



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
INSTITUTO DE FÍSICA**

**DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES  
REOLÓGICAS INTERFACIALES DE LÍPIDOS  
MEIBOMIALES.**

***TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS INTERDISCIPLINARIAS***

***PRESENTA:***

**SILVIA DEL CARMEN JONGUITUD FLORES**

***ASESORES:***

**DR. BERNARDO YÁÑEZ SOTO, DR. RODRIGO  
VÉLEZ CORDERO**

**SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., AGOSTO 2019**

## Resumen

Un componente esencial para la visión es la superficie del ojo, esta comprende los constituyentes celulares que cubren las áreas expuestas del ojo, el margen del párpado y la película lagrimal. La película lagrimal se trata de un sistema coloidal extremadamente variado, que está compuesta por una capa mucosa, una capa acuosa y una película de lípidos. La capa lipídica está constituida principalmente por lípidos de la glándula de Meibomio y juega un rol vital en el mantenimiento de la homeostasis de la superficie ocular. Entre sus funciones esta brindar estabilidad a la película lagrimal, retrasar la evaporación, fungir como barrera contra partículas foráneas además de tener actividad antimicrobiana. Estas funciones requieren la formación de una capa lipídica estable y continua para tolerar un rango de diferentes deformaciones. Su inestabilidad y ruptura puede causar irritación o inflamación en la superficie ocular y síntomas de ojo seco. En este trabajo se determinaron in vitro propiedades de la capa lipídica de la película lagrimal, de lípidos extraídos de personas sanas y personas con deficiencias de las glándulas de meibomio, en una interface aire-agua usando el método de la gota pendiente y la palagana de Langmuir con una placa de Wilhelmy. Las isothermas de presión superficial/área muestran que los lípidos resultaron bastante compresibles y no colapsaron a altas presiones superficiales, en los ciclos de expansión mostraron histéresis, y durante ciclos sucesivos de compresión-expansión las curvas siguieron comportamientos similares en las repeticiones. Los experimentos de reología interfacial dilatacional indican que el modulo elástico ( $E'$ ) fue más dominante que el modulo viscoso ( $E''$ ) en un rango de frecuencias de 1.26 a los 21 rad/s. los módulos de casos y controles se distribuyen en una área de presiones superficiales de entre  $\sim 70$  mN/m y 200 mN/m para el modulo  $E'$ , y entre  $\sim 20$  mN/m y  $\sim 50$  mN/m para el modulo  $E''$ , aunque 3 de los casos (caso 2,5 y 10) se encontraron fuera de estas regiones. Entender las diferencias en las propiedades en la interface aire-lipidio entre personas sanas y personas con síndrome del ojo seco podrían ser herramientas útiles para diagnóstico, así como para el desarrollo de posibles tratamientos.

## **Abstract**

An essential component for vision is the eye surface, which is constituted by cells that cover up the expose area of the eye, lid margin, and the tear film. The tear film is a complex colloidal system, formed by a mucin-gel layer, an aqueous layer and a lipid film on the outermost surface. This lipid film is mostly produced by meibomian gland, and has a crucial role maintaining ocular surface homeostasis. Among its many functions are that it provides stability to the tear film and retards its evaporation. It also works as a barrier against foreign particles and has antimicrobial activity as well. These functions require the formation of a stable, continuous lipid layer to tolerate a range of different stresses due to blinking. In this work we measured surface properties of meibomian gland lipid films from both healthy people and patients suffering meibomian gland diseases.using pendant drop method and a Langmuir trough with a Wilhelmy plate. Surface pressure/área isotherms show that, lipids proved to be very compressible and non-collapsible at high surface pressures, under expansion cycles they show hysteresis, and during compression-expansion cycles curves follow similar paths among several repetitions. Surface dilatational rheology measurements indicate that in a frequency range of 1.26 to 21 rads/s most of the elastic modulus ( $E'$ ) of controls and cases were more dominant than the viscous modulus ( $E''$ ). Almost all of cases and controls are distributed in an area between  $\sim 70$  mN/m and  $\sim 200$  mN/m for moduli  $E'$ , and between  $\sim 20$  mN/m and  $\sim 50$  mN/m for moduli  $E''$ . There are 3 cases out of this areas. Understanding the differences on surface properties at the water-air interface of healthy people and persons who suffer a meibomian gland disease could be useful tools for diagnosis, as well as for the development of posible treatments.

# Índice

Índice.....	1
Índice de figuras .....	1
Índice de tablas.....	2
1 Introducción.....	3
1.1 Interfaces y fenómenos interfaciales .....	3
1.1.2 Adsorción de solutos en la interface en condiciones de equilibrio .....	5
1.1.3 Adsorción de solutos en la interface bajo una perturbación de su estado de equilibrio .....	10
1.1.4 Reología interfacial .....	11
1.2 Los lípidos meibomiales .....	18
1.2.1 Estudios de la capa lipídica.....	21
2 Planteamiento del problema .....	30
3 Objetivos.....	31
3.1 Objetivo general .....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 Materiales y métodos.....	32
4.1 Obtención de lípidos meibomiales .....	32
4.2 Método de la gota pendiente .....	34
4.2.1 Reología interfacial dilatacional.....	35
4.2.2 Isotermas de presión superficial/área.....	35
4.3 Preparación de las puntas desechables .....	35
4.4 Isotermas de presión superficial/área con palangana de Langmuir .....	36
4.5 Modelos teóricos .....	36
4.5.1 Isoterma de Frumkin .....	36
4.5.2 Modelo de Lucassen-Tempel.....	36
5 Resultados.....	38
5.1 Isotermas $\pi/A$ .....	38
5.2 Propiedades reológicas dilatacionales interfaciales de los lípidos meibomiales .....	40
6 Discusión .....	42
6.1 Isotermas de presión superficial/Área.....	42
6.2 Reología interfacial .....	44
7 Conclusiones y perspectivas.....	46
8 Bibliografía.....	48

## Índice de figuras

Figura 1.Eschema de la estructura molecular de una interface liquido-gas.....	4
Figura 2.Eschema del sistema agua, aceite, y soluto activo en la interface.....	6
Figura 3. Eschema de una palangana de Langmuir con placa de Wilhelmy para medir la presión superficial.....	10

Figura 4. Esquemas de diferentes sistemas para mediciones interfaciales.....	13
Figura 5. Representación esquemática del viscosímetro de la aguja magnética en la superficie. ....	14
Figura 6. Esquema del sistema para realizar experimentos de gota pendiente oscilante <sup>4</sup> . .....	15
Figura 7. Esquema de la superficie ocular.. ....	19
Figura 8. Modelo de la capa lipídica de la película lagrimal.....	20
Figura 9. Ciclos de compresión y expansión de lípidos meibomiales humanos.....	22
Figura 10. Imágenes representativas de las películas de lípidos meibomiales de personas sanas (nMGS) y pacientes con disfunción de las glándulas de meibomio (dMGS) a las temperaturas y rangos de presión superficial $\pi$ denotados.....	24
Figura 11. Isoterma de $\pi/A$ de lípidos meibomiales de bovino sobre solución salina a 36 °C. ....	25
Figura 12. Propiedades viscoelásticas de lípidos meibomiales humanos a diferentes presiones superficiales y en un barrido de frecuencias.. ....	27
Figura 13. Lípidos meibomiales humanos sometidos a un barrido de frecuencias, a 20 y 37 °C. ....	28
Figura 14. Dependencia con la frecuencia de las partes real y compleja del módulo complejo dilatacional para lípidos meibomiales para personas sanas y enfermas. ....	29
Figura 15. Extracción de lípidos meibomiales de humano <sup>53</sup> . ....	34
Figura 16. Esquema del montaje experimental para el método de la gota pendiente.....	35
Figura 17. Isotermas $\pi/A$ de los lípidos meibomiales.....	38
Figura 18. Isotermas de adsorción.....	39
Figura 19. Propiedades reológicas de lípidos meibomiales de personas sanas y personas con disfunciones de las glándulas de meibomio.. ....	40
Figura 20. Datos del módulo elástico $E'$ y módulo viscoso $E''$ ajustados al modelo de Lucassen-Tempel. ....	41

## Índice de tablas

Tabla 1. Características de los materiales elásticos y viscosos.....	13
Tabla 2. Resultados de los estudios clínicos de las personas sanas (controles).....	33
Tabla 3. Resultados de los estudios clínicos de los pacientes con ojo seco (casos).....	33

# 1 Introducción

En este capítulo se introducirán los conceptos y el formalismo necesarios para esta tesis. Primero, se definirán lo que son las interfaces y los fenómenos que ocurren en estas, como la tensión superficial, la adsorción de moléculas a la interface y las propiedades reológicas, además se presentaran algunos de los métodos experimentales existentes para estudiarlas. En la segunda parte de este capítulo, se describirá nuestro sistema de interés, la capa lipídica de la película lagrimal, y se presentara un compendio de los trabajos que hasta el momento han sido realizados con el fin de estudiarla. Lo discutido en este capítulo servirá como base para el análisis de nuestras observaciones experimentales presentadas más adelante.

## 1.1 Interfaces y fenómenos interfaciales

Una interface es el área que separa dos fases, las cuales pueden consistir de diferentes tipos de moléculas o estados diferentes del mismo tipo de molécula<sup>1,2</sup>. El conocimiento de los fenómenos que ocurren en las interfaces es esencial, ya que las propiedades de los materiales cerca de estas regiones difieren de aquellas en el bulto de la sustancia<sup>3</sup>. En biología, la mayoría de las reacciones e interacciones ocurren en interfaces, siendo la membrana celular el caso más evidente, entre otros ejemplos se incluyen las propiedades de transporte del surfactante pulmonar presente en los alveolos, y en los ojos, la regeneración de la película lagrimal después de parpadear<sup>4</sup>.

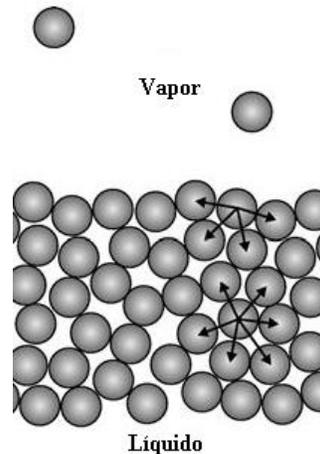
### Tensión superficial

Usualmente se asume que las interfaces tienen un espesor infinitesimal<sup>2</sup>. Esta suposición es conveniente para varios propósitos, pero ignora la naturaleza dinámica de la región interfacial, así como la estructura y organización de los distintos tipos de moléculas involucradas<sup>2</sup>. En la superficie, las moléculas están solo parcialmente rodeadas por otras moléculas y el número de moléculas adyacentes es menor que en el bulto, esto es energéticamente poco favorable, para poder sacar una molécula del bulto hacia la superficie se tiene que realizar trabajo<sup>1</sup> (Figura 1). Para las moléculas es energéticamente favorable estar rodeadas por otras moléculas, estas se atraen unas a otras por diferentes

interacciones<sup>1</sup> (Figura 1). Con esto en mente, podemos interpretar la tensión superficial, como la energía requerida para llevar una molécula de dentro del bulto hacia la superficie y crear una nueva área superficial<sup>1</sup>.

$$\gamma = \left( \frac{dG}{dA} \right)_{P,T,i} \quad (1)$$

$\gamma$  es la tensión superficial, G es la energía libre de Gibbs superficial, A es la unidad de área superficial, y i es un componente que forma la interfase<sup>5</sup>.



**Figura 1. Esquema de la estructura molecular de una interfase líquido-gas.** Las flechas indican las interacciones que se dan entre las moléculas. El desequilibrio de las interacciones origina la tensión superficial<sup>1</sup>.

### Medición de la tensión interfacial

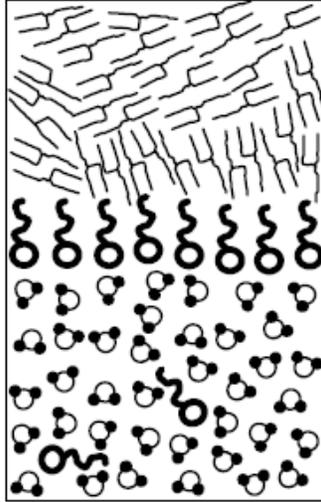
Hay diferentes métodos disponibles para medir la tensión interfacial, describiremos dos de los métodos más utilizados. El método de la placa de Wilhelmy, consiste en una placa delgada de platino que está suspendida del brazo de una balanza, la cual se sumergirá dentro de un líquido, actuando diversas fuerzas, como la gravedad, la tensión superficial hacia abajo, y la fuerza boyante debida al desplazamiento del agua hacia arriba. En este método se determina la fuerza sobre la placa suspendida debida a la tensión superficial, luego esta fuerza es convertida en tensión superficial tomando en cuenta las dimensiones de la placa<sup>6</sup>.

El método de la gota o burbuja pendiente se basa en que el hecho de que la forma de las gotas o burbujas depende del balance entre la tensión superficial y las fuerzas externas, como la gravedad. Este balance se ve reflejado matemáticamente en la ecuación de Laplace<sup>7</sup>. El procedimiento general de estos

experimentos consiste en la formación de una gota o una burbuja, para después medir sus dimensiones por medio del análisis de imágenes<sup>8</sup>. Se puede medir la tensión superficial de líquidos puros rodeados por aire, de líquidos suspendidos en otros líquidos o burbujas inmersas en un líquido, además de que se pueden agregar solutos superficialmente activos y medir los cambios en la tensión superficial<sup>8</sup>.

### **1.1.2 Adsorción de solutos en la interface en condiciones de equilibrio**

Hasta el momento solo consideramos las características moleculares de una interface que separa dos fluidos, pero existen materiales que tienen propensión a concentrarse (adsorberse) en las interfaces y alterar sus propiedades, por ejemplo, tensoactivos, fosfolípidos, proteínas, polisacáridos, y alcoholes<sup>2,9</sup>. Podemos identificar dos tipos de adsorción de moléculas en una interface<sup>9</sup>. Una en la que las especies adsorbidas tienen una solubilidad lo suficientemente grande en el solvente, tal que, cuando la superficie está saturada, permanece una reserva de moléculas activas de superficie en la solución para “llenar los espacios” en caso de que más superficie sea creada, formando las llamadas monocapas de Gibbs<sup>9</sup>. En el otro caso, materiales que no tienen la suficiente solubilidad forman películas superficiales que quedan aisladas en la superficie, estos materiales forman las monocapas insolubles<sup>9</sup>.



**Figura 2. Esquema del sistema agua, aceite, y soluto activo en la interface.** El soluto tiende a acumularse en la interface agua-aceite, porque esto minimiza la energía libre del sistema<sup>2</sup>.

La adsorción de solutos en la interface usualmente resulta en una alteración de la tensión superficial, el efecto más común es la disminución de la tensión superficial<sup>9</sup>. Tomemos como ejemplo un sistema que consiste de dos líquidos inmiscibles, sean agua y aceite, y un soluto anfifílico que tendera a acumularse en la interface separando las fases<sup>2</sup> (Figura 2). En este estado de adsorción ocurre una disminución de la energía libre relativa al estado de no adsorción<sup>2</sup>. Los cambios en la energía libre entre estos estados, son determinados por los cambios en las interacciones de las moléculas involucradas<sup>2</sup>. La tensión interfacial se reduce porque las interacciones termodinámicamente desfavorables entre el agua y el aceite se reducen<sup>2</sup>. El contacto directo entre las moléculas de agua y las de aceite, son remplazadas por interacciones entre los segmentos polares del soluto con el agua y las de los segmentos no polares con el aceite<sup>2</sup>. Esta reducción de la tensión interfacial por la presencia de un soluto activo de superficie se conoce como la presión superficial:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2)$$

Donde  $\gamma_0$  es la tensión superficial de la interface pura y  $\gamma$  es la tensión superficial del fluido más la monocapa de moléculas activas en la superficie<sup>10</sup>. Se puede interpretar como la presión ejercida por la monocapa que se opone a la tensión contráctil de la superficie limpia<sup>10</sup>. La variación de la presión superficial con el área

disponible es representada con curvas  $\pi$ -A (presión-área)<sup>10</sup>. Estas curvas se pueden interpretar como un análogo en dos dimensiones de las curvas p-V<sup>10</sup>.

### Isotermas de adsorción

Es necesario describir la relación entre la concentración de soluto adsorbido y la concentración de soluto libre, y cuantificar cómo esta relación depende de la actividad superficial de las moléculas de soluto<sup>2</sup>. En esta sección, se presentaran tres diferentes enfoques desarrollados para la descripción de esta relación, las isotermas de adsorción de Gibbs, Langmuir y Frumkin<sup>2</sup>. Para encontrar la relación entre la concentración de soluto adsorbido y la concentración de soluto libre, comenzare definiendo la concentración de soluto que se acumula en la interface, que se conoce como exceso superficial:

$$\Gamma = \frac{N}{A} \quad (3)$$

Donde N corresponde a la cantidad de moléculas en la superficie, y A es el área interfacial. El exceso superficial esta dado como el número de moléculas por unidad de área<sup>1,2</sup>.

La isoterma de adsorción de Gibbs relaciona el exceso superficial  $\Gamma$  y la tensión interfacial, su derivación es puramente termodinámica y puede considerarse como el análogo en dos dimensiones de la ecuación de Gibbs-Duhem<sup>2,11,55</sup>. En este modelo se asume que la interface es infinitesimalmente delgada y que se trata de un proceso a temperatura constante<sup>2,11,56</sup>.

$$d\gamma = - \sum_i \Gamma d\mu \quad (4)$$

Otra manera de escribir la ecuación es usando una expresión general para el potencial químico de una especie en disolución<sup>56</sup>.

$$d\mu = RTd(\ln a) \quad (5)$$

Sustituyendo (5) en (4), la ecuación queda como:

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \frac{d\gamma}{d \ln a} \quad (6)$$

Donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta y a es la actividad del componente i en la fase de bulto. Con la ecuación de Gibbs se pueden obtener isotermas de adsorción para sistemas diluidos, moderadamente diluidos y concentrados. Para el caso de los sistemas moderadamente diluidos la ecuación más empleada para describir el estado de solutos adsorbidos es la de Langmuir. La isoterma de adsorción para el modelo de Langmuir es:

$$\theta = \frac{bc}{1 + bc} \quad (7)$$

Y la correspondiente ecuación de estado tiene la forma

$$\gamma_0 - \gamma = \Pi = -RT\Gamma_\infty \ln(1 - \theta) = RT\Gamma_\infty \ln(1 + bc) \quad (8)$$

c es la concentración en el bulto de la molécula superficialmente activa,  $b = \frac{k_{ads}}{k_{des}}$ , donde  $k_{ads}$  y  $k_{des}$  corresponden a las constantes de rapidez de adsorción y desorción, respectivamente<sup>11</sup>.  $\Gamma$  es el exceso superficial y  $\Gamma_\infty$  es la concentración superficial a saturación<sup>11,55</sup>.  $\theta = \frac{\Gamma}{\Gamma_\infty}$  Se refiere al número de espacios ocupados por los solutos y corresponde al grado de recubrimiento de la superficie<sup>11</sup>.  $\gamma_0$  es la tensión superficial en ausencia de la molécula superficialmente activa,  $\gamma$  es la tensión superficial del fluido más la monocapa de moléculas activas en la superficie, y  $\pi$  es la presión superficial  $\gamma_0 - \gamma$ . El modelo describe la formación de una capa de moléculas adsorbidas, donde cada molécula ocupa cierta área en la interface sin que estas interaccionen, considerando de igual manera la desorción de las moléculas<sup>11,55</sup>.

Los sistemas que se desvían un poco del comportamiento que describe el modelo de Langmuir pueden ser analizados por la isoterma de Frumkin, que considera las interacciones entre las moléculas adsorbidas<sup>47</sup>. La isoterma de de adsorción de Frumkin y su correspondiente ecuación de estado están representadas por:

$$bc = \frac{\theta}{1 - \theta} e^{(-2a\theta)} \quad (9)$$

$$\Pi = -RT\Gamma_{\infty}[\ln(1 - \theta) + a(\theta)^2] \quad (10)$$

Donde  $a$  es el parámetro de interacción intermolecular.

Además de las isothermas de adsorción aquí mencionadas, existen otras, las cuales son derivadas empíricamente o de ciertas suposiciones<sup>5</sup>. La elección de alguna de estas en el análisis de moléculas que se concentran en la interface dependerá del tipo de moléculas involucradas.

#### **Medición de isothermas de presión superficial ( $\pi$ )/área ( $a$ )**

En principio los métodos usados para medir la tensión superficial pueden ser usados para medir  $\pi$ , aunque algunos son poco adecuados para trabajar con superficies cubiertas con películas, con las excepciones del método de la placa de Wilhelmy y el de la gota pendiente<sup>8</sup>. El método de la gota pendiente se ha adaptado para medir la presión superficial<sup>8</sup>. Al variar el volumen de la gota con una jeringa motorizada, se mide la presión superficial como función del área<sup>8</sup>. Ambas aproximaciones funcionan muy bien y son capaces de medir valores pequeños de presión<sup>8</sup>. La placa de Wilhelmy puede ser utilizada en conjunción con una palangana de Langmuir<sup>6,8</sup>. El sistema consiste en la palangana que soporta la subfase, dos barreras móviles sobre la superficie de la palangana y la placa para medir la presión superficial<sup>6,8</sup> (Figura 3). En estos experimentos el material de interés se diluye en un solvente volátil, es extendido en una superficie líquida y se permite que el solvente se evapore<sup>8</sup>. A medida que las barreras se mueven, comprimiendo la superficie, la presión superficial es medida<sup>6</sup>. Durante la compresión de la capa, las moléculas se reorganizan y esta atraviesa varias transformaciones de fase análogas a los estados tridimensionales gaseoso, líquido y sólido para finalmente formar una capa ordenada en la superficie líquida<sup>44</sup>. A partir de la información obtenida de comprimir una película a una velocidad constante monitoreando la presión superficial, se pueden construir las isothermas de presión superficial-área, las cuales son un importante indicador de las

propiedades de la monocapa<sup>6</sup>. Al examinar las isothermas se pueden distinguir distintas regiones, llamadas fases, estas fases son características de los diferentes estados de agregación que las moléculas adoptan durante la compresión y se identifican como discontinuidades en la isoterma<sup>44</sup>. Si se comprime mucho la capa puede ocurrir el fenómeno de colapso, que es debido a la inestabilidad mecánica a altas presiones superficiales, donde las moléculas son forzadas a salir de la interface, perdiendo las capas su integridad<sup>44</sup>.

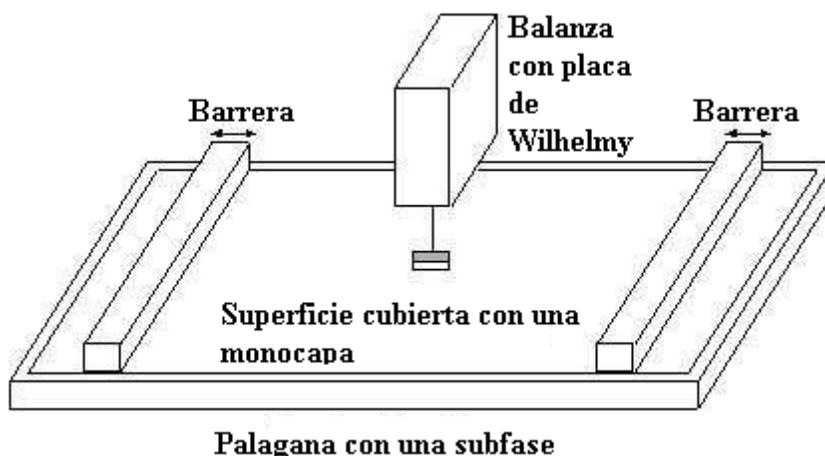


Figura 3. Esquema de una palangana de Langmuir con placa de Wilhelmy para medir la presión superficial<sup>6</sup>.

La palangana de Langmuir también puede formar parte del montaje experimental de la microscopia de ángulo de Brewster<sup>12</sup>. Cuenta con un láser que es polarizado en el plano paralelo y dirigido al ángulo de Brewster hacia la interface aire-líquido<sup>12</sup>. Bajo estas condiciones la luz no es reflejada<sup>12</sup>. Al agregar una película a la interface se producen cambios en el índice de refracción resultando en reflexión de la luz de los lípidos hacia una cámara que proporciona imágenes de la interface, permitiendo la visualización en tiempo real de monocapas<sup>12</sup>.

### 1.1.3 Adsorción de solutos en la interface bajo una perturbación de su estado de equilibrio

Supongamos una interface en su estado de equilibrio con una cantidad de soluto, que es sometida a una perturbación local (como una dilatación)<sup>49</sup>. La concentración en ese segmento se reduce y no puede ser restablecida inmediatamente, por lo que se produce un aumento momentáneo de la tensión superficial<sup>49</sup>. La tensión superficial en esta área es más grande que en sus

alrededores, y tendera a “jalar” el área dilatada para regresarla a su configuración en equilibrio<sup>49</sup>. Por el contrario, si se provocara una compresión en la superficie, la concentración del soluto aumentaría, llevando a una disminución de la tensión superficial, por lo que se buscara re-dilatar la superficie para restablecer las condiciones iniciales<sup>49</sup>. A la redistribución automática del soluto en la interface en respuesta a cualquier distorsión de la superficie, produciendo fuerzas que se oponen a la distorsión, se le conoce como elasticidad de Gibbs<sup>49</sup>. Este modelo propone que la superficie consiste en una película delgada con un volumen constante que se encuentra separada por dos superficies. Donde la cantidad de surfactante dentro de la película es siempre constante y la sección de la película sometida a la deformación puede ser considerada como un sistema cerrado<sup>49</sup>.

$$E = \frac{2d\gamma}{d\ln A} \quad (11)$$

Donde  $\gamma$  es la tensión superficial,  $A$  es el área del elemento de superficie y el 2 por el hecho de que la película está rodeada por 2 superficies<sup>49</sup>.

### 1.1.4 Reología interfacial

Las moléculas que se adsorben a una superficie, no solo provocan una disminución de la tensión superficial, sino que también le confieren propiedades reológicas<sup>50</sup>. La reología es el estudio del flujo y la deformación de la materia<sup>13,14</sup>. El problema básico de la reología es determinar la relación entre el esfuerzo aplicado y la deformación producida en un material<sup>13,14</sup>. En el caso de la reología interfacial se estudia la respuesta de interfaces móviles a los cambios debidos a cizallamiento (cambios en la forma a un área constante) o deformación dilatacional (cambios en el área superficial con una figura constante)<sup>15</sup>. La reología interfacial (flujo en dos dimensiones) puede ser considerada análoga a la reología de bulto (flujo en tres dimensiones), y como en la reología tridimensional, resortes y amortiguadores se pueden utilizar para simular el comportamiento reológico de los sistemas estudiados<sup>15</sup>. Los resortes son utilizados para simular el comportamiento elástico ideal y pueden ser descritos por la ley de Hook. Mientras que los amortiguadores son usados para simular un comportamiento viscoso en la

interface<sup>15</sup> (tabla 1). Pero existen materiales que son tanto viscosos como elásticos cuyo comportamiento emerge de las interacciones de las moléculas en el fluido<sup>13,14</sup>. Imaginemos que las moléculas en la interface están en su estado más favorable termodinámicamente (estado de equilibrio)<sup>15</sup>. Cuando esta interface es deformada, las fuerzas termodinámicas tienden a restauran el estado original<sup>15</sup>. En circunstancias ordinarias, la restauración de la película interfacial no es instantánea si no “amortiguada” por un proceso de relajación viscosa<sup>15</sup>. En consecuencia, se han propuesto varios modelos matemáticos para aproximar el comportamiento viscoelástico de muestras al combinar los modelos del resorte y el amortiguador<sup>15</sup>.

Tabla 1. Características de los materiales elásticos y viscosos.

Materiales puramente elásticos	Materiales puramente viscosos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se deforman en respuesta a un esfuerzo, y se quedan allí hasta que el esfuerzo es removido, regresando a su posición original.</li> <li>• Responden instantáneamente a la deformación.</li> <li>• El esfuerzo es proporcional a la deformación aplicada.</li> <li>• <math>\tau = G\gamma</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Su respuesta está relacionada con la tasa a la que es deformado.</li> <li>• El esfuerzo es proporcional a la tasa de deformación aplicada.</li> <li>• <math>\tau = \eta\dot{\gamma}</math></li> </ul>

### Medición de reología Interfacial

#### Reología interfacial de tipo cizalla

En este tipo de reología se induce cizallamiento en la película absorbida sin cambiar el área<sup>15</sup>. Se puede dividir en métodos directos e indirectos<sup>15</sup>. En el caso de los métodos directos se determina el esfuerzo de cizalla de la interface a medida que es deformado por contacto con un cuerpo extraño<sup>15</sup>. Los reómetros más usados son aquellos en los que un cuerpo oscilador o rotador (figura 4) es conectado a un motor que puede detectar el torque y el desplazamiento mientras la muestra es retenida en un plato estacionario<sup>15</sup>.

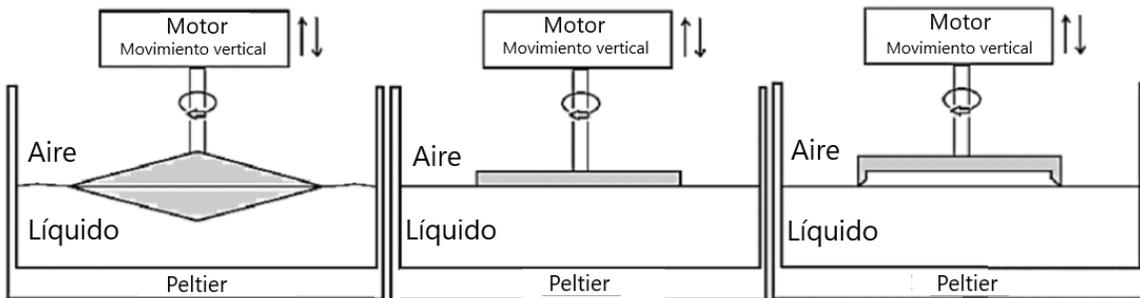
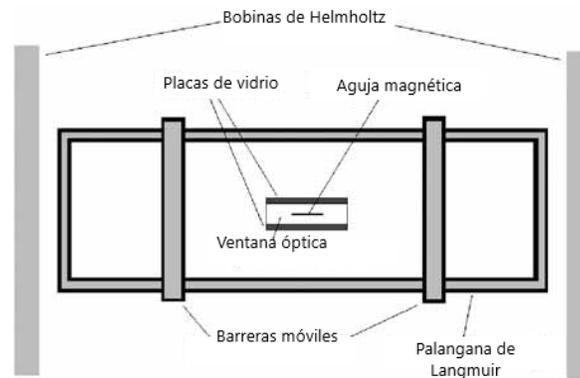


Figura 4. Esquemas de diferentes sistemas para mediciones interfaciales. De izquierda a derecha: sistema biconico, sistema placa-placa y técnica del péndulo de torsión cuchillo-orilla<sup>15</sup>.

En esta clasificación se puede agregar el viscosímetro de aguja magnética (figura 5), el cual es uno de los instrumentos más sensibles para la medición de parámetros de reología interfacial de cizalla<sup>15</sup>. Consiste en una aguja magnética que flota en la interfase, la cual es movida por un campo magnético externo,

además de que tiene una palangana de Langmuir que permite el control de la monocapa interfacial <sup>15</sup>.

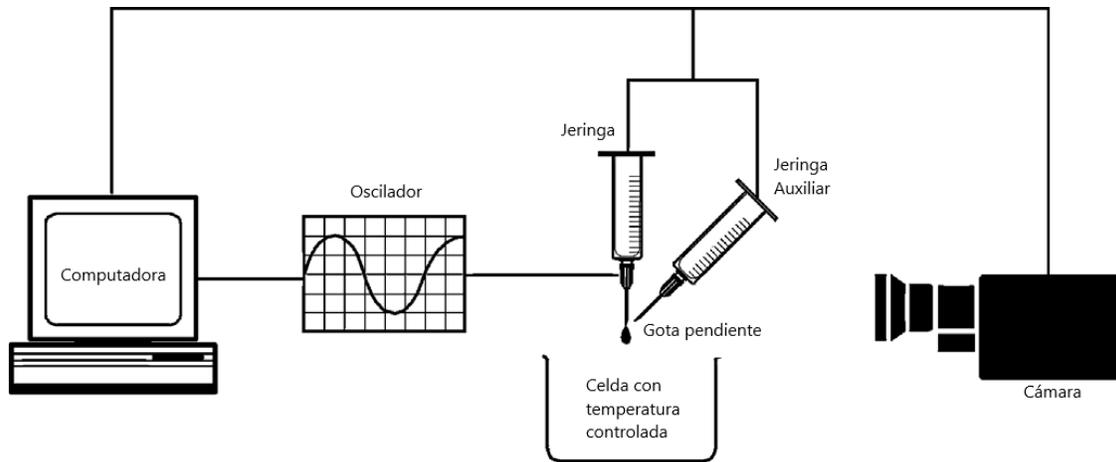


**Figura 5. Representación esquemática del viscosímetro de la aguja magnética en la superficie <sup>15</sup>.**

En los métodos indirectos se miden perfiles de velocidad superficial usando partículas visibles inertes <sup>15</sup>. Por ejemplo: 2 cilindros estacionarios concéntricos y un plato rotatorio lleno con la muestra <sup>15</sup>. La cámara es rotada y el movimiento superficial entre los cilindros es medido usando partículas colocadas en la interface del fluido <sup>15</sup>.

### **Reología interfacial dilatacional**

Con la reología interfacial dilatacional se pueden observar las propiedades reológicas que surgen en respuesta a cambios en el área superficial <sup>12</sup>. Las técnicas más comúnmente usadas son las que se basan en análisis de imágenes <sup>15,16</sup>. Con las cuales se puede obtener el perfil de una gota o burbuja, para subsecuentemente ajustar numéricamente a la ecuación de Laplace <sup>15,16</sup>. Lo que permite encontrar los valores de la tensión superficial ( $\gamma$ ) y el área superficial de la gota ( $A$ ) (Figura 6) <sup>15,16</sup>. Con el fin de explorar amplias escalas de tiempo, se pueden aplicar deformaciones periódicas del área o una deformación repentina en la forma de una pequeña compresión o expansión instantánea <sup>15,16</sup>.



**Figura 6. Esquema del sistema para realizar experimentos de gota pendiente oscilante<sup>4</sup>.**

De la variación periódica de  $A$  y  $\gamma$  con el tiempo, se puede deducir el módulo interfacial dilatacional.<sup>17, 51</sup>. Este término se deriva del modelo de la elasticidad de Gibbs<sup>17,51</sup>. Se emplea en el caso en el que al aplicar una deformación a una interfaz, esta tiene un comportamiento viscoso además del elástico<sup>17,51</sup>. La componente viscosa refleja la existencia de procesos de relajación en, o cerca de la interfaz.<sup>17,51</sup>. Se pueden reconocer varios procesos de relajación, como, el intercambio difusivo entre las moléculas superficialmente activas y la solución (bulto), intercambio con micelas en la solución, y el intercambio con multicapas en la superficie<sup>52</sup>. El módulo interfacial dilatacional de Gibbs está definido como el aumento de la tensión superficial después de un pequeño aumento en el área de un elemento de superficie:

$$E^* = \frac{d\gamma}{d \ln A} \quad (12)$$

Debido a que la gota es oscilada periódicamente, el módulo dilatacional exhibe dos contribuciones: un componente elástico, por la energía recuperable almacenada en la interface y un módulo de pérdida, por la disipación de la energía a través de los procesos de relajación<sup>17</sup>. Los módulos elástico  $E'$  y viscoso  $E''$  son las partes real e imaginaria de la elasticidad dilatacional compleja<sup>16</sup>. Para oscilaciones sinusoidales del área superficial, a una frecuencia  $\omega$ ,  $E'$ , y  $E''$  se definen como:

$$E' = \Delta\gamma \frac{A_0}{\Delta A} \cos(\phi) \quad (13)$$

$$E'' = \Delta\gamma \frac{A_0}{\Delta A} \sin(\phi) \quad (14)$$

Donde  $\Delta\gamma$  es la amplitud de la variación periódica de la tensión superficial<sup>17</sup>.  $A_0$  es el área de la gota antes de las oscilaciones o el promedio del área superficial de la gota<sup>17</sup>.  $\Delta A$  la amplitud de la deformación interfacial, y  $\phi$  es el ángulo de fase entre las curvas de área y tensión superficial<sup>17</sup>. Para determinar  $E'$  y  $E''$ , el área de la gota y la tensión superficial son medidas como función del tiempo con el método de análisis de la forma de la gota<sup>17</sup>. Los datos de  $\gamma(t)$  y  $A(t)$  son ajustados a las siguientes ecuaciones para obtener los parámetros de  $\Delta\gamma$ ,  $\phi$ ,  $A_0$ , y  $\Delta A$ :

$$A(t) = A_0 + \Delta A \cos(\omega t + \varphi_1) \quad (15)$$

$$\gamma(t) = \gamma_0 + \Delta\gamma \cos(\omega t + \varphi_2) \quad (16)$$

Donde  $\gamma_0$  es la tensión superficial promedio y  $\phi = \varphi_1 - \varphi_2$ <sup>17</sup>.

En la ausencia de fenómenos de relajación, el comportamiento de la interface es puramente elástico: las fluctuaciones en el área y tensión superficial están en fase<sup>51</sup>. Por otro lado, cualquier mecanismo de relajación en o cerca de la interface se refleja como una diferencia de fase entre tensión y área<sup>51</sup>.

Lucassen y van den Tempel propusieron un modelo para la evolución del módulo dilatacional de una interface sometida a una variación sinusoidal del área como función de la frecuencia<sup>57</sup>. Este modelo considera la difusión de las moléculas superficialmente activas hacia la interface y omite los fenómenos de adsorción y desorción<sup>54,57</sup>. Las perturbaciones armónicas impuestas en la interface producen en la tensión superficial un comportamiento oscilatorio, que puede ser descrito por  $E^*$ .

$$E^* = E' + iE'' \quad (17)$$

E' y E'' pueden ser calculadas de las siguientes ecuaciones:

$$E' = E_0 \frac{1 + \xi}{1 + 2\xi + 2\xi^2} \quad (18)$$

$$E'' = E_0 \frac{\xi}{1 + 2\xi + 2\xi^2} \quad (19)$$

Donde  $E_0$  es la elasticidad instantánea y se expresa como:

$$E_0 = -\frac{d\Pi}{d\ln\Gamma} = -\Gamma \frac{d\Pi}{d\Gamma} \quad (20)$$

$\xi$  es un parámetro adimensional que considera el efecto de la difusión  $\mathcal{D}$  expresada en  $\text{m}^2/\text{s}$ .

$$\xi = \frac{dc}{d\Gamma} \sqrt{\frac{D}{2\omega}} \quad (21)$$

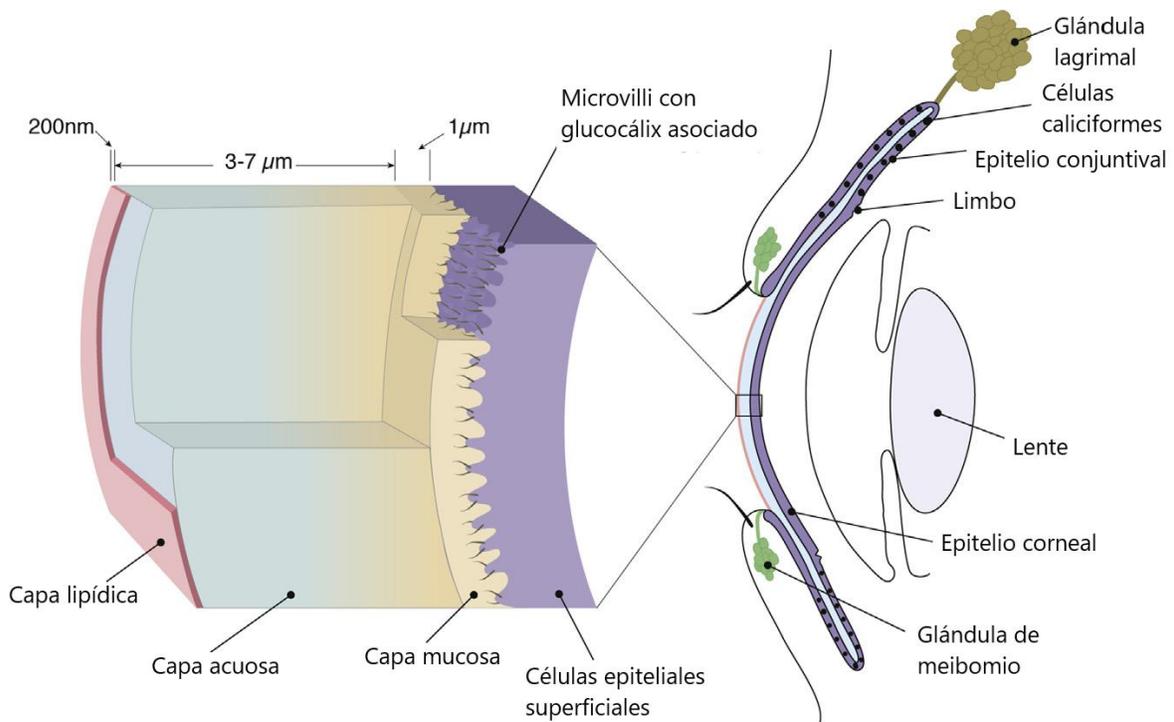
Además del experimento oscilatorio existe el ensayo de deformación-relajación, en este se aplica una deformación repentina en la forma de una pequeña compresión o expansión instantánea<sup>57</sup>. Después de que un cambio es aplicado a películas lipídicas y luego cesa, los constituyentes heterogéneos de la película experimentan una compleja reorganización asociada con las características de procesos a bajas frecuencias, hasta que un nuevo equilibrio es alcanzado en la interface<sup>18</sup>. La respuesta a bajas frecuencias puede ser determinada directamente del módulo de relajación dilatacional<sup>16</sup>. En este tipo de experimentos, la interface es deformada instantáneamente y después se mantiene el área constante mientras la tensión superficial es medida, las propiedades reológicas son examinadas usando la transformada de Fourier de las transientes de la relajación de la tensión superficial<sup>16</sup>. El método de deformación-relajación permite obtener las partes real e imaginaria del módulo dilatacional complejo en un rango de frecuencias muy bajas<sup>18</sup>.

## **1.2 Los lípidos meibomiales**

En esta parte del capítulo describiremos la capa lipídica. Comenzaremos con una breve descripción de la superficie ocular y de las partes que la conforman, para después centrarnos en la película lagrimal. La cual consiste en tres capas: la capa mucosa, la capa acuosa y la capa oleosa. La capa oleosa está compuesta principalmente por lípidos de la glándula de meibomio, y se trata la región más externa. Algunas de sus propiedades han sido estudiadas in vitro, por lo que también se presentaran.

### **La superficie ocular**

La superficie ocular es un componente vital para la visión<sup>19</sup>. Su función consiste en mantener la claridad óptica de la córnea regulando la hidratación de la córnea y la conjuntiva, además de proteger el globo ocular de daño mecánico o por infecciones<sup>19</sup>. Se trata de una estructura compleja que depende de la integración exitosa de múltiples tejidos, como son: los constituyentes celulares que cubren las áreas expuestas del ojo (epitelio corneal, limbo, conjuntiva), el margen del parpado y la película lagrimal<sup>3,19</sup> (Figura 7).



**Figura 7. Esquema de la superficie ocular.** Se representa el modelo clásico de las tres capas de la película lagrimal, compuesta por la capa mucosa adyacente a la superficie epitelial, una capa acuosa, y una capa delgada de lípidos en la superficie más externa de la película<sup>3</sup>.

### La película lagrimal

Es un sistema biológico coloidal extremadamente variado, cuyos componentes tienen origen glandular y celular<sup>3,20</sup>. Consta de tres capas, la capa mucosa, constituida por mucinas secretadas por las células caliciformes y del epitelio. La capa acuosa, secretada por la glándula lagrimal cuya superficie externa es recubierta por la capa oleosa, formada por lípidos que son secretados por la glándula de meibomio<sup>19,21</sup> (Figura 1). Entre sus funciones principales se encuentran: la distribución de nutrientes, control de la oxigenación de la córnea, protección física y antimicrobiana<sup>21</sup>.

### Capa lipídica

Se trata de la capa más externa de la película lagrimal, la cual se encuentra expuesta al medio ambiente<sup>22</sup>. Compuesta principalmente por lípidos de la glándula de meibomio<sup>22</sup>. A esta secreción lipídica se le conoce como meibum. Es expresada a la superficie ocular por la delicada presión ejercida por los párpados, a partir de glándulas meibomiales individuales a través de un sistema de pequeños ductos y un ducto central que termina en un orificio en el margen del

parpado<sup>22</sup>. El meibum humano está constituido, en mayor proporción, por ~30-45 mol% de ésteres de colesterol y ~30-50 mol% de ésteres cerosos<sup>23</sup>. Las principales moléculas anfifílicas secretadas por las glándulas de meibomio son O-acilo hidroxiácidos grasos  $\omega$  (OAHFAs) estos comprenden el ~2% de los lípidos meibomiales. Además, también se encuentran aunque en menor cantidad, triacilgliceridos un ~2%, 0.5% de colesterol libre, y fosfolípidos menos del 0.01%<sup>23</sup>. La capa lipídica no se compone meramente de lípidos, como su nombre lo podría sugerir, sino que también contiene cerca de un 22 wt % de componentes no-lipídicos (proteínas, sales, polisacáridos), se cree que ciertas proteínas y glucoproteínas, como las lipocalinas, la lisozima y la mucina, están intercaladas con la capa lipídica y mejoran su estabilidad<sup>24,25</sup>.

Se estima que la capa lipídica de la película lagrimal tiene un espesor de entre 15 y 160 nm. Donde los lípidos meibomiales no se extienden como monocapas en la interface aire/agua sino que forman gruesas películas dúplex<sup>24,26,27,28</sup>. La visión más aceptada asume que los lípidos polares forman la subcapa inferior, es decir, la interface entre la capa lipídica y la capa acuosa, y los lípidos no polares forma la parte superior la cual está en contacto con el aire<sup>24,26, 27,28</sup> (Figura 8). Se cree que la subcapa inferior crea una interface que ayuda a estabilizar la porción superior<sup>27</sup>. Además, se propone la formación de agrupaciones de lípidos hidrofóbicos en lentes bajo altas presiones superficiales<sup>23</sup>. La formación de estos lentes podría ser crítica para permitir la difusión de la capa lipídica después del parpadeo<sup>23</sup>.



**Figura 8. Modelo de la capa lipídica de la película lagrimal.** Se identifican dos fases, con una monocapa de lípidos polares y una capa gruesa de lípidos no polares<sup>18</sup>.

A la capa lipídica se le atribuyen funciones como: esparcirse sobre la fase acuosa, disminuyendo la energía libre e impartiendo estabilidad a la película lagrimal; engrosar la fase acuosa por el efecto Marangoni, retrasar la evaporación, esto fue observado en nuestro grupo a través de experimentos de microevaporación. Los cuales mostraron que las películas de lípidos meibomiales disminuyen significativamente la tasa de evaporación, además la evaporación con lípidos meibomiales provenientes de pacientes diagnosticados es mayor que los lípidos provenientes de pacientes sanos<sup>20,53</sup>. Los lípidos meibomiales proporcionan una superficie óptica suave para la córnea, fungen como barrera contra partículas foráneas, tienen actividad antimicrobiana y sellan los márgenes de los párpados durante cierre prolongado<sup>20</sup>. Gracias a eso es que la capa lipídica juega un rol vital en el mantenimiento de la homeostasis de la superficie ocular<sup>20</sup>. Problemas con su estabilidad y su ruptura puede causar irritación en la superficie ocular o inflamación y síntomas de ojo seco<sup>20</sup>. Su estabilidad es crucial para tolerar un rango de diferentes estreses y deformaciones, siendo la viscoelasticidad la principal característica que permite que resista la deformación<sup>30</sup>.

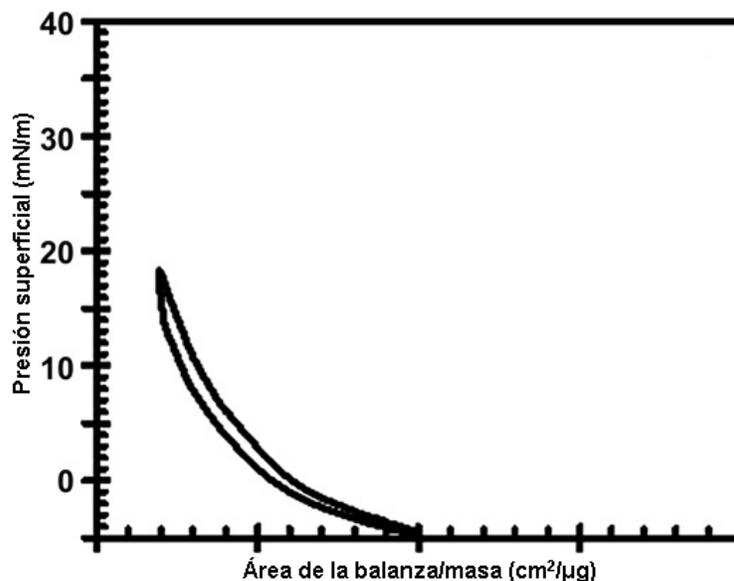
### **1.2.1 Estudios de la capa lipídica**

#### **Isotermas $\pi/A$ y microscopia de ángulo de Brewster de lípidos meibomiales**

La palangana de Langmuir y la microscopía de ángulo de Brewster han sido ampliamente utilizadas por diversos grupos, para la caracterización de lípidos meibomiales tanto de humanos como de distintas especies de animales, probando ser un enfoque bastante efectivo e informativo<sup>31</sup>. En esta sección se presentaran algunos de los resultados obtenidos respecto a la caracterización de lípidos meibomiales humanos.

Leiske et al realizaron isotermas de presión superficial-área, de lípidos meibomiales de humanos y de otros animales. Las isotermas de casi todos los lípidos estudiados fueron cualitativamente similares, exhibieron una pendiente creciente a medida que el área molecular promedio disminuía y no hubo evidencia de transiciones de fase en los lípidos humanos, durante la expansión las curvas exhibieron un poco de histéresis, aunque subsecuentes compresiones produjeron

el mismo comportamiento<sup>32</sup> (Figura 9). No se detectó el colapso de ninguna de las películas lipídicas<sup>32</sup>.



**Figura 9. Ciclos de compresión y expansión de lípidos meibomiales humanos.** La curva de arriba es el ciclo de compresión mientras que la curva de abajo es el ciclo de expansión<sup>32</sup>.

Los experimentos de Leiske et al fueron realizados a temperatura ambiente, pero se sabe que el rango de temperaturas de fusión de los lípidos meibomiales está entre 19.5° y 33.8°C<sup>33</sup>. Butovich et al estudiaron los efectos de la temperatura en películas de lípidos meibomiales. A 34°C la parte inicial de la isoterma fue pequeña para luego comenzar a subir hasta llegar a una  $\pi$  de ~16 mN/m, a 43° C la presión superficial se comenzó a incrementar tan pronto como las barreras comenzaron a cerrarse, llegando a un  $\pi$  de 18 mN/m sin señales de colapso. Ambas isotermas mostraron una histéresis notable<sup>31</sup>.

Kaercher et al. condujeron un estudio sistemático de la morfología y el comportamiento biofísico de los lípidos meibomiales humanos usando la palangana de Langmuir y la microscopía de ángulo de Brewster<sup>34</sup>. Obtuvieron imágenes de películas de lípidos meibomiales, con regiones blancas densas de lípidos alrededor de áreas más oscuras, con material lipídico menos denso<sup>34</sup>. Asimismo, observaron que la morfología de la película de lípidos cambio cuando la presión superficial fue incrementada<sup>34</sup>. En un estudio más reciente, Georgiev et al. estudiaron las propiedades superficiales de lípidos meibomiales de personas

sanas (MGS) y de personas con alguna disfunción de las glándulas meibomiales (dMGS) en interfaces solución salina-aire. Los experimentos se llevaron a cabo a dos diferentes temperaturas, 25 °C y 34 °C. Se usó la balanza de Langmuir y la microscopia de ángulo de Brewster<sup>18</sup>. Las isothermas se realizaron en un barrido de frecuencias, de  $10^{-5}$  a 1 Hz. Tanto a 25°C como a 34°C, las isothermas fueron similares, aunque el incremento en la temperatura desplazo las isothermas a valores de área superficial y de  $\pi$  más bajos. La reversibilidad de los lípidos meibomiales fue medida, mostrando histéresis tanto en los nMGS como en los dMGS<sup>18</sup>. La microscopia de ángulo de Brewster (Figura 10) revelo un mejor esparcimiento de los lípidos meibomiales de personas sanas en la interface aire-agua, mientras que las capas de lípidos meibomiales de personas enfermas fueron no uniformes y con parches <sup>18</sup>. A 34°C y  $\pi < 8 \text{ mN m}^{-1}$ , tanto las películas de los nMGS y los dMGS tuvieron regiones brillantes gruesas con regiones oscuras más delgadas entre ellas<sup>18</sup>. En el caso de los nMGS a  $>10\text{mN}$ , las regiones más delgadas casi se extinguieron y una película gruesa se formó a  $\geq 20 \text{ mN m}^{-1}$ <sup>18</sup>. Las películas de dMGS mantuvieron una estructura inhomogénea, con regiones más delgadas presentes en las capas, incluso  $>8 \text{ mN m}^{-1}$ <sup>18</sup>.

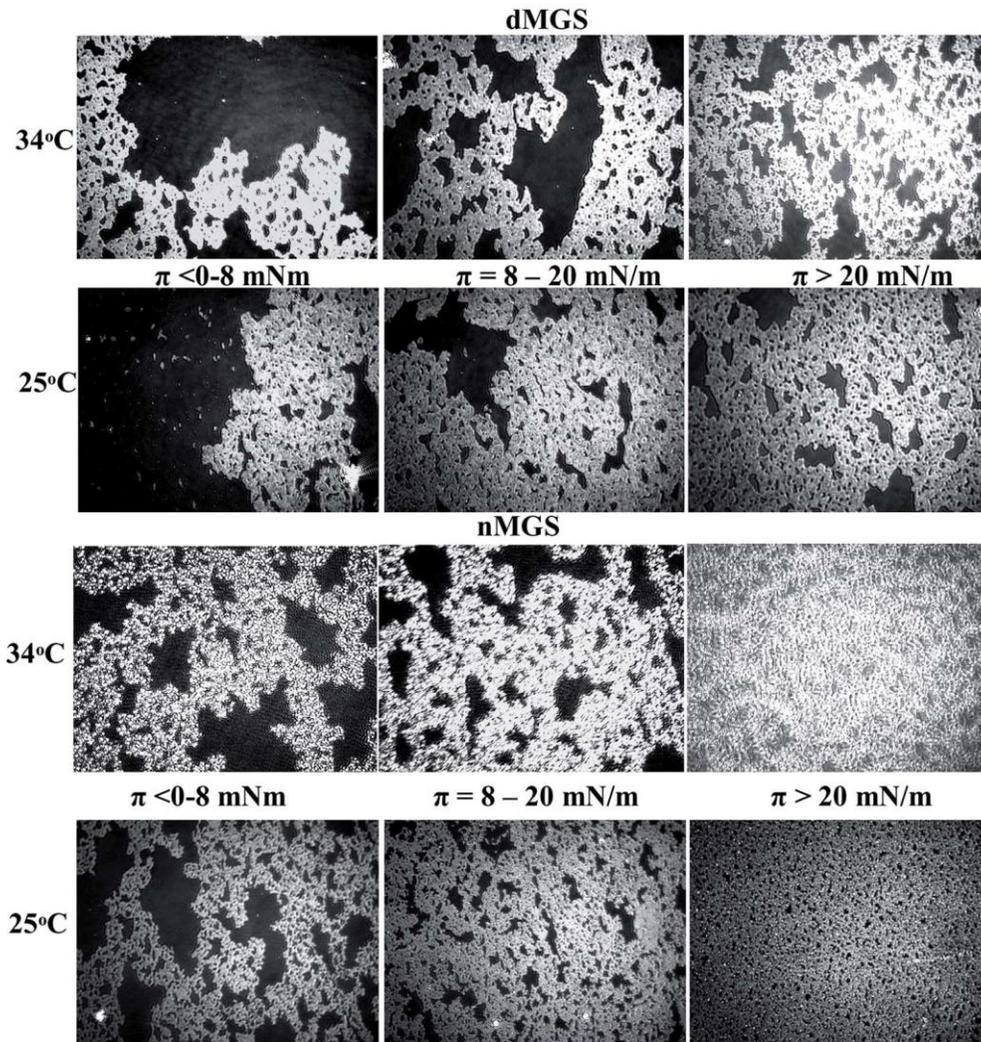
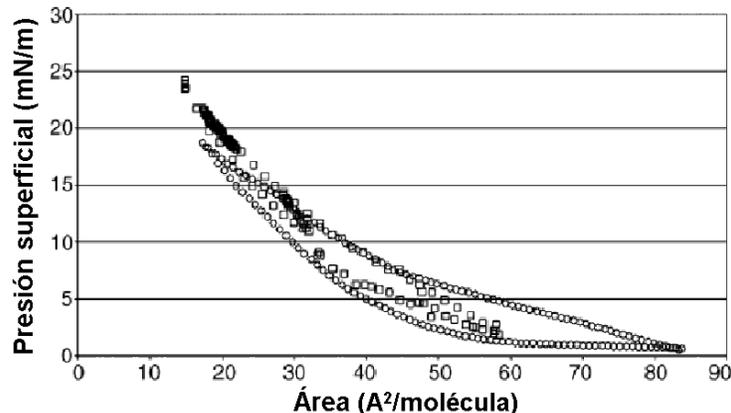


Figura 10. Imágenes representativas de las películas de lípidos meibomiales de personas sanas (nMGS) y pacientes con disfunción de las glándulas de meibomio (dMGS) a las temperaturas y rangos de presión superficial  $\pi$  denotados<sup>18</sup>.

La técnica de la gota pendiente también puede ser utilizada para realizar curvas de  $\pi/A$ <sup>36</sup>. Ha sido probada en lípidos meibomiales de bovino por Miano et al. Con el fin de demostrar la validez de la técnica, compararon los resultados obtenidos con resultados obtenidos a partir de la palangana de Langmuir<sup>36</sup>. Ambas curvas resultaron similares mas no idénticas, obtuvieron una presión superficial máxima de entre 25-30 mN/m durante la compresión, además a través de las dos técnicas se demostró histéresis de las entre el ciclo de compresión y expansión<sup>36</sup> (Figura 11). Hay que tener en mente que estos resultados fueron obtenidos de muestras de lípidos de bovino, por lo que no los podemos extrapolar al meibum humano<sup>34,36</sup>.



**Figura 11. Isoterma de  $\pi/A$  de lípidos meibomiales de bovino sobre solución salina a 36 °C.** Los círculos representan las mediciones tomadas por la placa de Wilhelmy, los cuadrados representan las mediciones con el método de la gota pendiente <sup>36</sup>.

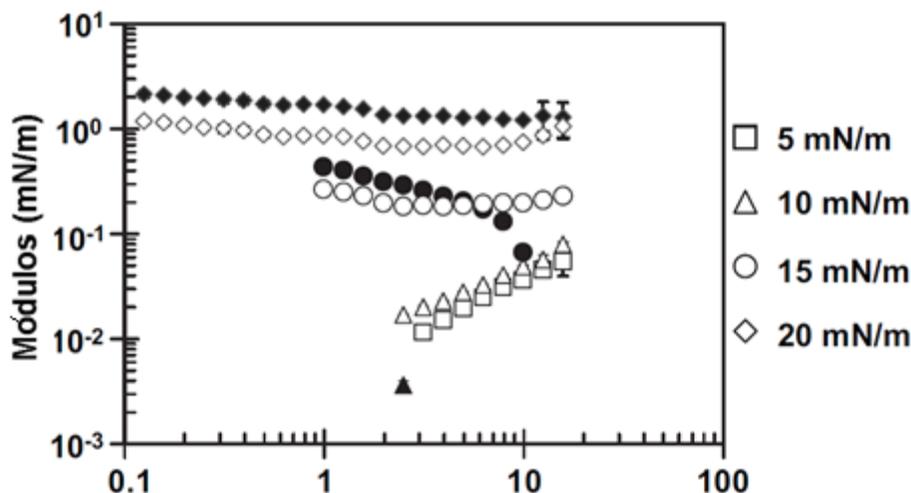
### Reología de lípidos meibomiales

Los lípidos meibomiales son el componente principal de la capa lipídica; por lo tanto, las propiedades físicas de estos materiales podrían ser particularmente importantes para la funcionalidad de la película lagrimal<sup>32</sup>. Las propiedades reológicas son una de las características más importantes a estudiar, y dependen de las fuerzas de compresión/expansión generadas por los movimientos de los globos oculares o de los parpados, y de las velocidades y amplitudes de su aplicación<sup>37</sup>. Debido a que la capa lipídica experimenta diferentes tipos de deformación, no puede ser caracterizada por una sola técnica<sup>8</sup>. En la primera parte de esta sección se presentarán los trabajos realizados de reología de bulto del meibum y en la segunda parte se presentará los trabajos sobre reología interfacial, haciendo énfasis en estos últimos los cuales sirven como un antecedente directo para nuestro trabajo aquí presentado.

Hay muy pocos estudios de reología de bulto del meibum humano<sup>38,39</sup>. Tiffany y Dart midieron valores de la viscosidad para el meibum humano, usando un tubo capilar y estimaron valores desde 9.7 a 19.5 Pa·s a 35°C<sup>38,39</sup>. Estos estudios fueron semicuantitativos y no examinaron los roles de la tasa de cizallamiento o la temperatura<sup>38,39</sup>. Más tarde, Yokoi et al mostraron que los cambios dependientes del tiempo en la propagación de la capa lipídica de la película lagrimal son consistentes con el modelo reológico de Voigt, sugiriendo que la película lagrimal tiene propiedades viscoelásticas, además concluyeron que la capa lipídica es

elástica y arrastra hacia arriba a la película lagrimal subyacente<sup>38,40</sup>. En 2013, Rosenfeld et al encontraron que el meibum en bulto es tanto viscoso como elástico, a 35 °C, la viscosidad de cizalla del meibum de bovino y de humano es aproximadamente  $10^5$  más grande que el agua, y tiene una gran fluidificación por cizallamiento incluso a temperaturas tan altas como 150 °C, lo que indica que el meibum está estructurado y es inhomogéneo<sup>38</sup>. El meibum de bovino y el de humano es también altamente elástico, con un módulo elástico más grande que el modulo viscoso, con valores entre aproximadamente los  $10^2$  y  $10^3$  Pa a 35 °C a 1 Hz<sup>38</sup>. Los experimentos de reología oscilatoria mostraron que el meibum es primariamente elástico hasta los 140 °C. Con la reologia estacionaria y oscilatoria se demostró un decline drástico en la viscosidad del meibum y en los módulos elástico y viscoso entre 30 y 36 °C, sugiriendo la presencia y subsecuente fusión de material cristalino arriba de ese rango de temperatura<sup>38</sup>.

En un estudio por Leiske et al. la viscoelasticidad de los lípidos meibomiales de humanos y de animales fueron examinados sometidos a deformación del tipo cizalla usando el reómetro de la aguja magnética en un barrido de frecuencias<sup>32</sup>. Las propiedades viscoelasticas interfaciales de las muestras de lípidos de humanos, bovinos, koalas, walabis y conejos siguieron el mismo comportamiento, a presiones superficiales bajas entre 5 y 10 mN/m el material se caracterizó por un comportamiento elástico; el modulo viscoso fue cero y el modulo elástico incremento linealmente con la frecuencia<sup>32</sup>. A una presión superficial de 15 mN/m, tanto el modulo viscoso como el elástico incrementaron, dominando el comportamiento elástico<sup>32</sup>. A 20 mN/m los módulos elástico y viscoso permanecieron invariantes con la frecuencia, lo cual es un comportamiento característico de un gel<sup>32</sup>.

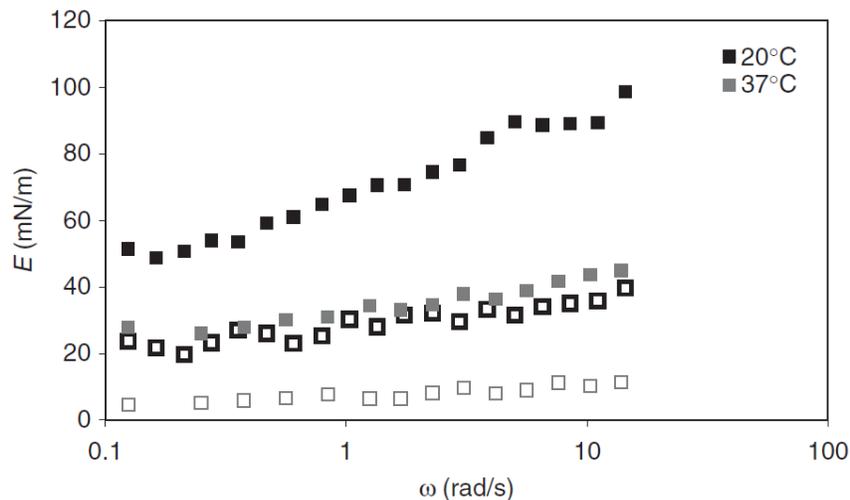


**Figura 12. Propiedades viscoelásticas de lípidos meibomiales humanos a diferentes presiones superficiales y en un barrido de frecuencias.** Los símbolos cerrados representan el módulo elástico, los símbolos abiertos el módulo viscoso<sup>32</sup>.

En un estudio posterior el mismo grupo de investigación, consideraron los efectos de la temperatura sobre los lípidos, esto es importante debido a la temperatura de transición de los lípidos meibomiales, se aplicaron deformaciones de tipo cizalla y se mostró que, a medida que la temperatura es aumentada, el módulo viscoelástico es disminuido<sup>41</sup>. Las películas de lípidos fueron dominadas por el módulo elástico hasta los 20 °C donde el módulo viscoso comenzó a dominar<sup>41</sup>. Arriba de los 30 °C el módulo elástico se volvió tan bajo que no se podía registrar<sup>41</sup>.

Los lípidos meibomiales también se han sometido a deformaciones dilatacionales, Para emular la compresión y expansión de la película lipídica<sup>30</sup>. Svitova et al, utilizaron la configuración de la burbuja sécil para investigar las propiedades reológicas dilatacionales interfaciales de películas gruesas de lípidos extraídos de lentes de contacto<sup>20</sup>. Las películas lipídicas exhibieron comportamientos viscoelásticos al someterse a deformaciones dilataciones radiales pequeñas y uniformes<sup>20</sup>. Además, examinaron como la interacción de los lípidos con la proteína modelo de las lágrimas, la lisozima, afecta las propiedades mecánicas, mostrando que las características reológicas interfaciales de las películas de lípidos se ven alteradas por las interacciones con la lisozima<sup>20,42</sup>.

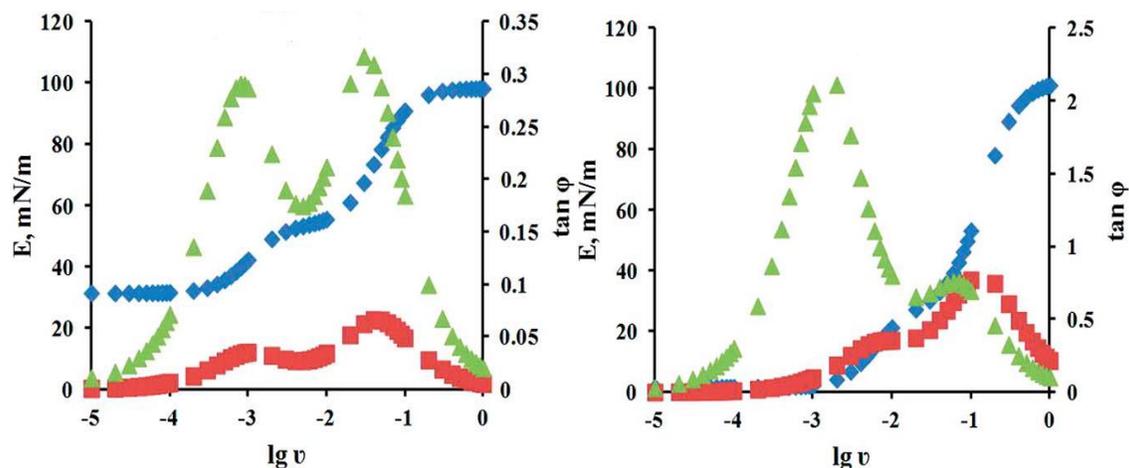
Raju et al en el 2013 usando el método de la gota pendiente examinaron las propiedades viscoelásticas de películas de lípidos meibomiales sometidas a deformaciones dilatacionales<sup>30</sup>. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente y a temperatura fisiológica, además se analizaron los efectos de alterar la composición de las películas lipídicas con pequeñas cantidades de colesterol y  $\beta$ -caroteno<sup>30</sup>. Tanto a 37 y 20 °C, el módulo elástico ( $E'$ ) fue más dominante que el módulo viscoso ( $E''$ ), indicando que las películas lipídicas eran más sólidas que fluidas, a pesar de la temperatura<sup>30</sup> (figura 13).  $E'$  y  $E''$  fueron dependientes de las frecuencias, indicando rearrreglos moleculares durante las expansiones y compresiones<sup>30</sup>. Las películas lipídicas cuya composición fue alterada mostraron un pequeño incremento en los módulos<sup>30</sup>.



**Figura 13. Lípidos meibomiales humanos sometidos a un barrido de frecuencias, a 20 y 37 °C.** Los símbolos cerrados representan el módulo elástico ( $E'$ ) mientras que los símbolos abiertos representan el módulo viscoso ( $E''$ )<sup>30</sup>.

Teniendo en cuenta el concepto de que la enfermedad del ojo seco se asocia a una capa lipídica ineficiente posiblemente causada por un cambio en la composición del meibum. Se han estudiado los posibles efectos en las propiedades viscoelásticas de alterar la composición de los lípidos. Indirectamente en los experimentos de Leiske et al, al comparar películas de lípidos meibomiales de humanos y de diferentes animales; y en los experimentos de Raju et al al agregar colesterol y  $\beta$ -caroteno. Directamente, en un artículo de Georgiev et al donde se examinó la reología dilatacional superficial de muestras de lípidos

meibomiales de ojos sanos y ojos con disfunción de las glándulas meibomiales, usando una palangana de Langmuir, por el método de deformación-relajación<sup>18</sup>. En estos experimentos la presión superficial fue monitoreada después de aplicada una compresión pequeña y rápida<sup>18</sup>. Las muestras de pacientes enfermos mostraron algunas características similares y otras diferentes en las propiedades viscoelásticas comparadas con las muestras de pacientes sanos<sup>18</sup>. Ambos tipos, fueron predominantemente elásticos a altas frecuencias ( $>2.5 \times 10^{-2}$  Hz), sin embargo en el rango de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  Hz, los lípidos de pacientes enfermos se volvieron predominantemente viscosos, mientras los lípidos sanos mantuvieron sus propiedades elásticas<sup>18</sup> (Figura 14).



**Figura 14. Dependencia con la frecuencia de las partes real y compleja del módulo complejo dilatacional para lípidos meibomiales para personas sanas y enfermas a 25°C.** Los rombos azules representan el modulo elástico, los cuadrados rojos el modulo viscoso y los triángulos verdes la  $\tan \phi$ . Del Lado izquierdo, los lípidos de personas sanas y del lado derecho los lípidos de personas enfermas. Para  $\tan \phi < 1$  las muestras son predominantemente elásticas, mientras que para  $\tan \phi > 1$  las propiedades son dominadas por la viscosidad<sup>18</sup>.

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar las propiedades interfaciales de los lípidos meibomiales de personas sanas y personas con alguna disfunción de las glándulas meibomiales, en el equilibrio, a través de isothermas de presión superficial/área y de manera dinámica no tan alejados del equilibrio, con la reología dilatacional interfacial.

## **2 Planteamiento del problema**

El síndrome del ojo seco es una de las enfermedades oftalmológicas más comunes. Se trata de una enfermedad multifactorial que resulta en la inestabilidad de la película lagrimal. De particular interés son los lípidos meibomiales los cuales constituyen la capa más externa de la película lagrimal, ya que han sido identificados como el determinante de sus propiedades viscoelásticas. Entender las diferencias en las propiedades viscoelásticas de los lípidos meibomiales entre personas sanas y personas con síndrome del ojo seco podrían ser herramientas útiles para diagnóstico así como para el desarrollo de posibles tratamientos.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Caracterizar las propiedades interfaciales de películas de lípidos meibomiales de personas sanas y pacientes diagnosticados con síndrome de ojo seco en interfaces aire-agua.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Obtener isotermas de presión superficial/área para los lípidos meibomiales.
- Determinar las propiedades reológicas dilatacionales de los lípidos meibomiales en un barrido de frecuencias, usando el método de oscilación de la gota pendiente.

## **4 Materiales y métodos**

### **4.1 Obtención de lípidos meibomiales**

El instituto de oftalmología Fundación Conde de Valenciana se encargó de reclutar un total de 19 sujetos, así como de hacer la recolección de los lípidos meibomiales. Los sujetos fueron sometidos a pruebas diagnósticas para valorar el estado de la superficie ocular, entre las que se encuentran: 1) Test de calidad de vida OSDI, 2) Tiempo de rotura de la película lagrimal TRPL, 3) Test de Schirmer, 4) Tinción ocular, 5) Evaluación del menisco lagrimal, 6) Análisis de la morfología palpebral y de la secreción de las glándulas de meibomio (Tablas 2 y 3). El grupo de casos consta de 10 pacientes con disfunción de las glándulas meibomiales, siguiendo la clasificación del International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction (IWMGD), con datos clínicos incluyendo anomalías del margen palpebral, obstrucción del orificio de salida de glándulas de meibomiales y mala calidad de secreción, además de síntomas clínicos como prurito, malestar ocular, lagrimeo y fotofobia. Se excluyeron a sujetos con alguna patología ocular o sistémica previa, sujetos con historia de infección ocular activa, conjuntivitis alérgica, enfermedades autoinmunes, usuarios de lentes de contacto, antecedente de uso de medicamentos tópicos, glaucoma y cirugía ocular previa. Asimismo, se excluyeron a mujeres embarazadas o en periodo de lactancia. Los sujetos control fueron individuos sanos sin antecedente de cirugías o patologías oculares ni historia de uso de medicamentos oftalmológicos tópicos. El protocolo aquí descrito se llevó a cabo siguiendo las normas de la declaración de Helsinki, fue aprobado por el comité de ética del Instituto de oftalmología Fundación Conde de Valenciana, y fue realizado con el consentimiento informado de todos los participantes.

Tabla 2. Resultados de los estudios clínicos de las personas sanas (controles).

Pacientes	Edad	Género	OJO SECO		FUNCION GLANDULAR		EVAPORACION		INDICE VOLUMETRICO		TINCION OCULAR
			Puntuación OSDI	Resultado OSDI	Morfología Palpebral	Secreción De las glándulas de meibomio	TRPL'	Índice de protección ocular	Schirmer 1'	Menisco Lagrimal (mm)	Oxford
Control 1	26	M	10	Normal	Normal	Oleosa	9	3	16	1	0
Control 2	45	M	0	Normal	Normal	Oleosa	12	2.85	11	1.2	0
Control 3	27	M	12	Normal	Normal	Oleosa	12	2.85	10	1.3	0
Control 4	40	M	11	Normal	Normal	Oleosa	10	1.75	11	1	0
Control 5	31	M	6.25	Normal	Normal	Oleosa	9	1.5	10	1	0
Control 6	45	F	4	Normal	Normal	Oleosa	9	1.5	11	1.2	0
Control 7	55	F	8	Normal	Normal	Oleosa	10	1.5	10	1	0
Control 8	50	F	10	Normal	Normal	Oleosa	11	2	11	1.2	0
Control 9	52	F	5	Normal	Normal	Oleosa	11	1.2	11	1	0
Control 10	61	F	12	Normal	Normal	Oleosa	9	1.5	12	1.3	0

Tabla 3. Resultados de los estudios clínicos de los pacientes con ojo seco (casos).

Pacientes	Edad	Género	OJO SECO		FUNCION GLANDULAR		EVAPORACION		INDICE VOLUMETRICO		TINCION OCULAR
			Puntuación OSDI	Resultado OSDI	Morfología Palpebral	Secreción De las glándulas de meibomio	TRPL'	Índice de protección ocular	Schirmer 1'	Menisco Lagrimal (mm)	Oxford
Caso 1	85	F	25	Leve	Normal	Pastosa	5	1.33	8	0.2	I
Caso 2	18	F	13	Leve	Normal	Pastosa	6	1.18	9	0.2	0
Caso 3	45	M	50	Severo	Normal	Espesa	3	0.2	8	0.5	II
Caso 4	27	M	31.2	Moderado	Normal	Espesa	8	1.06	9	0.3	I
Caso 5	45	M	58	Severo	Normal	Espesa	5	0.83	9	0.4	II
Caso 6	68	M	20	Leve	Normal	Pastosa	8	1.6	9	0.5	I
Caso 7	53	F	40	Severo	Normal	Pastosa	3	0.6	8	0.5	II
Caso 8	65	M	15	Leve	Normal	Espesa	7	1.16	10	0.6	I
Caso 9	20	F	27	Moderado	Normal	Espesa	10	2	8	0.5	0
Caso 10	67	M	56	Severo	Normal	Pastosa	5	0.83	9	0.5	I

Para la recolección de las muestras de lípidos meibomiales, los 4 párpados de cada individuo fueron presionados utilizando un hisopo de algodón lo cual resulto en la extrusión de los lípidos meibomiales por los orificios de las glándulas de meibomio, la secreción fue removida pasando una espátula de platino (Figura 15). Aproximadamente 1 mg de secreción lipídica fue recolectada por cada individuo, la cual fue inmediatamente transferida a un vial con 1 ml de cloroformo. Los viales fueron guardados a -80 °C para su preservación y posterior transporte.



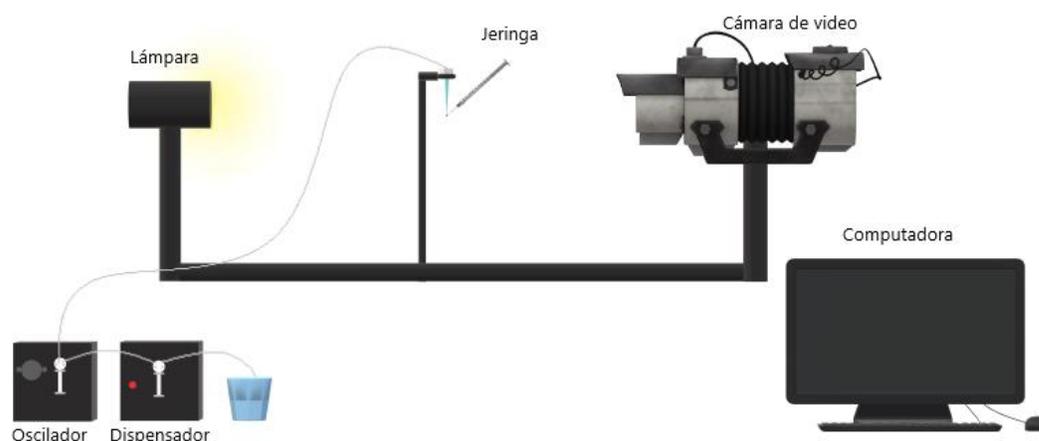
**Figura 15.Extracción de lípidos meibomiales de humano<sup>53</sup>.**

Previo a la realización de los experimentos con lípidos meibomiales estos fueron pesados, para lo cual fue necesario evaporar el cloroformo por medio de vacío, una vez hecho esto fueron resuspendidos en 1 ml de cloroformo y guardados a -80 °C hasta su uso.

## **4.2 Método de la gota pendiente**

Se utilizó el goniómetro y tensiómetro (ramé-hart 295) con el software DROPimage Advanced en el modo de gota pendiente para las isotermas de  $\pi/A$  y los experimentos de reología interfacial dilatacional.

Una gota de agua destilada y descarbonatada se formó en el extremo inferior de una punta desechable para pipeta, la cual fue previamente tratada como se describe más adelante, la cual se unió a una punta de teflón que a su vez está conectada por medio de mangueras a un sistema de dispensación automática y a un oscilador (Figura 16). Los lípidos fueron añadidos manualmente a la superficie de la gota con una jeringa de vidrio (Hamilton), para formar una capa. Se dejaron pasar 5 minutos para que el cloroformo en el que están disueltos los lípidos se evaporara, y para que estos se distribuyeran uniformemente. Una vez formada la película, se ajustó la presión superficial a 25 mN/m para homogeneizar todos los experimentos, finalmente la superficie se deformó alterando el volumen de la gota.



**Figura 16.** Esquema del montaje experimental para el método de la gota pendiente.

### 4.2.1 Reología interfacial dilatacional

En el caso de los experimentos de reología interfacial dilatacional las deformaciones se llevan a cabo por oscilaciones periódicas del volumen de la gota por una función de onda sinusoidal. Donde la frecuencia y la amplitud son controladas. En nuestros experimentos se eligieron 10 frecuencias en un rango de los 1.26 a los 21 rad/s, y se fijó una amplitud de ~2% respecto al área total de la gota. Tanto el módulo elástico ( $E'$ ) como el viscoso ( $E''$ ) fueron obtenidos para las muestras de lípidos meibomiales del grupo de los casos y del grupo de los controles.

### 4.2.2 Isotermas de presión superficial/área

En este caso, la gota se contrajo, disminuyendo su volumen de manera constante hasta que un volumen de aproximadamente 5  $\mu\text{l}$  es alcanzado, para luego aumentar el volumen hasta volver al volumen inicial, se midió la presión superficial como función del área.

### 4.3 Preparación de las puntas desechables

Las puntas fueron lavadas con etanol y agua destilada. Se dejaron secar para después darles un tratamiento con plasma, con el fin de remover residuos orgánicos y aumentar los grupos hidroxilos incrementando así la adhesión de las cadenas de silanos. Las puntas fueron transferidas a un desecador para vacío colocado dentro de una campana de extracción. 20  $\mu\text{l}$  de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl-triclorosilano fueron depositados en un cubreobjetos en el centro del

desecador. Las puntas fueron colocadas alrededor del cubreobjetos evitando el contacto entre ellas. Se retiraron del vacío para ser incubadas 60 °C durante toda la noche. Por último se les dio un lavado con etanol y agua para remover los silanos remanentes. Se mantuvieron resguardadas del polvo hasta su uso.

#### **4.4 Isotermas de presión superficial/área con palangana de Langmuir**

La balanza de Langmuir fue llenada con agua destilada. En la superficie del agua se depositaron 50 µl de la muestra. Formando una gota de muestra en la punta de una jeringa de vidrio (Hamilton) se tocó la superficie del agua con la gota. Antes de iniciar los experimentos se esperaron 30 minutos para permitir que el cloroformo se evaporara. La película fue comprimida, reduciendo el área desplazando las barreras móviles a través de la superficie de la balanza. La compresión se llevó a cabo a una velocidad constante de 5 mm/min, mientras continuamente se monitoreaba la presión superficial, la cual fue medida utilizando el método de la placa de Wilhelmy.

### **4.5 Modelos teóricos**

#### **4.5.1 Isotherma de Frumkin**

Se utilizó la ecuación de Frumkin para describir los datos experimentales de  $\pi$  obtenidos de la palangana de Langmuir y del método de la gota pendiente.

$$\Pi = -RT\Gamma_{\infty}[\ln(1 - \theta) + a'(\theta)^2] \quad (10)$$

#### **4.5.2 Modelo de Lucassen-Tempel**

Los datos reológicos obtenidos por el método de la gota pendiente fueron ajustados con el modelo de Lucassen-Tempel. Una vez obtenida la relación de la tensión interfacial con la concentración a través de la ecuación de Frumkin, se calculó la elasticidad instantánea  $E_0$  conforme a la ecuación 20 en conjunción con la ecuación 10, dando como resultado la ecuación 22.

$$E_0 = \frac{d\Pi}{d\ln\Gamma} = -\Gamma \frac{d\Pi}{d\Gamma} \quad (20)$$

$$E_0 = \frac{RT}{\Gamma_\infty} \left( \frac{\theta}{1-\theta} - 2a'\theta^2 \right) \quad (22)$$

Por último se calcularon los módulos elásticos y viscosos usando las ecuaciones 18 y 19

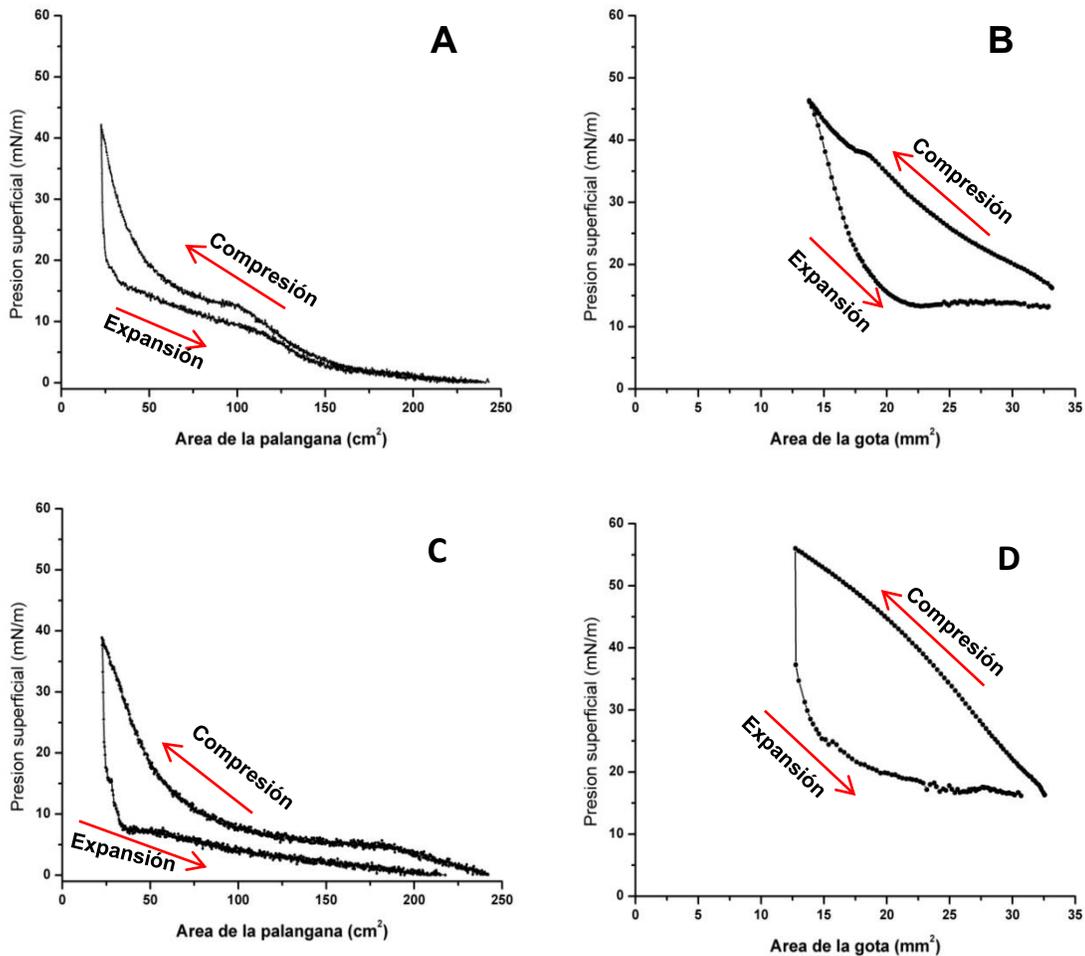
$$E' = E_0 \frac{1 + \xi}{1 + 2\xi + 2\xi^2} \quad (22)$$

$$E'' = E_0 \frac{\xi}{1 + 2\xi + 2\xi^2} \quad (23)$$

## 5 Resultados

### 5.1 Isotermas $\pi/A$

Las isotermas obtenidas para los lípidos meibomiales, específicamente control 8 y caso 10, se muestran a continuación (Figura 17).

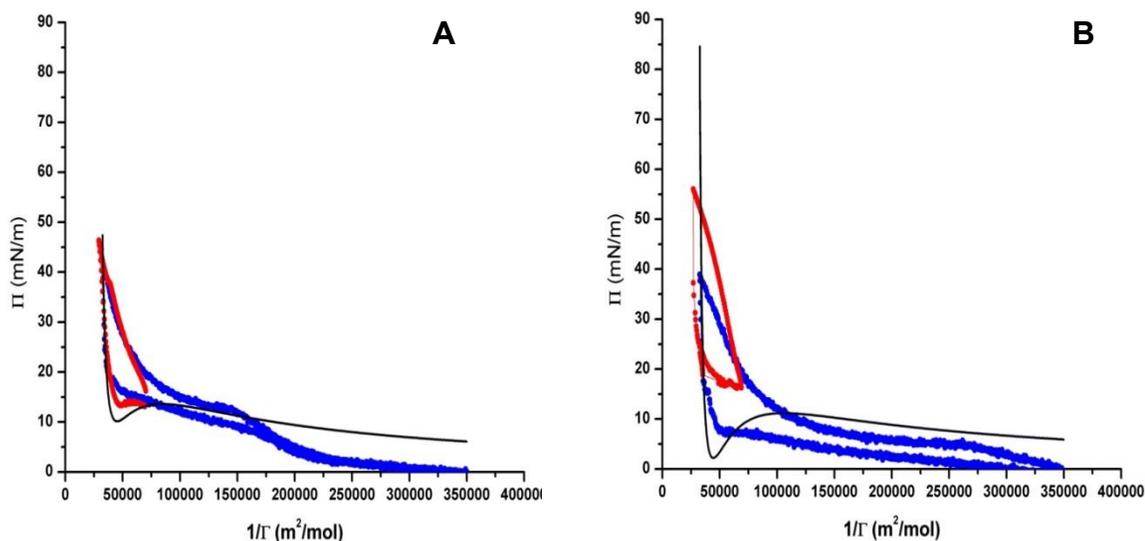


**Figura 17. Isotermas  $\pi/A$  de los lípidos meibomiales.** En A y B se muestran las curvas obtenidas para el control 8, siendo A la curva realizada en la palangana de Langmuir y B la realizada con el método de la gota pendiente. C y D son las curvas del caso 10, realizadas con la palangana de Langmuir y el método de la gota pendiente, respectivamente.

Durante la compresión, todas las isotermas mostraron un aumento continuo de la presión superficial a medida que el área se reducía, aunque en la isoterma del Control 8 (Figura 17a) se pueden observar inflexiones. Las curvas de expansión exhibieron histéresis. Se realizaron varios ciclos de compresión-expansión y se

obtuvieron comportamientos similares entre las diferentes curvas. En ninguna de las curvas se puede contemplar el colapso de las películas de lípidos. Las isothermas obtenidas por ambos métodos fueron similares mas no completamente iguales, sin embargo, las isothermas con el método de la gota pendiente alcanzaron presiones superficiales máximas de entre 45-55 mN/m, resultando más altas que las obtenidas con la otra metodología.

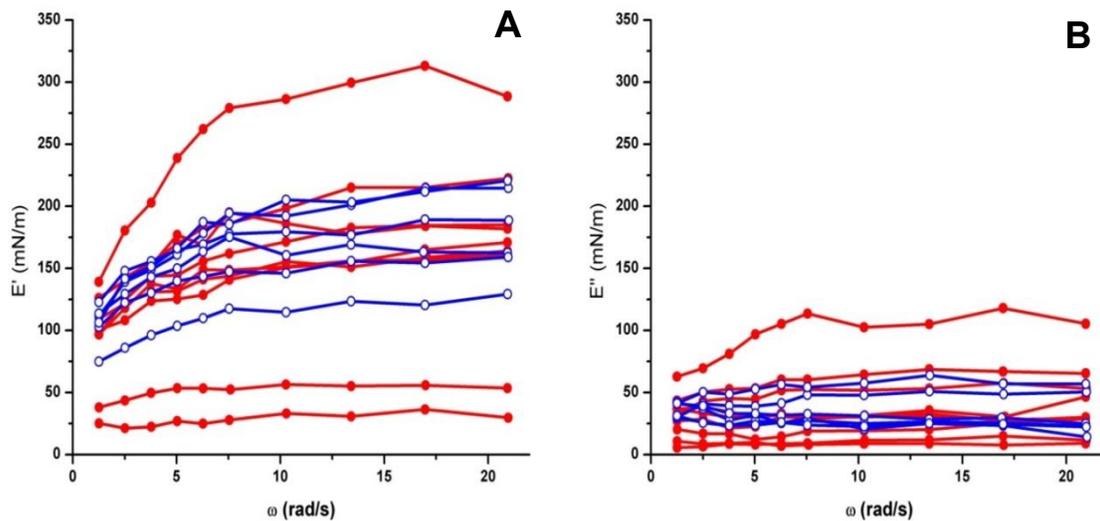
Como una primera aproximación se utilizó la isoterma de Frumkin para describir los datos experimentales obtenidos (Figura 19).



**Figura 18. Isothermas de adsorción.** A la izquierda control 8, a la derecha caso 10. En azul se muestran los resultados obtenidos de la palangana de Langmuir con el plato de Wilhelmy, en rojo los resultados por el método de la gota pendiente y la línea negra continua representa el ajuste con la isoterma de Frumkin.

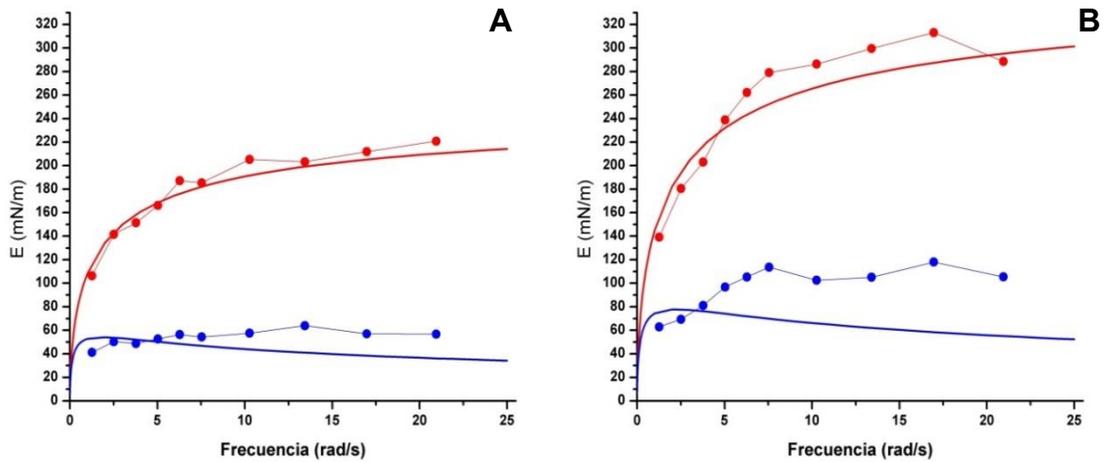
## 5.2 Propiedades reológicas dilatacionales interfaciales de los lípidos meibomiales

Los resultados de los experimentos de reología interfacial (Figura 18) indican que, en la mayoría de los casos y controles el modulo elástico fue más dominante que el modulo viscoso sobre todo el rango de frecuencias. Se puede observar como los módulos de casos y controles se distribuyen en una área de presiones superficiales de entre ~70 mN/m y 200 mN/m para el modulo  $E'$ , y entre ~20 mN/m y ~50 mN/m para el modulo  $E''$ , 3 de los casos (caso 2,5 y 10) se encuentran fuera de estas regiones.



**Figura 19. Propiedades reológicas de lípidos meibomiales de personas sanas y personas con disfunciones de las glándulas de meibomio.** En A se muestra el modulo elástico  $E'$  de cada caso (Círculo sólido rojo) y control (Círculo azul sin relleno) estudiado a diferentes frecuencias. En B, el modulo viscoso  $E''$  de casos y controles a diferentes frecuencias. Cada punto representa la media aritmética de 3 repeticiones realizadas.

Los datos de reología dilatacional interfacial obtenidos por el método de la gota pendiente fueron ajustados al modelo de Lucassen Tempel (Figura 20).



**Figura 20.** Datos del módulo elástico  $E'$  y módulo viscoso  $E''$  ajustados al modelo de Lucassen-Tempel. A la izquierda, los resultados obtenidos para el módulo elástico  $E'$  y para el módulo viscoso  $E''$  para el control 8. A la derecha, los resultados obtenidos para el módulo elástico  $E'$  y para el módulo viscoso  $E''$  para el caso 10. Los círculos sólidos rojos representan  $E'$ , los círculos sólidos azules son los valores de  $E''$ , la línea roja continua es el ajuste al modelo de Lucassen-Tempel para  $E'$  y la línea azul continua representan la el ajuste al modelo de Lucassen-Tempel para  $E''$ .

## 6 Discusión

### 6.1 Isotermas de presión superficial/Área

De las isotermas presión superficial/área realizadas de los lípidos meibomiales tanto de personas sanas como de personas con disfunciones de las glándulas meibomiales, podemos inferir de manera general que, los lípidos resultaron bastante compresibles y no colapsaron a altas presiones superficiales, en los ciclos de expansión mostraron histéresis, y durante ciclos sucesivos de compresión-expansión las curvas siguieron comportamientos similares en las repeticiones, información que coincide con datos publicados previamente<sup>18,32,36,43</sup>. Se sugiere que estas propiedades son debidas a la interacción que se da entre los componentes del meibum en la interface. Como se señaló anteriormente la compresión de las capas lipídicas genera el rearrreglo de las moléculas en la interface, lo cual ha sido verificado para el caso de películas de lípidos meibomiales a través de los resultados obtenidos por microscopia de ángulo de Brewster<sup>18,32,35</sup>. A presiones superficiales muy bajas los lípidos meibomiales no forman monocapas, si no que se pueden encontrar regiones gruesas con lípidos agregados y otras con capas delgadas de lípidos, probablemente de una molécula de ancho, a medida que la presión superficial aumenta estas regiones delgadas desaparecen<sup>18</sup>. Esta formación reversible de multicapas podría ser la causa de falta de colapso de las películas de lípidos meibomiales<sup>43</sup>. Cambios en la composición de las lípidos podría provocar películas de lípidos meibomiales que colapsan<sup>43</sup>, esto no se ha reportado en estudios clínicos, lo cual se corrobora con las isotermas que realizamos de lípidos meibomiales de pacientes enfermos los cuales tampoco mostraron colapso, coincidiendo con lo visto por Georgiev et al, por lo que capas de lípidos meibomiales se adaptan a cambios en la composición. Las capas de lípidos meibomiales sufren diferencias en la organización de las moléculas durante la compresión, y desorganización de las moléculas durante la expansión, debido a que las estructuras formadas durante la compresión no regresan a su estado original una vez llevada a cabo la expansión, se provoca la histéresis<sup>44</sup>. Además el hecho de que las curvas sigan caminos similares después

de los ciclos de compresión expansión sugiere que se trata de una capa estable<sup>45</sup>. In vivo la capa lipídica está sometida a diferentes tipos de deformaciones y sujeta a grandes presiones superficiales, por ejemplo durante el parpadeo, por lo que el conjunto de estas propiedades serían las responsables de mantener la estabilidad de la capa lipídica.

En nuestros resultados observamos diferencias entre las isothermas del caso y el control usando la palangana de Langmuir, la curva del control presento irregularidades, lo que sugiere una coexistencia de fases durante la compresión. Mugdil & Millar observaron discontinuidades en las isothermas de lípidos meibomiales de personas sanas a 20 °C<sup>43</sup>, mientras que Georgiev et al compararon lípidos de gente sana y pacientes enfermos no reportaron cambios de fase<sup>18</sup>. Es importante mencionar que la forma de las isothermas cambia con la velocidad de compresión, de ahí las diferencias entre las distintas isothermas reportadas. Las isothermas  $\pi/A$  fueron realizadas solo una vez para un caso y un control (caso 10 y control 8), por lo que más repeticiones son necesarias a fin de que podamos corroborar lo observado.

Además de las isothermas realizadas con la palangana de langmuir se obtuvieron isothermas por el método de la gota pendiente, esta técnica ha sido solo utilizada para el análisis de meibum de bovino por Miano et al. A nuestro conocimiento este es el primer reporte de isothermas de lípidos humanos por esta técnica. La ventaja de usar esta técnica es que nos permitió utilizar poca muestra, teniendo en cuenta que la cantidad de meibum que se puede obtener de una sola persona es muy baja. Usualmente en los análisis de lípidos meibomiales se recolectan muestras de diversas personas y se juntan con el fin de tener más muestra disponible para los experimentos. Los datos que nosotros obtuvimos corresponden a los lípidos extraídos de una sola persona, por lo que podríamos relacionar los datos obtenidos con la información clínica que se tiene para cada caso y control. Asimismo esta técnica, nos permitió alcanzar presiones superficiales más altas que con la palangana de Langmuir. Si bien la técnica de la gota pendiente ha sido adaptada para medir presión superficial, encontrando una excelente

correspondencia entre este método y de la palangana de Langmuir<sup>8</sup>, en nuestros experimentos los resultados de la palangana y de la gota pendiente fueron similares mas no completamente iguales, por lo que es necesario realizar más experimentos.

Para el ajuste de los datos por la isoterma de Frumkin, cuando  $a'$  tiene un valor de cero se convierte en la isoterma de Langmuir, usando esa aproximación obtuvo poca convergencia con los datos experimentales. Un mejor ajuste es obtenido cuando  $a' > 0$ , lo que nos sugiere que existen interacciones entre las moléculas adsorbidas.

## 6.2 Reología interfacial

Todos nuestros experimentos de reología interfacial fueron realizados a una presión superficial de 25 mN/m con el fin de tener consistencia en nuestros resultados. Si bien se desconoce la presión superficial de los lípidos en los ojos, a  $\pi > 18$  mN/m las películas de lípidos meibomiales adoptan por completo una estructura de multicapa<sup>18</sup>, y se sugiere que podrían ser las multicapas características de la capa lipídica in vivo<sup>48</sup>. La concentración del meibum humano se aproximó a 1 mg/ml por la dificultad en la obtención y la poca cantidad que se extrae, pero se conoce que las capas lipídicas formadas de diferentes cantidades de meibum son funcionalmente similares al comprimirse para alcanzar presiones superficiales comparables, según los experimentos de Butovich et al<sup>31</sup>.

Los resultados de este trabajo indican que, in vitro en un rango de frecuencias de 1.26 a los 21 rad/s, los lípidos meibomiales en una interface aire-liquido sometidos a deformaciones dilatacionales tuvieron un comportamiento elástico. Indicando que las películas lipídicas eran más parecidas a sólidos suaves que a fluidos. Coincidiendo con los resultados obtenidos por Raju et al. usando también el método de la gota pendiente<sup>30</sup>, los de Leiske et al. donde los lípidos fueron sometidos a una deformación del tipo cizalla<sup>32</sup>, y los de Georgiev et al. donde los lípidos de personas sanas y personas con deficiencias de las glándulas meibomiales fueron sometidos a deformaciones del tipo dilatacional. En este último estudio, estudiaron frecuencias de  $10^{-5}$  a 1 Hz. La principal diferencia que

encontraron fue que a frecuencias muy bajas de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  Hz, los lípidos de personas enfermas tuvieron un comportamiento dominado por el modulo viscoso<sup>18</sup>. La diferencia de frecuencias entre los experimentos seria la causa de que nosotros no encontráramos esta diferencia entre personas sanas y enfermas.

Las deficiencias de las glándulas meibomiales pueden tener diversas causas, por ejemplo una infección, y las muestras colectadas provienen de personas cuyo origen de la enfermedad es diferente, por lo que se podría buscar relación entre los casos 2, 5 y 10; y alguna causa en particular.

Los datos obtenidos para el modulo elástico y viscoso fueron ajustados al modelo de Lucassen-Tempel. Se mostró un de proceso de relajación evidente, ya que se encontraron valores de la difusión de las moléculas adsorbidas en la interfaz, para el control de  $1.50 \times 10^{-8}$  m<sup>2</sup>/s, y de  $9 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s para el caso. Siendo esta la principal diferencia observada a través de este modelo.

## 7 Conclusiones y perspectivas

Este trabajo de tesis nos permitió estudiar las propiedades interfaciales de los lípidos meibomiales de personas sanas (controles) y personas sufriendo de alguna afección de las glándulas meibomiales (casos). Encontramos diferencias entre las isothermas  $\pi/A$  del control 8 y el caso 10, en el control se observa una protuberancia lo que nos sugiere una coexistencia de fases en esta película lipídica, se pretende realizar un número más grande de repeticiones para poder establecer una diferencia significativa entre casos y controles, además teniendo en cuenta que la forma de estas isothermas cambia con la velocidad a la que se comprimen las películas lipídicas es necesario que estos experimentos se realicen también a diferentes velocidades, con el fin de ver el comportamiento de las películas lipídicas en distintas condiciones. Estamos a la espera de más muestras ya que para estos experimentos se necesita mucha cantidad de lípidos, en este sentido el método de la gota pendiente resulta ser más conveniente ya que para cada experimento se necesitaron solo 2  $\mu\text{l}$ , lo que nos permitió realizar más experimentos.

Con los experimentos de reología dilatacional interfacial encontramos que las películas lipídicas tanto de los controles como de los casos, tienen un comportamiento dominado por el módulo elástico, en las frecuencias estudiadas el módulo viscoso fue muy pequeño, por lo que se propone explorar frecuencias más bajas usando el método de la gota pendiente realizando experimentos de deformación-relajación. Adicionalmente se encontraron 3 casos (2, 5 y 10), los cuales podrían tener relación con alguna causa en particular del ojo seco, se buscara conectar la información que se obtiene de los pacientes con los resultados obtenidos. Se propone realizar experimentos con muestras de pacientes con alguna infección, antes, durante y después de su tratamiento, para ver si existen diferencias en sus propiedades reológicas.

Las técnicas aquí utilizadas son para el estudio de monocapas, y los lípidos meibomiales no forman si no multicapas, por lo que se proponen experimentos de reología de bulto. Los resultados obtenidos son herramientas para entender la

estructura de la capa lipídica en estados de salud y enfermedad, lo que resulta útil para diagnóstico así como para el desarrollo de posibles tratamientos.

## 8 Bibliografía

1. Butt, H., Graf, K., & Kappl, M. (2013). *Physics and chemistry of interfaces*.
2. McClements, D. J. (2016). *Food emulsions principles, practices, and techniques*. Boca Raton: CRC Press.
3. Yañez-Soto, B., Mannis, M. J., Schwab, I. R., Li, J. Y., Leonard, B. C., Abbott, N. L., & Murphy, C. J. (2014). Interfacial Phenomena and the Ocular Surface. *The Ocular Surface*, 12(3), 178-201.
4. Miano, F., Winlove, C., Lambusta, D., & Marletta, G. (2006). Viscoelastic properties of insoluble amphiphiles at the air/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296(1), 269-275.
5. Duchin, S. S., Kretzschmar, G., & Miller, R. (2005). *Dynamics of adsorption at liquid interfaces: Theory, experiment, application*. Amsterdam: Elsevier.
6. Ksv manual
7. Saad, S. M., & Neumann, A. W. (2016). Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA): An Outline. *Advances in Colloid and Interface Science*, 238, 62-65.
8. Adamson, A. W., & Gast, A. P. (1997). *Physical chemistry of surfaces*. New York: J. Wiley.
9. Myers, D. (1999). *Surfaces, interfaces and colloids: Principles and applications*. New York: Wiley-Vch.
10. Shaw, D. (1999). *Introduction to colloid and surface chemistry*. Oxford: Butterworth-Heinemannrworth.
11. Sandoval-Ibarra, F. D., López-Cervantes, J. L., & Gracia-Fadrique, J. (2015). Ecuación de Langmuir en líquidos simples y tensoactivos. *Educación Química*, 26(4), 308,311.
12. Daeer, W., Mahadeo, M., & Prenner, E. J. (2017). Applications of Brewster angle microscopy from biological materials to biological systems. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(10), 1749-1766.
13. Wilson, D. I. (2017). What is rheology? *Eye*, 32(2), 179-183.
14. Janmey, P. A., & Schliwa, M. (2008). Rheology. *Current biology : CB*, 18(15), R639-R641.
15. Pelipenko, J., Kristl, J., Rošic, R., Baumgartner, S., & Kocbek, P. (2012). Interfacial rheology: An overview of measuring techniques and its role in dispersions and electrospinning. *Acta Pharmaceutica*, 62(2), 123-140.
16. Freer, E. M., & Radke, C. J. (2004). Relaxation Of Asphaltenes At The Toluene/water Interface: Diffusion Exchange And Surface Rearrangement. *The Journal of Adhesion*, 80(6), 481-496.
17. Monteux, C., Fuller, G. G., & Bergeron, V. (2004). Shear and Dilational Surface Rheology of Oppositely Charged Polyelectrolyte/Surfactant Microgels Adsorbed at the Air–Water Interface. Influence on Foam Stability. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(42), 16473-16482.
18. Georgiev, G. A., Yokoi, N., Ivanova, S., Tonchev, V., Nencheva, Y., & Krastev, R. (2014). Surface relaxations as a tool to distinguish the dynamic interfacial

- properties of films formed by normal and diseased meibomian lipids. *Soft Matter*,10(30), 5579-5588.
19. Tsubota K., Tseng S.C., Nordlund M.L. (2002) Anatomy and Physiology of the Ocular Surface. In: Ocular Surface Disease Medical and Surgical Management. Springer, New York, NY.
  20. Svitova, T. F., & Lin, M. C. (2016). Dynamic interfacial properties of human tear-lipid films and their interactions with model-tear proteins in vitro. *Advances in Colloid and Interface Science*,233, 4-24.
  21. Dilly P.N. (1994) Structure and Function of the Tear Film. In: Sullivan D.A. (eds) Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 350. Springer, Boston, MA.
  22. Butovich, I. A. (2017). Meibomian glands, meibum, and meibogenesis. *Experimental Eye Research*,163, 2-16.
  23. Millar, T. J., & Schuett, B. S. (2015). The real reason for having a meibomian lipid layer covering the outer surface of the tear film – A review. *Experimental Eye Research*,137, 125-138. doi:10.1016/j.exer.2015.05.002
  24. Georgiev, G. A., Eftimov, P., & Yokoi, N. (2017). Structure-function relationship of tear film lipid layer: A contemporary perspective. *Experimental Eye Research*,163, 17-28. doi:10.1016/j.exer.2017.03.013
  25. Bron, A. J., Tomlinson, A., Foulks, G. N., Pepose, J. S., Baudouin, C., Geerling, G., . . . Lemp, M. A. (2014). Rethinking Dry Eye Disease: A Perspective on Clinical Implications. *The Ocular Surface*,12(2).
  26. King-Smith, P. E., Hinel, E. A., & Nichols, J. J. (2010). Application of a Novel Interferometric Method to Investigate the Relation between Lipid Layer Thickness and Tear Film Thinning. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*,51(5),
  27. Green-Church, K. B., Butovich, I., Willcox, M., Borchman, D., Paulsen, F., Barabino, S., & Glasgow, B. J. (2011). The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Tear Film Lipids and Lipid–Protein Interactions in Health and Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*,52(4), 1979.
  28. Cwiklik, L. (2016). Tear film lipid layer: A molecular level view. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*,1858(10), 2421-2430.
  29. McCulley J. P., Shine W. (1997). A compositional based model for the tear film lipid layer. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 95,79-93.
  30. Raju, S. R., Palaniappan, C. K., Ketelson, H. A., Davis, J. W., & Millar, T. J. (2013). Interfacial Dilatational Viscoelasticity of Human Meibomian Lipid Films. *Current Eye Research*,38(8), 817-824.
  31. Butovich, I. A., Arciniega, J. C., & Wojtowicz, J. C. (2010). Meibomian Lipid Films and the Impact of Temperature. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*,51(11), 5508.
  32. Leiske, D. L., Raju, S. R., Ketelson, H. A., Millar, T. J., & Fuller, G. G. (2010). The interfacial viscoelastic properties and structures of human and animal Meibomian lipids. *Experimental Eye Research*,90(5), 598-604.

33. Arita, R., Morishige, N., Shirakawa, R., Sato, Y., & Amano, S. (2015). Effects of Eyelid Warming Devices on Tear Film Parameters in Normal Subjects and Patients with Meibomian Gland Dysfunction. *The Ocular Surface*,13(4), 321-330.
34. Butovich, I. A. (2011). Lipidomics of human Meibomian gland secretions: Chemistry, biophysics, and physiological role of Meibomian lipids. *Progress in Lipid Research*,50(3), 278-301.
35. Kaercher, T., Hönig, D., & Möbius, D. (1994). Brewster angle microscopy. *International Ophthalmology*,17(6), 341-348.
36. Miano, F., Calcara, M., Millar, T., & Enea, V. (2005). Insertion of tear proteins into a meibomian lipids film. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,44(1), 49-55.
37. Tiffany J.M. (1994) Viscoelastic Properties of Human Tears and Polymer Solutions. In: Sullivan D.A. (eds) Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 350. Springer, Boston, MA.
38. Rosenfeld, L., Cerretani, C., Leiske, D. L., Toney, M. F., Radke, C. J., & Fuller, G. G. (2013). Structural and Rheological Properties of Meibomian Lipid. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*,54(4), 2720.
39. Braun, R. J. (2012). Dynamics of the Tear Film. *Annual Review of Fluid Mechanics*,44(1), 267-297.
40. Yokoi, N., Yamada, H., Mizukusa, Y., Bron, A. J., Tiffany, J. M., Kato, T., & Kinoshita, S. (2008). Rheology of Tear Film Lipid Layer Spread in Normal and Aqueous Tear-Deficient Dry Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*,49(12), 5319.
41. Leiske, D. L., Leiske, C. I., Leiske, D. R., Toney, M. F., Senchyna, M., Ketelson, H. A., . . . Fuller, G. G. (2017). Temperature-Induced Transitions in the Structure and Interfacial Rheology of Human Meibum. *Biophysical Journal*,113(11), 2575.
42. Svitova, T. F., & Lin, M. C. (2013). Racial Variations in Interfacial Behavior of Lipids Extracted From Worn Soft Contact Lenses. *Optometry and Vision Science*,90(12), 1361-1369.
43. Mudgil, P., & Millar, T. J. (2011). Surfactant Properties of Human Meibomian Lipids. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*,52(3), 1661. doi:10.1167/iovs.10-5445.
44. Girard-Egrot, A. P., & Blum, L. J. (n.d.). Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes. *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes Fundamental Biomedical Technologies*,23-74.
45. Sudheesh, S., Ahmad, J., & Singh, G. S. (2012). Hysteresis of Isotherms of Mixed Monolayers of N-Octadecyl-N'-phenylthiourea and Stearic Acid at Air/Water Interface. *ISRN Physical Chemistry*,2012, 1-6.
46. Li, J., Miller, R., & Möhwald, H. (1996). Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces. 1. Dynamics of adsorption of phospholipids at the chloroform/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*,114, 113-121.

47. Fainerman, V., Lucassen-Reynders, E., & Miller, R. (1998). Adsorption of surfactants and proteins at fluid interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 143(2-3), 141-165.
48. Leiske, D. L., Miller, C. E., Rosenfeld, L., Cerretani, C., Ayzner, A., Lin, B., . . . Fuller, G. G. (2012). Molecular Structure of Interfacial Human Meibum Films. *Langmuir*, 28(32), 11858-11865.
49. An introduction to interfaces & colloids the bridge to nanoscience.
50. Langevin, D. (2014). Rheology of Adsorbed Surfactant Monolayers at Fluid Surfaces. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 46(1), 47-65.
51. Valderrama, J. M. (2006). *Caracterización interfacial de proteínas y tensioactivos: Aplicación a dispersiones alimentarias* (Tesis doctoral). Universidad de Granada.
52. Tempel, M. V., & Lucassen-Reynders, E. (1983). Relaxation processes at fluid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 18(3-4), 281-301.
53. Blanco, D. C. (2018). Microevaporación no homogénea en modelos biofísicos (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
54. Lucassen, J., & Tempel, M. V. (1972). Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science*, 27(6), 1283-1291.
55. Mucic V. N. (2012). Thermodynamics, kinetics and rheology of surfactant adsorption layers at water/oil interfaces (Tesis doctoral). Max Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung Abteilung für Grenzflächen.
56. Estudio termodinámico de las interfaces (2009) (Química Física avanzadas, cuarto curso). Universidad de Valencia, departamento de Química Física.
57. Benmekhbi, M., Simon, S., & Sjöblom, J. (2014). Dynamic and Rheological Properties of Span 80 at Liquid–Liquid Interfaces. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 35(6), 765-776.