores de réplica en muestras de lágrima de pacientes con enfermedades que afecten la superficie ocular anterior del globo ocular, para obtener valores de referencia y de predicción de alteraciones del ojo. Asimismo, sería importante transferir este principio a una prueba disponible para el consultorio del optometrista y el oftalmólogo.

CONCLUSIONES

Se estableció un método colorimétrico simple no invasivo para estimación del pH, basado en cambios de coloración al mezclar una muestra de lágrima con una solución que contiene azul de bromotimol, lo cual permitirá estudios ulteriores de réplica en muestras de lágrima de pacientes con enfermedades que afecten la superficie ocular anterior del ojo para estimar su impacto como biomarcador clínico.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer por el financiamiento a los Departamentos de Cirugía y Optometría del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

REFERENCIAS

- Abelson, M. B., Sadun, A. A., Udell, I. J., & Weston, J. H. (1980). Alkaline tear pH in ocular rosácea. *American Journal of Ophthalmology*, 90(6), 866-869. doi: 10.1016/S0002-9394(14)75203-1
- Avetisov, S. E., Safonova, T. N., Novikov, I. A., Pateiuk, L. S., & Griboedova, I. G. (2014). [Ocular surface acidity and buffering system (by studying the conjunctival sac)]. *Vestnik Oftalmologii*, 130(5), 5-10.
- Bergmanson, J. P. G., Söderberg, P. G., & Estrada, P. (1987). Comparison between the measure and desirable quality of hydrogel extended wear contact lenses. *Acta Ophthalmologica*, 65(4), 417-423. doi: 10.1111/j.1755-3768.1987.tb07017.x.
- Carney, L. G., & Hill, R. M. (1976). Human tear pH: diurnal variations. *Arch Ophthalmol*, 94(5), 821-824. doi:10.1001/archophth.1976.03910030405011
- Carney, L. G., Mauger, T. F., & Hill, R. M. (1989). Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 30(4), 747-754.
- _____ (1990). Tear buffering in contact lens wearers. *Acta Ophthalmologica (Copenhagen)*, 68(1), 75-79. doi: 10.1111/j.1755-3768.1990.tb01653.x
- Coles, W. H., & Jaros, P. A. (1984). Dynamics of ocular surface pH. *British Journal of Ophthalmology*, 68(8), 549-552. doi: 10.1136/bjo.68.8.549
- Fleiszig, S. M., Zaidi, T. S., Ramphal, R., & Pier, G. B. (1994). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* adherence to the corneal surface by mucus. *Infection and Immunity*, 62(5), 1799-1804.
- Holly, F. J., & Lemp, M. A. (1977). Tear physiology and dry eyes. *Survey of Ophthalmology*, 22(2), 69-87. doi: 10.1016/0039-6257(77)90087-X
- Iwata, S. (1973). Chemical composition of the aqueous phase. En F. J. Holly, & M. A. Lemp (Eds.), *The Preocular Tear Film and Dry Eye Syndromes* (pp. 29-46). Boston, US: Little, Brown and Company.
- Izquierdo-Sañudo, M. C., Peral-Fernández, F., Plaza-Pérez, A., & Trotino-Núñez, M. D. (2003). *Evolución histórica de los principios de la Química* (pp. 353-371). Madrid: Ediciones UNED.
- Longwell, A., Birss, S., Keller N. & Moore, D. (1976). Effect of topically applied pilocarpine on tear film pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(11), 1654-1657. doi: 10.1002/jps.2600651123
- Machin, D., Campbell, M. J., Tan, S. B., & Tan, S. H. (2009). *Sample size tables for clinical studies*. UK: John Wiley & Sons.
- Motolko, M., & Breslin, C. W. (1981). The effect of pH and osmolarity on the ability of tolerate artificial tears. *American Journal of Ophthalmology*, 91(6), 781-784. doi: 10.1016/0002-9394(81)90012-X
- Murube, J., Paterson, A., & Murube, E. (1996). Classification of artificial tears. En D. A. Sullivan, D. A. Dartt, & M. A. Meneray (Eds.), *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 2* (pp. 693-704). Springer Science.
- Pinna, A., Usai, D., Sechi, L. A., Carta, A., & Zanetti, S. (2011). Detection of virulence factors in *Serratia* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Acta Ophthalmology*, 89(4), 382-387. doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01689.x
- Rahman, M. Q., Chuah, K. S., Macdonald, E. C., Trusler, J. P. M., & Ramaesh, K. (2012). The effect of pH, dilution, and temperature on the viscosity of ocular lubricants-shift in rheological parameters and potential clinical significance. *Eye (London)*, 26(12), 1579-1584. doi:10.1038/eye.2012.211
- Sullivan, A., Dartt, D. A., & Meneray, M. A. (Eds.). (1996). *Lacrimal gland, tear film, and dry eye syndromes 2*. Springer Science.
- Thygesen, J. E. M., & Jensen, O. L. (1987). pH changes of the tear fluid in the conjunctival sac during postoperative inflammation of the human eye. *Acta Ophthalmologica*, 65(2), 134-136. doi: 10.1111/j.1755-3768.1987.tb06990.x
- Yetisen, A. K., Jiang, N., Tamayol, A., Ruiz-Esparza, G. U., & Zhang, Y. (2017). Paper-based microfluidic system for tear electrolyte analysis. *Lab on a Chip*, 17(6), 1137-1148. doi: 10.1039/C6LC01450J