

Elasticidad de las membranas biológicas

L. Martínez-Balbuena

*Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora,
Apartado Postal 5-088, 83190 Hermosillo, Sonora, México.*

A. Maldonado-Arce

*Departamento de Física, Universidad de Sonora,
Apartado Postal 1626, Hermosillo, 83000 Sonora, México.*

E. Hernández-Zapata

*Departamento de Física, Matemáticas e Ingeniería, Universidad de Sonora,
H. Caborca, 83600 Sonora, México.*

Recibido el 28 de septiembre de 2009; aceptado el 24 de noviembre de 2009

En este artículo se presenta una revisión del conocimiento actual sobre las propiedades elásticas de las membranas de origen biológico. Bajo la hipótesis del mosaico fluido se considera a una bicapa de fosfolípido como la base estructural de una membrana biológica y se expone un modelo debido a Helfrich a partir del cual se obtiene una expresión para la energía elástica de una membrana. La energía libre queda completamente caracterizada por sus curvaturas locales principales y cuatro parámetros dependientes de la composición química de la membrana y de su entorno local. Así mismo, se expone la justificación teórica de un método experimental (que hace uso de micromanipulación con micropipetas) que permite medir la constante elástica de curvatura media de una membrana. Finalmente se describen algunas consecuencias físicas de estos conceptos, como la explicación de la transición de una fase lamelar a una esponja o la aparición de la interacción estérica entre membranas.

Descriptor: Energía libre de Helfrich; membranas biológicas; bicapas lipídicas; elasticidad de membranas.

In this article we review the present knowledge on the elastic properties of membranes of biological origin. Assuming the fluid mosaic hypothesis, we consider the phospholipid bilayer as the structural base of a biological membrane. We expose a model due to Helfrich which can be used to obtain an expression for the membrane elastic energy. The free energy is completely characterized by two local principal curvatures and four parameters that depend on the chemical composition of the membrane and its local environment. In addition we present the theoretical justification of an experimental method (the Micropipette Manipulation technique) that may be used to measure the membrane rigidity (the elastic constant that corresponds to the mean curvature of the membrane). Finally, we describe some physical consequences of these concepts, such as the explanation of the lamellar-sponge phase transition and the emergence of the steric interaction between membranes.

Keywords: Helfrich free energy; biological membrane; lipid bilayer; elasticity of membranes.

PACS: 87.16.dm; 87.16.dj; 02.40.Hw

1. Introducción

Las membranas biológicas son componentes primordiales de todos los organismos [1, 2]. Se trata de estructuras esencialmente formadas por una bicapa de fosfolípido con proteínas incorporadas, que están presentes en las células biológicas así como en los diferentes organelos.

Las membranas tienen diferentes funciones biológicas. Por una parte, aíslan a la célula misma y a ciertos organelos, como el núcleo celular, de su exterior. Pero además de servir como fronteras entre los espacios intra y extracelular o inter-extra organelo, las membranas también participan en otras funciones como el transporte activo, el encapsulamiento de sustancias, el soporte de canales iónicos y la estabilidad de la propia célula. Las membranas también juegan un papel esencial en procesos biológicos como la endocitosis, la exocitosis, la fusión celular y la formación de protuberancias [1, 2].

Análisis químicos y estudios biológicos han permitido conocer la composición química, así como ciertas funciones biológicas de las membranas. Sin embargo, existen aún pre-

guntas sin resolver en este campo de la Ciencia. Por ejemplo: ¿Cuáles son las propiedades físicas relevantes de las membranas biológicas? ¿Cómo dichas propiedades determinan o influyen la estructura y la función biológica de estos agregados? Entre las propiedades físicas que reciben especial atención en estos tiempos se encuentran las dinámicas, estructurales y mecánicas. En particular, entre las propiedades mecánicas destaca la elasticidad de las membranas, fenómeno que está relacionado de una manera apenas parcialmente conocida por el momento con fenómenos como la endocitosis y exocitosis, y que juega un papel relevante en la forma que adquieren algunos organelos en la célula (retículo endoplásmico, complejo de Golgi).

En este trabajo, nos proponemos comentar algunos conceptos importantes para entender ciertas propiedades elásticas de las membranas. Prestaremos especial atención a la teoría de Wolfgang Helfrich, científico alemán que llegó a la expresión utilizada actualmente para la energía elástica de una membrana.

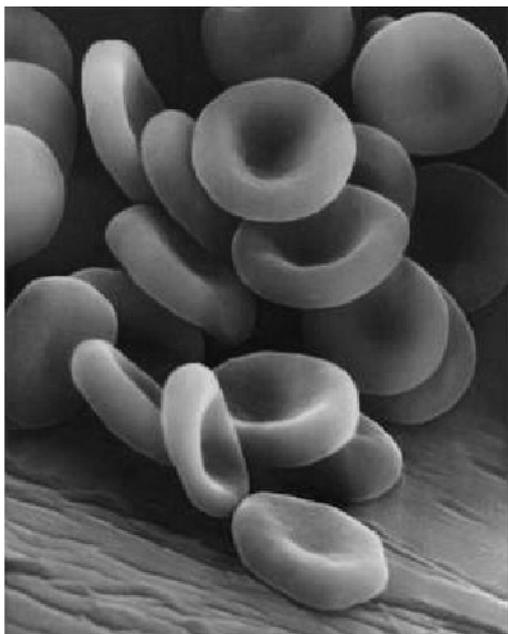


FIGURA 1. Forma que los glóbulos rojos adoptan en su estado natural. Note cómo la membrana que rodea a cada célula se tiene que curvar para adecuarse a la forma celular.

Históricamente, el estudio de las propiedades elásticas de membranas está relacionado con el problema de predecir teóricamente la forma de los glóbulos rojos (Fig. 1). Estas células, y por tanto la membrana que las rodea, tienen forma discoidal, con una concavidad característica en sus caras. En la búsqueda de entender el origen de esta estructura, en 1970 Canham [3] propuso un modelo en el que se considera constante tanto el área como el espesor de la membrana celular. En dicho modelo, los glóbulos rojos están caracterizados únicamente por su elasticidad respecto a la curvatura, es decir, mediante una energía elástica de curvatura que, por unidad de área, adquiere la siguiente forma:

$$f = \frac{1}{2}\kappa H^2, \quad (1)$$

donde κ representaba el módulo elástico de curvatura media de la membrana y H la curvatura media de ésta (ambas cantidades serán definidas en la Sec. 2). Veremos más adelante que esta expresión es parcialmente correcta. Sin embargo, este modelo conduce a formas no observadas en los glóbulos rojos [4].

En la misma década de los setentas, la comunidad de científicos de la materia condensada aprovechó las teorías relativamente maduras de la física de cristales líquidos termótropos para aplicarlas al estudio de membranas. Esto es posible debido a que localmente una membrana se comporta como una celda de cristal líquido nemático en alineamiento homeótropo; esto es, moléculas con forma de “rodillos” alineadas perpendicularmente al sustrato. En este tipo de materiales, las moléculas tienen un orden orientacional de largo alcance.

Aprovechando estos hechos, Helfrich utilizó la expresión para la densidad de energía libre de Frank para cristales líqui-

dos uniaxiales [5], considerando la normal a la membrana como el director del cristal líquido. Así, dedujo la energía de curvatura por unidad de área de una membrana [6]. La ecuación resultante, publicada en 1973, es llamada “energía libre de Helfrich” para membranas fluidas y es la base del análisis de las propiedades elásticas de las membranas. En este trabajo presentaremos una deducción alternativa de la energía de Helfrich y comentaremos algunas de sus consecuencias físicas.

Nuestro artículo está dividido de la siguiente manera. En la Sec. 1.1, se comentará brevemente la ubicación biológica, así como la estructura química de las membranas celulares. En la Sec. 2 se expone el modelo de Helfrich para biomembranas. En las secciones siguientes se exponen algunas de las consecuencias físicas de la elasticidad de curvatura: fluctuaciones térmicas de membranas (Sec. 3.2), métodos de medición de las constantes elásticas (Sec. 3.3), transformación de la fase lamelar a la fase esponja (Sec. 4.1) e interacciones estéricas entre membranas (Sec. 4.2). Finalmente, en la sección final damos algunas conclusiones del trabajo.

1.1. Agregados y bicapas lipídicas

Las membranas biológicas son estructuras muy complejas formadas por una gran variedad de moléculas: fosfolípidos, proteínas, etc. [1]. Estudios basados en microscopía electrónica y en el análisis de la composición química de biomembranas, así como estudios de propiedades físicas tales como la permeabilidad y la difusión de proteínas y de moléculas lipídicas en membranas, condujeron al desarrollo del llamado modelo del mosaico fluido. Este modelo, propuesto por S.J. Singer y G. Nicolson en 1972 [7], es el más aceptado para describir a las membranas biológicas. La estructura base de la membrana es una bicapa lipídica donde las moléculas individuales pueden moverse como en un líquido bidimensional. La bicapa lipídica es una mezcla de varias clases de moléculas, en particular fosfolípidos y glicolípidos, más otras moléculas pequeñas como colesterol. Las proteínas de membrana se encuentran incrustadas en la bicapa lipídica. La estructura de las membranas biológicas es posible debido a que los fosfolípidos pertenecen a un tipo especial de moléculas, llamadas “anfifílicas”, a la cual también pertenecen los surfactantes. Este nombre se debe a que una parte de la molécula (la cabeza polar) es soluble en agua, mientras que la otra parte (la cola hidrofóbica) es insoluble en dicho solvente. Así, cuando estas moléculas se disuelven en agua, las partes hidrofóbicas tienden a asociarse para evitar el contacto con el solvente, donde son insolubles, lo cual da lugar a la estructura en forma de bicapas (recordemos que el medio celular es esencialmente acuoso). Las proteínas que se pueden insertar en dicha bicapa, tienen segmentos hidrofóbicos que tampoco pueden solubilizarse en agua, los cuales se asocian con el centro hidrofóbico de la membrana. En la Fig. 2 se muestra de forma esquemática la estructura de una bicapa lipídica, así como la fórmula molecular de uno de los fosfolípidos más conocidos, de la familia de las fosfatidilcolinas.

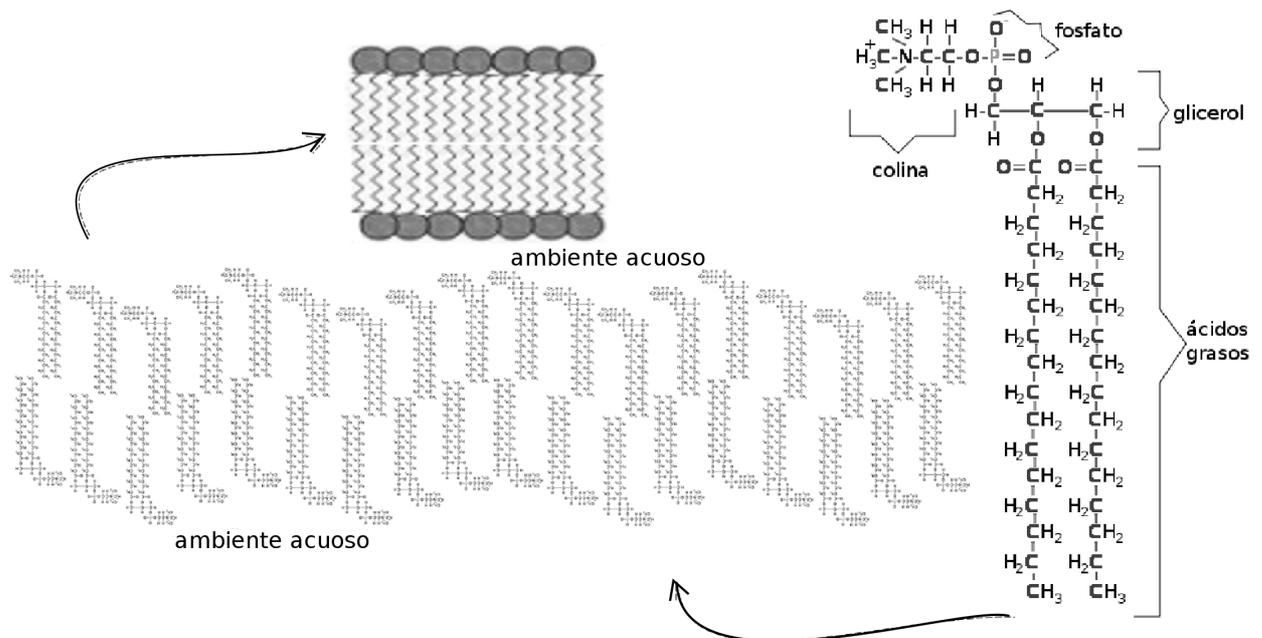


FIGURA 2. Una de las componentes principales de una membrana biológica es una matriz lipídica, en la cual, las colas hidrofóbicas de las moléculas de fosfolípido evitan el contacto con el agua. En la figura mostramos también la molécula de uno de los fosfolípidos más comunes, de la familia de la fosfatidilcolina.

Mediante diferentes técnicas experimentales, tales como la dispersión de radiación [8–10] y la microscopía electrónica [1], se ha podido determinar el espesor de una membrana formada por moléculas anfifílicas (alrededor de 50\AA). Dicho espesor experimental coincide bastante bien con lo esperado a partir de la longitud de las moléculas que forman las membranas.

Es importante subrayar que algunas propiedades físicas (mecánicas y termodinámicas) de las membranas de fosfolípido dependen crucialmente del tipo de lípido. Esto se refleja principalmente en la denominada temperatura de transición, T_m , de los fosfolípidos. Por debajo de esta temperatura, las moléculas del fosfolípido adquieren una estructura tipo gel (sólido amorfo bidimensional). Para temperaturas mayores que T_m , la membrana es fluida. Experimentos de calorimetría han mostrado cómo T_m depende de las características químicas de los lípidos [11]. Por ejemplo, para una cabeza polar dada (como fosfatidilcolina), T_m se incrementa conforme se incrementa el número de átomos de carbono en la cadena hidrofóbica. Esto se debe a que las cadenas de longitud grande magnifican el efecto hidrofóbico, dando como resultado mayor cohesión entre las moléculas que forman la membrana. De manera similar, la presencia de insaturaciones (dobles enlaces químicos) en las colas hidrofóbicas hace que T_m disminuya, efecto que depende también de la posición en que se presenta la insaturación [11]. Se ha observado también que la presencia de cierta asimetría entre las dos cadenas que forman la cola hidrofóbica de la molécula, hacen que T_m disminuya [11]. Esto tiene como consecuencia que los fosfolípidos más utilizados para preparar modelos experimentales de membranas biológicas sean aquellos con una cadena

saturada y otra insaturada, como es el caso del 1-estearoil-2-oleil-glicerol 3-fosfocolina (SOPC), o de mezclas como la lecitina de soya o huevo. Esto asegura que la temperatura de transición, T_m , esté siempre por debajo de la temperatura a la cual se llevan a cabo los experimentos.

Cabe señalar que las moléculas anfifílicas no solamente son capaces de formar las membranas biológicas, sino también otro tipo de estructuras. Cuando estas moléculas (ya sean fosfolípidos o surfactantes) se disuelven en agua, su característica dual en cuanto a la solubilidad hace que se puedan formar diferentes estructuras, como las micelas (agregados individuales que pueden ser esféricos o cilíndricos) o las bicapas. A su vez, las bicapas, que son la estructura básica de una membrana, pueden adoptar configuraciones en forma de vesículas (agregado esférico), fase lamelar (membranas paralelas), fase cúbica (membranas en arreglo periódico) o fases esponja (bicapas desordenadas pero conectadas). Una representación esquemática de algunas de estas fases se muestra en la Fig. 3.

Cada molécula particular presenta algunas de estas fases en diferentes condiciones fisicoquímicas: concentración, temperatura, aditivos, etc. Por otra parte, se han desarrollado algunos modelos teóricos que predicen la topología de los agregados. El más sencillo de dichos modelos, propuesto por Israelachvili [12], estipula que la forma del agregado está determinada por el llamado “parámetro de empaquetamiento”, el cual se relaciona con la geometría de la molécula. Según este modelo simple, la asociación de moléculas de forma cónica da lugar a un agregado con gran curvatura, como las micelas. En cambio, la asociación de moléculas relativamente cilíndricas da lugar a agregados con poca curvatura,

como las membranas. Este modelo permite explicar algunas transiciones observadas en las fases de moléculas anfifílicas. Por ejemplo, si se tiene un surfactante cargado que forme micelas esféricas, esto es debido a la forma efectivamente cónica de la molécula, magnificada por la repulsión electrostática entre cabezas polares. Al agregar sal al sistema, las interacciones electrostáticas se apantallan, lo cual tiene el efecto de disminuir el tamaño efectivo lateral de las cabezas polares, por lo que la molécula se asemeja más a un cilindro que a un cono. En estas condiciones, la teoría del parámetro de empaquetamiento predice que la estructura que forman dichas moléculas evoluciona de la forma micelar hacia la forma de membrana con el sólo hecho de agregar sal al sistema. Este efecto ha sido observado experimentalmente.

Sin embargo, hay otras transiciones que no han podido ser explicadas completamente mediante modelos geométricos tan sencillos. Una de ellas es la transición de la fase lamelar a la fase esponja (Fig. 3), donde membranas que tienen una configuración relativamente plana, adquieren una topología local en forma de silla de montar a caballo. Se trata de una transformación topológica de las membranas. Lo mismo puede decirse en cambios donde se pasa de una fase lamelar a una fase vesicular, mediante la adición de un polímero por ejemplo, lo cual también implica un cambio topológico. Veremos que este tipo de transformaciones se pueden entender en términos de la energía elástica de membranas, concepto que se discutirá en la siguiente sección.

2. Modelo de Helfrich

Algunas propiedades geométricas y termodinámicas de las bicapas anfifílicas pueden ser entendidas desde un punto de vista unificado considerando la energía libre asociada a sus deformaciones. El espesor tan pequeño de una membrana (50Å), al menos comparado con las dimensiones de una cé-

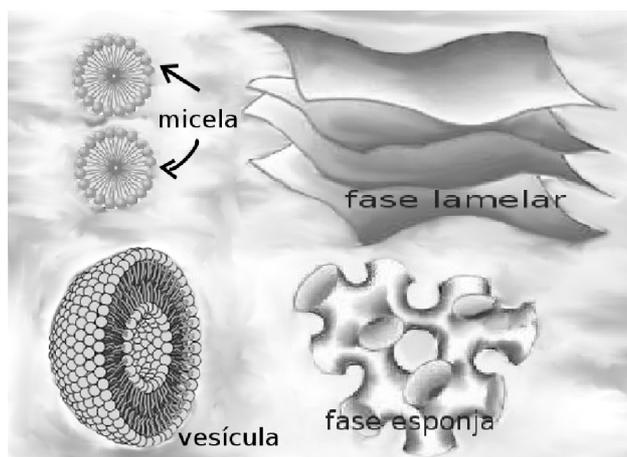


FIGURA 3. Representación de la estructura de algunas de las fases típicas formadas por moléculas anfifílicas. La estructura más sencilla es la micela. Por su parte, las membranas pueden ordenarse de maneras diferentes, tal como en la fase lamelar, en la esponja o en la vesicular.

lula (del orden de micras), permite aproximar a la bicapa como una superficie bidimensional inmersa en el solvente [13].

La membrana se encuentra sujeta a las fluctuaciones debidas a la energía térmica del solvente. Si suponemos que la bicapa se encuentra en equilibrio con la solución acuosa, entonces su energía está caracterizada por las deformaciones que la membrana puede sufrir:

- a) la compresión o expansión de la bicapa en la dirección lateral y
- b) las deformaciones en la dirección normal a la superficie (esto es, por la curvatura local de la superficie) [14].

Bajo estas condiciones, la energía libre (por molécula) asociada a la membrana, puede ser expresada como una función del área promedio de cada molécula, Σ , y de las curvaturas locales asociadas a la superficie.

Los conceptos matemáticos necesarios para llegar a la energía elástica de las membranas pertenecen a la Geometría Diferencial de Superficies, por lo que conviene repasar algunos conceptos básicos de dicho campo de la matemática.

2.1. Conceptos matemáticos previos

Considérese un plano P , perpendicular al plano tangente (en un punto cualquiera) a la superficie que representa a la membrana. A la intersección de la superficie con el plano P se le llama una “curva normal”. Esta curva normal puede ser una línea recta, sin curvatura, o puede poseer cierta curvatura, a la cual se le llama “curvatura normal”, c . Estos conceptos se ilustran en la Fig. 4. Para asociar un valor a la curvatura normal, notemos que una línea recta (por definición sin curvatura), puede verse como la circunferencia de un círculo de radio infinito. Esto sugiere definir a la curvatura como el inverso del radio de curvatura: $c = 1/R$. Como es de esperarse, para una línea recta $c = 0$, puesto que $R = \infty$. A la curvatura así definida se le asocia un signo para distinguir las dos posibles orientaciones de la curva: concavidad hacia un lado o concavidad hacia el otro, direcciones a las cuales se asigna arbitrariamente el signo positivo o negativo.

Notemos que, dado que el plano P se definió simplemente como perpendicular al plano tangente, existe una infinidad de

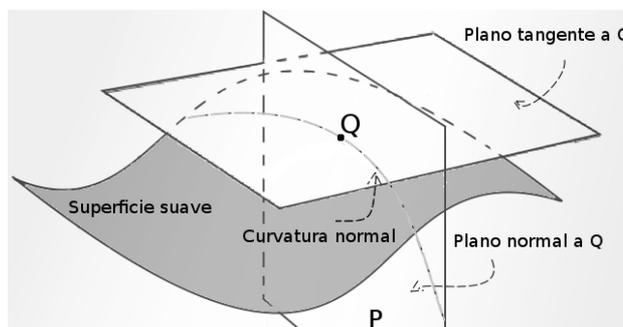


FIGURA 4. Ilustración de la curvatura normal al punto Q de una superficie.

posibles orientaciones para P . Dependiendo de dicha orientación, las diferentes curvas normales posibles tienen diferentes curvaturas. Sin embargo, puede demostrarse que hay dos direcciones particulares, perpendiculares entre sí, para las cuales la curvatura normal es un extremo (en un caso máximo y en el otro mínimo). Dichas curvaturas normales extremas son llamadas las “curvaturas principales” de la superficie y se denotan mediante los símbolos c_1 y c_2 . Todas las demás curvaturas normales en el mismo punto (así como la curvatura local de cualquier curva contenida en la superficie y que pase por dicho punto) pueden ser expresadas en términos de las dos curvaturas principales. En otras palabras, todas las deformaciones locales de la superficie en la dirección normal al plano tangente pueden ser caracterizadas a primer orden por las curvaturas principales c_1 y c_2 . Estos son los dos parámetros necesarios para caracterizar la curvatura de una membrana fluctuante.

Sin embargo, es más conveniente matemáticamente realizar un cambio de variable, de c_1 y c_2 , a dos combinaciones de ellas, la llamada “curvatura media”, $H = (c_1 + c_2)/2$, y la llamada “curvatura gaussiana”, $K = c_1 c_2$. H es el parámetro mencionado al comentar el modelo de Canham en la introducción [Ec. (1)]. De hecho, a segundo orden en las curvaturas principales, $|H|$ y K son las únicas cantidades invariantes ante cualquier parametrización de la superficie. Es importante señalar que, dado que tanto c_1 y c_2 tienen asociado un signo, el valor de H depende de la orientación elegida como positiva para la curvatura (cambiar la convención de signos, cambia el signo de H). El signo de K , por su parte, es independiente de esta elección. La Fig. 5 muestra algunas superficies con valores diferentes de las curvaturas media y gaussiana.

2.2. Derivación de la energía de Helfrich

Apliquemos ahora los conceptos geométricos antes mencionados a la descripción física de las bicapas lipídicas. La energía libre de la bicapa (por unidad de área), f , debe ser invariante bajo cualquier parametrización de la superficie, dado que es un concepto físico que no depende de la descripción matemática utilizada. Luego entonces, dicha energía debe ser una función de H y K .

En el equilibrio las bicapas pueden considerarse aproximadamente planas, al menos localmente; las deformaciones respecto a dicho estado están caracterizadas por curvaturas muy pequeñas; es decir, el radio de curvatura correspondiente es mucho mayor que el espesor de la bicapa. Esto permite desarrollar la función $f = f(H, K)$ mediante una serie de

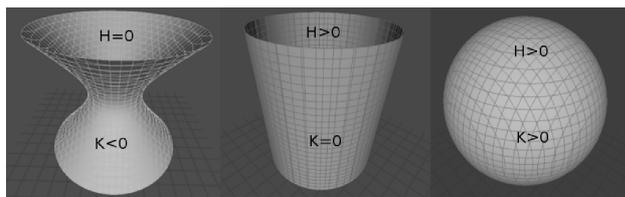


FIGURA 5. Superficies con distinta curvatura media y gaussiana.

Taylor (a segundo orden en las curvaturas c_1 y c_2):

$$f(H, K) \approx f_0 + f_1 H + f_2 H^2 + f_3 K, \quad (2)$$

donde las constantes f_0 , f_1 , f_2 y f_3 dependen en principio del área promedio por molécula; en particular, f_0 corresponde a la energía libre de una bicapa plana.

Nótese que el término lineal en H depende de la orientación de la superficie. Cuando las monocapas que forman la bicapa tienen la misma composición, no hay razón alguna para dicha dependencia en la orientación y, en tal caso, la constante f_1 debe ser cero. En general, sin embargo, existe la posibilidad de una asimetría entre las monocapas y es precisamente el término lineal en H el que toma en cuenta este efecto.

Completando el binomio cuadrado respecto a H , la Ec. (2) puede reescribirse como

$$f = f_2 \left(H + \frac{f_1}{2f_2} \right)^2 + \left(f_0 - \frac{f_1^2}{4f_2} \right) + f_3 K.$$

Si entonces definimos las cantidades

$$\sigma \equiv f_0 - \frac{f_1^2}{4f_2}, \quad \kappa \equiv 2f_2, \quad c_0 \equiv -\frac{f_1}{2f_2} \quad \text{y} \quad \bar{\kappa} \equiv f_3,$$

la energía libre por unidad de área de la bicapa toma la forma

$$f = \frac{1}{2} \kappa (H - c_0)^2 + \bar{\kappa} K + \sigma, \quad (3)$$

donde σ , κ , $\bar{\kappa}$ y c_0 son la tensión superficial, el módulo de curvatura media, el módulo de curvatura gaussiana y la curvatura espontánea de la membrana, respectivamente. Colectivamente esas variables son conocidas como los “parámetros de Helfrich”. Dichos parámetros son independientes de la forma geométrica de la membrana pero dependen en principio de su composición química.

La energía total de la bicapa (conocida como la energía de Helfrich) puede ser calculada integrando sobre el área total de la misma:

$$F = \int \left[\frac{1}{2} \kappa (H - c_0)^2 + \bar{\kappa} K + \sigma \right] dA. \quad (4)$$

Wolfgang Helfrich llegó a estas ecuaciones en 1973 en un afán de describir la elasticidad de las membranas biológicas [6]. La derivación original publicada ese año, se basa en una analogía con la energía libre para cristales líquidos propuesta por Frank [5]. Sin embargo, la forma en que aquí arribamos a tal relación fue desarrollada por Safran en 1994. Hemos elegido esta última derivación debido a la sencillez y elegancia.

Es importante notar que si no hay fuerzas externas que tensen la membrana, el área de la bicapa puede considerarse constante. Esto es así porque las colas hidrofóbicas de las moléculas de fosfolípido son casi totalmente insolubles en agua y están agrupadas de manera que el área por molécula se mantiene prácticamente constante. Modificar dicha área requiere de energías mayores a la necesaria para simplemente reacomodar las moléculas de la bicapa de modo que ésta

se curve. Por esta razón, en ausencia de fuerzas externas, el término de la energía de Helfrich que contiene la tensión superficial, σ , es una constante sin relevancia al momento de minimizar la energía respecto a las posibles deformaciones de la superficie. En la discusión subsiguiente ignoraremos este término, excepto cuando se mencione explícitamente lo contrario.

2.3. Significado físico de los parámetros en la energía de Helfrich

El significado de los parámetros de Helfrich puede entenderse sencillamente analizándolos por separado.

Para comentar la física que se desprende del módulo de curvatura media, κ , es conveniente empezar haciendo algunas observaciones acerca del término de la curvatura gaussiana, el segundo de la Ec. (3). El llamado teorema de Gauss-Bonnet [15] muestra que este término es una constante si la topología de la membrana no cambia. En efecto, este teorema estipula que para una superficie cerrada de topología fija, la integral de la curvatura gaussiana es una constante,

$$\int KdA = 4\pi (1 - p), \tag{5}$$

donde p denota el género de la superficie, concepto topológico que está relacionado con la cantidad de poros o perforaciones que tiene la superficie. Algunos ejemplos de superficies con distinto género se muestran en la Fig. 6. La conclusión principal del teorema de Gauss-Bonnet es que, al estudiar la estructura de mínima energía de membranas de topología fija, el término que involucra la curvatura gaussiana puede ser ignorado, pues es constante mientras la topología no cambie. En otras palabras, la energía de curvatura asociada al módulo gaussiano no cambia mientras la topología de la membrana sea la misma.

En esas condiciones, la energía elástica de Helfrich toma la forma de un potencial armónico

$$F = \frac{1}{2}\kappa \int (H - c_0)^2 dA$$

que depende de la curvatura media H en forma análoga a como la energía potencial de un resorte depende de su deforma-

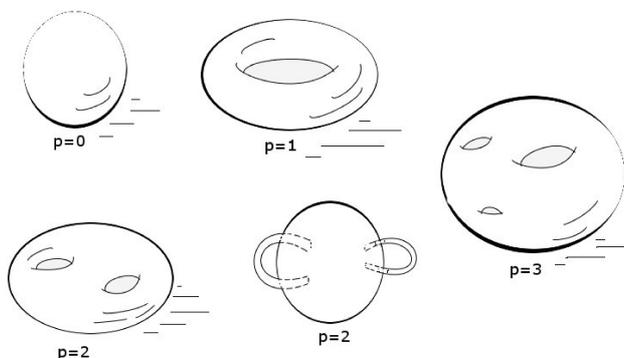


FIGURA 6. Superficies con distinta topología.

ción. Entonces, el módulo de curvatura media, κ , es análogo a la constante de rigidez de un resorte, y puede interpretarse como una constante de rigidez (ante deformaciones de curvatura) de la membrana. Cuando κ tiene valores pequeños, la membrana es flexible; cuando κ asume valores grandes, la membrana es rígida. Entonces, el término de curvatura media está relacionado con las fluctuaciones de forma u ondulaciones (sin cambio topológico) que experimenta la membrana por efectos de la energía térmica del solvente.

Por su parte, la curvatura espontánea c_0 es la curvatura media que adquiere la bicapa cuando está libre de tensión, jugando un papel análogo al de la longitud de equilibrio en el caso del resorte. Hicimos notar anteriormente que para monocapas idénticas la constante f_1 de la Ec. (2) debe ser cero y, por tanto, c_0 debe ser nula también. Es claro entonces que la curvatura espontánea está asociada a la asimetría de las monocapas que forman la bicapa. Esta curvatura es debida al hecho de que en general las monocapas se forman por distintas moléculas anfifílicas ocasionando que las bicapas tiendan a curvarse espontáneamente hacia alguno de sus lados cuando dos de estas monocapas se superponen. Por supuesto que cuando la bicapa está formada por un solo tipo de moléculas, no existe curvatura espontánea y el estado de equilibrio tiende a ser el de una membrana plana. En resumen podemos decir que la Ec. (3) establece que cuando no hay cambios de topología en el sistema la curvatura media que minimiza la energía libre corresponde a la curvatura espontánea. El radio de equilibrio de la membrana es $R_0 = 1/c_0$.

Finalmente, para tener una idea del significado físico del módulo de curvatura gaussiana, $\bar{\kappa}$, imaginemos una bicapa formada por monocapas idénticas ($c_0 = 0$) que puede cambiar de topología. El término de la curvatura media,

$$F = \frac{1}{2}\kappa \int H^2 dA,$$

es mínimo para una superficie con $H = 0$, que puede ser un plano pero también una superficie localmente de tipo “silla de montar” (Ver Fig. 5).

Puede ahora notarse que el término de la curvatura gaussiana,

$$\int \bar{\kappa} K dA,$$

favorece superficies con distintas topologías, dependiendo del valor del módulo elástico gaussiano. En efecto, cuando $\bar{\kappa} \geq 0$, la energía relacionada con el término gaussiano se minimiza si los radios de las curvaturas principales tienen diferente signo, es decir, si la curvatura gaussiana es negativa, como en el caso de superficies tipo “silla de montar”, prevalentes en las fases esponja y cúbicas. Por otra parte, cuando $\bar{\kappa} \leq 0$, el término gaussiano favorece superficies de curvatura gaussiana positiva (radios de curvatura en la misma dirección), contribuyendo a la estabilidad de agregados cerrados tales como vesículas.

Esta breve discusión nos permite vislumbrar el tipo de fenómenos físicos que afectan a una membrana y que pueden

ser descritos con la Ec. (3): forma de equilibrio, fluctuaciones térmicas y cambios de topología. Por esta razón, la energía de Helfrich ha sido utilizada en una gran cantidad de trabajos que describen algunas propiedades físicas de las membranas. De hecho, la posibilidad de calcular la energía libre de una bicapa ha permitido modelar sistemas biológicos reales como el aparato de Golgi [16] o la forma discoidal de los glóbulos rojos [4, 17]. La forma en que se usa la relación (3) en los distintos modelos consiste en sumar las diferentes contribuciones energéticas para después minimizar la energía total a fin de obtener información sobre la forma o las fluctuaciones del sistema. En la siguiente sección veremos una forma matemáticamente conveniente de expresar las fluctuaciones de una membrana.

3. Medición experimental de la constante de curvatura media

Existen algunas maneras de medir el módulo de curvatura media κ de una membrana. En los diferentes métodos se aprovecha el hecho de que valores diferentes de κ hacen que la membrana sea más o menos flexible y por lo tanto tenga diferente susceptibilidad a las fluctuaciones térmicas del solvente. Así, una membrana muy flexible fluctúa más que una membrana rígida, lo cual ocasiona consecuencias medibles en varios fenómenos físicos. Por ejemplo, la dispersión de radiación (luz, rayos X o neutrones) es diferente si la membrana es flexible o si es rígida. De igual forma, cuando una vesícula gigante es aspirada con una micropipeta, el cambio aparente en su área es diferente, dependiendo de si la membrana que la forma es flexible o no. Analizaremos este último experimento con más detalle en la siguiente sección para mostrar una manera de medir κ . Para ello, primeramente derivamos algunas expresiones matemáticas para las fluctuaciones de una membrana.

3.1. Energía de Helfrich en la parametrización de Monge

Por simplicidad, vamos a analizar el caso de una membrana que en promedio se encuentra horizontal respecto a un plano de referencia pero que presenta pequeñas fluctuaciones térmicas en la dirección perpendicular al plano. La posición sobre el plano de referencia se describe con un vector de posición bidimensional $\vec{r} = (x, y)$. A un tiempo dado, la conformación de la bicapa puede caracterizarse mediante la altura en cada punto $z = h(\vec{r})$ (Fig. 7). A la descripción matemática de la membrana realizada así, se le llama “parametrización de Monge” y es una de las maneras más simples de parametrizar una superficie. Supondremos que la membrana tiene dimensiones $L \times L$ en el plano de referencia. Además, por simplicidad, consideremos una bicapa con dos monocapas idénticas de modo que $c_0 = 0$.

Lo primero que veremos es la forma que adopta la curvatura media en la representación de Monge. Comencemos por analizar un caso más simple: una curva unidimensional en un

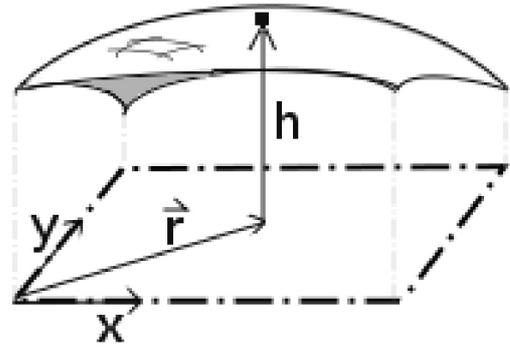


FIGURA 7. Representación esquemática de la parametrización de una membrana con pequeñas fluctuaciones térmicas.

espacio bidimensional. Dicha curva puede pensarse como la trayectoria de un móvil, $\vec{R}(x)$, donde el parámetro x puede pensarse momentáneamente como un tiempo. La “velocidad” del móvil sería $\vec{v} = \vec{R}'(x)$ y su “aceleración”, $\vec{a} = \vec{R}''(x)$. El apóstrofe denota derivada con respecto a x . La aceleración centrípeta es igual al cuadrado de la velocidad por la curvatura en el punto en cuestión,

$$a_c = \frac{v^2}{r_c} = \frac{\|\vec{R}'(x)\|^2}{r_c}.$$

Por tanto, para calcular la curvatura necesitamos calcular de manera independiente la aceleración centrípeta. Esto lo haremos aprovechando que, a su vez, a_c es igual a la componente de la aceleración perpendicular a la velocidad. Esta componente puede ser obtenida recordando que el área A del paralelogramo formado por los vectores \vec{R}' y \vec{R}'' es igual al producto de su base, $\|\vec{R}'(x)\|$ por su altura, a_c , de donde $a_c = A/\|\vec{R}'(x)\|$. Ahora recordemos que el área (orientada) del paralelogramo formado por los vectores $\vec{R}'(x)$ y $\vec{R}''(x)$ es igual al determinante $\det[\vec{R}'(x), \vec{R}''(x)]$ (el signo del determinante está relacionado a la orientación de un vector respecto al otro). Por lo tanto, la aceleración centrípeta está dada por

$$a_c = \frac{\det[\vec{R}'(x), \vec{R}''(x)]}{\|\vec{R}'(x)\|}.$$

Despejando, la curvatura en dicho punto es entonces:

$$c = \frac{1}{r_c} = \frac{\det[\vec{R}'(x), \vec{R}''(x)]}{\|\vec{R}'(x)\|^3}.$$

Esta fórmula es general para cualquier curva.

Para hacer la analogía con el caso que queremos estudiar podemos pensar en una curva que es casi recta, excepto por pequeñas fluctuaciones, y que por lo tanto puede representarse por el análogo de la parametrización de Monge, $\vec{R}(x) = (x, h(x))$. Es ahora claro que, a primer orden en h y sus derivadas, la curvatura es

$$c = \frac{\det[(1, h_x), (0, h_{xx})]}{(1 + h_x^2)^{3/2}} \approx h_{xx}.$$

Análogamente, en el caso tridimensional que nos interesa, la curvatura media de una superficie está dada, a segundo orden en h y sus derivadas, por la siguiente fórmula:

$$H \approx \nabla^2 h,$$

donde ∇^2 representa el operador laplaciano, el cual corresponde a la segunda derivada del párrafo anterior. Por su parte, el elemento diferencial de área está dado por

$$\sqrt{1 + h_x^2 + h_y^2} dx dy \approx \left[1 + \frac{1}{2} (\nabla h)^2 \right] dx dy.$$

Sustituyendo estas expresiones en la Ec. (4), tenemos que la energía de Helfrich para membranas débilmente curvadas puede escribirse en forma aproximada como

$$F = \frac{1}{2} \int \left\{ \kappa (\nabla^2 h)^2 + \sigma (\nabla h)^2 \right\} dx dy, \quad (6)$$

donde estamos ignorando el término constante. Esta ecuación supone además que las fluctuaciones térmicas afectan la forma de la membrana pero no provocan cambios en su topología, por lo cual se ha ignorado el término gaussiano, que como vimos permanece constante mientras no cambie la topología. Esta manera de escribir la energía elástica de Helfrich es matemáticamente conveniente para describir las fluctuaciones de forma en la membrana, lo cual ha llevado a concebir métodos experimentales para medir la constante elástica κ .

3.2. Fluctuaciones de forma de una membrana

Para estudiar las fluctuaciones de una membrana, vamos a considerar sus diversos modos de deformación. Para ello, haremos una expansión en serie de Fourier de la función que describe la forma de la membrana en la parametrización de Monge, $h(\vec{r})$. Esta expansión queda de la siguiente forma:

$$h(\vec{r}) = \sum_{\vec{q}} h_{\vec{q}} \cdot \exp\{i\vec{q} \cdot \vec{r}\}, \quad (7)$$

donde $\vec{q} = 2\pi/L(n_x, n_y)$ y n_x, n_y son números enteros. Los coeficientes $h_{\vec{q}}$ pueden verse como “coordenadas” en el espacio de Fourier y representan la contribución a las fluctuaciones de cada modo de deformación.

Para utilizar esta expansión en la expresión de la energía de Helfrich (Ec. 6), derivamos la expresión anterior para obtener el gradiente y el laplaciano de $h(\vec{r})$:

$$(\nabla h)^2 = - \sum_{\vec{q}_1, \vec{q}_2} (\vec{q}_1 \cdot \vec{q}_2) h_{\vec{q}_1} h_{\vec{q}_2} \exp\{i(\vec{q}_1 + \vec{q}_2) \cdot \vec{r}\}, \quad (8)$$

$$(\nabla^2 h)^2 = \sum_{\vec{q}_1, \vec{q}_2} q_1^2 q_2^2 h_{\vec{q}_1} h_{\vec{q}_2} \exp\{i(\vec{q}_1 + \vec{q}_2) \cdot \vec{r}\}. \quad (9)$$

Con estas ecuaciones, la energía libre de Helfrich, (6), puede reescribirse como

$$F = \frac{1}{2} \int_{L \times L} \sum_{\vec{q}_1, \vec{q}_2} h_{\vec{q}_1} h_{\vec{q}_2} [\kappa q_1^2 q_2^2 - \sigma (\vec{q}_1 \cdot \vec{q}_2)] \times \exp\{i(\vec{q}_1 + \vec{q}_2) \cdot \vec{r}\} d^2 \vec{r}. \quad (10)$$

Esta última expresión puede escribirse en una forma más simple intercambiando la integral con la sumatoria y usando la representación de Fourier de la delta de Kronecker:

$$\int_{L \times L} \exp\{-i\vec{q} \cdot \vec{v}\} d^2 \vec{v} = L^2 \delta_{\vec{q},0}. \quad (11)$$

De aquí,

$$F = \frac{L^2}{2} \sum_{\vec{q}} h_{\vec{q}} h_{-\vec{q}} (\kappa q^4 + \sigma q^2).$$

Por otra parte, el hecho de que $h(\vec{r})$ sea real y la Ec. (7) nos llevan a que los modos complejos de Fourier son tales que $h_{-\vec{q}} = h_{\vec{q}}^*$. Todo esto finalmente nos lleva a que la energía de Helfrich es

$$F = \frac{L^2}{2} \sum_{\vec{q}} |h_{\vec{q}}|^2 (\kappa q^4 + \sigma q^2). \quad (12)$$

Observemos ahora que la energía obtenida es armónica en estas nuevas “coordenadas” $|h_{\vec{q}}|$. Si ahora se aplica el teorema de equipartición de la energía (Ver Apéndice A), las amplitudes cuadráticas medias de los diferentes modos de oscilación en la membrana están dadas por

$$\langle h_{\vec{q}}^2 \rangle = \frac{K_B T}{L^2 (\kappa q^4 + \sigma q^2)}. \quad (13)$$

Comúnmente a esta función se le da el nombre de espectro de fluctuaciones o factor de estructura. Vemos en esta ecuación que, como era de esperarse, la amplitud de las fluctuaciones de la membrana aumenta al aumentar la temperatura. Igualmente, dado que la amplitud de cada modo es inversamente proporcional al módulo elástico de curvatura media, κ , vemos que las fluctuaciones son más grandes mientras más pequeño sea este módulo, y viceversa.

Por otra parte, dos modos diferentes están desacoplados y, por tanto (Ver Apéndice A),

$$\langle h_{\vec{q}_1} h_{\vec{q}_2} \rangle = 0, \quad (14)$$

si $\vec{q}_1 \neq -\vec{q}_2$. Utilizando este hecho es posible ver que la amplitud total de la fluctuación de la membrana en el espacio real es simplemente la suma sobre todos los modos individuales, es decir,

$$\langle h^2 \rangle = \sum_{\vec{q}} \langle h_{\vec{q}}^2 \rangle.$$

Esta relación es muy importante pues su evaluación permite tener una idea sobre los parámetros de los que depende la

amplitud de las fluctuaciones de forma en la membrana. Para calcular la amplitud total en forma aproximada la suma se puede transformar en una integral:

$$\sum_q \rightarrow 2\pi \int_{q_{min}}^{q_{max}} \left(\frac{L}{2\pi}\right)^2 q dq.$$

Cabe hacer notar que en esta ecuación, los límites de integración se deben elegir de tal manera que se sumen las fluctuaciones que tienen sentido físico. Por ejemplo, no tiene sentido considerar fluctuaciones cuya longitud de onda sea mayor que la dimensión mayor de la membrana (L). De igual forma, no tiene sentido considerar fluctuaciones más pequeñas que la escala molecular. Para esta última escala espacial, como distancia de corte se puede tomar una distancia del orden del espesor de la membrana, pues este tamaño está determinado por la longitud de las moléculas anfífilas. Con estos razonamientos, con una buena aproximación se pueden proponer límites de integración dados por: $q_{max} = 2\pi/a$ y $q_{min} = 2\pi/L$, donde a es del orden del grosor de la membrana y L es la longitud total de ésta.

Tomando en cuenta las consideraciones expuestas,

$$\langle h^2 \rangle = 2\pi \left(\frac{L}{2\pi}\right)^2 \int_{q_{min}}^{q_{max}} \frac{K_B T}{L^2(\kappa q^4 + \sigma q^2)} q dq,$$

es decir,

$$\langle h^2 \rangle = \frac{K_B T}{4\pi\sigma} \ln \frac{q_{max}^2(q_{min}^2\kappa + \sigma)}{q_{min}^2(q_{max}^2\kappa + \sigma)}. \quad (15)$$

En particular, cuando $q_{min}^2 \ll q_{max}^2$ y $\sigma \rightarrow 0$, la amplitud total toma la forma

$$\langle h^2 \rangle \approx \frac{K_B T}{16\pi^3\kappa} L^2. \quad (16)$$

Vemos entonces que el cuadrado de la amplitud total de las fluctuaciones es (en promedio) proporcional a la temperatura e inversamente proporcional al módulo elástico de curvatura media, κ , lo cual corrobora la idea intuitiva de que mientras más flexible es la membrana, mayores son sus fluctuaciones.

3.3. Medición experimental del módulo de curvatura media de una vesícula mediante manipulación con micropipetas

Hemos dicho que existen diferentes métodos experimentales que permiten medir el módulo elástico de curvatura media, κ . En esta sección comentaremos uno de ellos, basado en la técnica de aspiración de vesículas con micropipetas.

Este método aprovecha que las vesículas gigantes, preparadas con el método de electroformación, son fácilmente observables con ayuda de un microscopio óptico [18, 19]. En general, las vesículas tienen una apariencia de esferas perfectas. Sin embargo, debido a que la membrana que las conforma

es flexible, su superficie presenta una cierta corrugación cambiante con el tiempo debido a las fluctuaciones térmicas [20]. Esas pequeñas desviaciones respecto de la esfera se aprovechan para la medición experimental del módulo de curvatura media κ de la membrana.

Para ello se utiliza la técnica de micromanipulación o microaspiración con micropipetas. En este método, vesículas gigantes preparadas con el método de electroformación (tamaño del orden de 20 micras) se aspiran con un capilar muy delgado de vidrio (diámetro del orden de 5 micras). Mediante el capilar se aplica una presión de succión a la vesícula (Fig. 8). Como la vesícula es deformable, parte de ella penetra en la sección cilíndrica de la micropipeta. El área de la vesícula cambia y su forma ya no es exactamente esférica, sino que se debe considerar el trozo de membrana dentro del capilar. Evidentemente la distancia de penetración depende tanto de la presión aplicada como de la elasticidad de la membrana. Así, evaluando el cambio del área de la vesícula (a partir de fotografías), y conociendo la presión aplicada, puede determinarse el módulo de curvatura media de las membranas, κ .

Tanto el cambio de área de la membrana, como la tensión de la vesícula pueden escribirse en términos de parámetros controlables o medibles en el experimento.

Por ejemplo, utilizando argumentos de equilibrio termodinámico, Henriksen e Ipsen [21] mostraron que la tensión de la membrana, σ , está relacionada a la presión de succión, Δp , mediante la fórmula

$$\sigma = \frac{\Delta p R_p}{2 \left(1 - \frac{R_p}{R_v}\right)}, \quad (17)$$

donde R_p es el radio de la pipeta y R_v el radio de la vesícula.

Para evaluar el cambio del área de la vesícula al someterse a una presión de succión, recordemos que la membrana presenta fluctuaciones térmicas que la deforman ligera pero constantemente. Una representación esquemática de estas fluctuaciones en un momento dado se muestran en la Fig. 9. En estas condiciones, el efecto de una presión de succión puede analizarse en dos regímenes cualitativamente diferentes, los cuales dependen de la magnitud de la presión de succión y, por lo tanto, de la tensión σ :

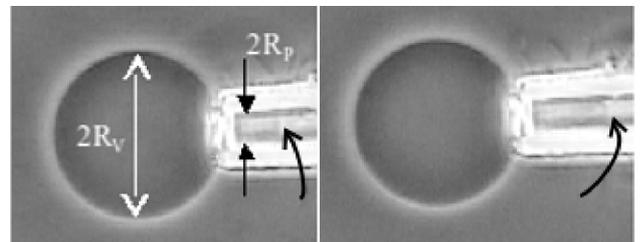


FIGURA 8. Fotografías tomadas en un microscopio óptico de una vesícula de SOPC aspirada dentro de una micropipeta. La presión de aspiración es mayor en la foto de la derecha. Esto se refleja en la longitud diferente de la sección de membrana dentro de la pipeta (flechas oblicuas). Fotos cortesía de Gerardo Paredes, estudiante de doctorado en la Universidad de Sonora.

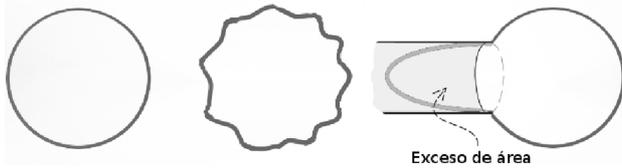


FIGURA 9. Representación esquemática de una membrana sin fluctuaciones térmicas y de una membrana con fluctuaciones. Al aspirar con una micropipeta la vesícula fluctuante, las fluctuaciones se suprimen. El exceso aparente de área (porción cilíndrica de membrana dentro de la pipeta) es el área asociada a las fluctuaciones de forma antes de la aspiración.

1. Cuando la tensión σ a la cual está sometida la membrana es pequeña, el efecto de la presión aplicada es reducir la amplitud de las fluctuaciones térmicas, alisando la forma esférica de la vesícula, ver Fig. 9. Entonces, al penetrar la vesícula en el capilar, el área de la membrana permanece constante. El aparente incremento de área (cilindro de longitud L en el capilar) viene de la supresión de las fluctuaciones de curvatura alrededor de la forma esférica (Fig. 8). Evidentemente que este efecto está directamente relacionado con la flexibilidad o rigidez de la membrana. Si la presión de succión está en este régimen es posible medir el módulo de curvatura media de la membrana, κ .
2. Cuando la tensión σ aplicada a la membrana es grande, esto trae como efecto, además de desaparecer las fluctuaciones de curvatura de la membrana, un estiramiento del área de la misma. En este caso, el área de la membrana se incrementa. También en este régimen es posible medir lo que se conoce como la “constante de compresibilidad de área”, K_A , que es el equivalente bidimensional a la compresibilidad volumétrica de un fluido [22].

Aquí estamos interesados en mostrar cómo es posible medir el módulo de curvatura media, κ . Por esta razón concentraremos nuestra discusión en el régimen de pequeñas tensiones. Vamos a analizar con detalle el caso más sencillo de una membrana plana, aunque fluctuante, de dimensiones $L \times L$. El resultado final es idéntico para una vesícula esférica pero es necesario mayor trabajo matemático para deducirlo.

Primero consideremos que el área real de la membrana (incluyendo fluctuaciones térmicas) no es exactamente el producto de sus dimensiones, $L \times L$. Esto es debido a que, por las fluctuaciones térmicas, la membrana no es perfectamente plana, sino que en cada instante presenta cierta rugosidad. El área real puede calcularse integrando el elemento de área que describimos en la sección anterior:

$$A = \int_{L \times L} \sqrt{1 + (\nabla h(\vec{r}))^2} d^2 \vec{r}$$

$$\approx \int_{L \times L} \left(1 + \frac{1}{2} [\nabla h(\vec{r})]^2 \right) d^2 \vec{r},$$

donde, como en la sección anterior, $h(\vec{r})$ es la altura de la membrana respecto al plano de referencia y su expansión de Fourier está dada por la Ec. (7). Obteniendo el gradiente encontramos que

$$\Delta A = \frac{1}{2} \int_{L \times L} \sum_{\vec{q}_1, \vec{q}_2} (\vec{q}_1 \cdot \vec{q}_2) h_{\vec{q}_1} h_{\vec{q}_2} \exp i (\vec{q}_1 + \vec{q}_2) \cdot \vec{r} d^2 \vec{r},$$

donde $\Delta A = A - A_0$ es la diferencia entre el área real de la membrana, A , y el área aparente al microscopio (es decir, el área de la membrana plana de referencia), $A_0 = L^2$. Utilizando la Ec. (11) esta expresión se simplifica:

$$\Delta A = \frac{L^2}{2} \sum_{\vec{q}} q^2 \|h_{\vec{q}}\|^2.$$

Podemos ahora tomar el promedio de ΔA y utilizar la Ec. (13) de la sección anterior para obtener el siguiente resultado:

$$\langle \Delta A \rangle = \frac{1}{2} \sum_{\vec{q}} \frac{K_B T}{q^2 \kappa + \sigma}.$$

Luego, siguiendo el mismo razonamiento para llegar a la Ec. (15), tenemos que

$$\frac{\Delta A}{A_0} = \frac{K_B T}{8\pi\kappa} \ln \left\{ \frac{q_{max}^2 \kappa + \sigma}{q_{min}^2 \kappa + \sigma} \right\}$$

o equivalentemente,

$$\frac{\Delta A}{A_0} = \frac{K_B T}{8\pi\kappa} \ln \left\{ \frac{(2\pi/a)^2 + \sigma/\kappa}{(2\pi/L)^2 + \sigma/\kappa} \right\}. \tag{18}$$

La Ec. (18) fue deducida para una membrana plana. Sin embargo, es igualmente válida en el caso de la vesícula aspirada mediante micropipetas [20, 23]. Ahora bien, en dichos experimentos es posible observar cómo se modifica el área aparente de la vesícula inicialmente libre de tensiones cuando se le aplica una tensión pequeña. En todo el proceso, tanto antes como después de aplicar la tensión (siempre que esta última sea pequeña), el área real de la membrana, A_{real} , se mantiene constante, como se explicó en la Fig. 8. En lo que sigue denotamos por A_σ el área aparente de la membrana correspondiente a la tensión σ y definimos la siguiente cantidad:

$$\Delta A_\sigma = A_{real} - A_\sigma. \tag{19}$$

Apliquemos ahora la Ec. (18) para dos casos diferentes:

1. Si la porción de la vesícula no está sujeta a tensión externa ($\sigma = 0$ en la Ec. 18) tenemos que:

$$\frac{\Delta A_0}{A_0} = \frac{K_B T}{8\pi\kappa} \ln \left\{ \frac{A_0}{a^2} \right\}. \tag{20}$$

2. Si la porción de la vesícula de interés está sujeta a una tensión σ tal que $(2\pi/L)^2 < \sigma/\kappa < (2\pi/a)^2$, entonces tenemos que

$$\frac{\Delta A_\sigma}{A_\sigma} = \frac{K_B T}{8\pi\kappa} \ln \left\{ \frac{8\pi^2 \kappa}{a^2 \sigma} \right\}. \tag{21}$$

Ahora, nótese primero que

$$A_{real} = \Delta A_0 + A_0 = \Delta A_\sigma + A_\sigma,$$

y, por lo tanto,

$$\frac{A_\sigma}{A_0} = \frac{\Delta A_0}{A_0} - \frac{\Delta A_\sigma}{A_0} + 1.$$

Así, sustituyendo en esta última relación las Ecs. (20) y (21) se sigue que

$$\frac{A_\sigma}{A_0} = 1 + \beta \ln \left\{ \frac{A_0}{a^2} \right\} - \beta \frac{A_\sigma}{A_0} \ln \left\{ \frac{4\pi^2 \kappa}{a^2 \sigma} \right\},$$

donde $\beta \equiv K_B T / 8\pi \kappa$. Luego, factorizando el término A_σ / A_0 y simplificando, obtenemos finalmente que

$$\frac{A_\sigma}{A_0} = \frac{1 + \beta \ln \left\{ \frac{A_0}{a^2} \right\}}{1 + \beta \ln \left\{ \frac{4\pi^2 \kappa}{a^2 \sigma} \right\}}. \quad (22)$$

En el experimento es posible medir directamente las áreas aparentes A_0 y A_σ , y calcular la deformación

$$\alpha \equiv \frac{A_\sigma - A_0}{A_0} = \frac{A_\sigma}{A_0} - 1$$

que, en nuestro caso, en virtud de (22) puede calcularse mediante

$$\alpha = \frac{1 + \beta \ln \left\{ \frac{A_0}{a^2} \right\}}{1 + \beta \ln \left\{ \frac{4\pi^2 \kappa}{a^2 \sigma} \right\}} - 1. \quad (23)$$

En particular, para el caso en que $\beta \ll 1$, condición que se cumple al considerar membranas rígidas como las formadas por fosfolípidos, la deformación puede aproximarse como

$$\alpha \approx \left[1 + \beta \ln \left\{ \frac{A_0}{a^2} \right\} \right] \left[1 - \beta \ln \left\{ \frac{4\pi^2 \kappa}{a^2 \sigma} \right\} \right] - 1,$$

es decir,

$$\alpha \approx \frac{K_B T}{8\pi \kappa} \ln \left\{ \frac{A_0 \sigma}{4\pi^2 \kappa} \right\}. \quad (24)$$

Esta última ecuación permite calcular el cambio de área aparente cuando se succiona una vesícula con presiones bajas mediante la técnica de aspiración con micropipetas. Como hemos dicho, en este experimento se inhiben mecánicamente las fluctuaciones, y el área de la vesícula correspondiente a la proyección dentro de la micropipeta es igual al exceso inicial de área respecto a la forma esférica de la vesícula libre. Si se grafica la tensión aplicada en función del cambio de área (Ec. 24), de la pendiente de la curva es posible extraer κ . En la Fig. 10 se muestra una gráfica experimental (tomada de la Ref. 22) del logaritmo de σ vs. α , encontrándose que efectivamente hay un régimen lineal para bajas tensiones. El ajuste de la pendiente de dicha recta en los experimentos mencionados da una medición experimental directa del módulo de curvatura media, κ . El intervalo típico para el fosfolípido SOPC es de $\kappa \approx 34 - 41 K_B T$ [24, 25].

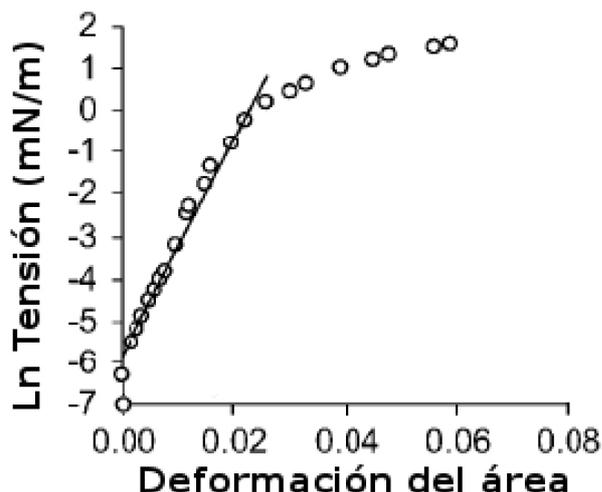


FIGURA 10. Gráfica de tensión-deformación para una vesícula de SOPC en solución de metanol/agua. Los puntos obtenidos de trazar el logaritmo natural de la tensión, σ , contra la deformación de área, α , tienen un comportamiento lineal en el régimen de baja tensión (0.001-0.5 mN/m). Gráfica tomada de la Ref. 22.

4. Fases formadas por bicapas

En la Sec. 1.1 mencionamos que las moléculas anfífilas en solución acuosa forman diferentes estructuras debido a su naturaleza dual. Las estructuras básicas son las micelas y las membranas. Estas últimas pueden existir en diferentes configuraciones, entre las cuales la más común es la fase lamelar. Sin embargo, las membranas también se agrupan en arreglos desordenados como la fase esponja.

4.1. Transición entre la fase lamelar y la fase esponja

Es un hecho experimental, verificado en muchos sistemas de surfactantes, que las fases lamelar y esponja aparecen en regiones vecinas del diagrama de fases. De hecho, hay un patrón que se repite en muchos sistemas: la aparición sucesiva de las fases micelar, lamelar y esponja al variar un parámetro fisicoquímico χ , el cual puede ser la temperatura, la concentración de tensoactivo, la salinidad, la concentración de un aditivo, etc. Usualmente, las tres fases observadas dependen de χ como se muestra en la Fig. 11. Para valores pequeños de χ se observa la fase micelar. Posteriormente aparecen las fases lamelar y esponja conforme aumenta χ .

Esta sucesión de fases intrigó durante mucho tiempo a la comunidad que trabaja en sistemas coloidales autoasociativos. En particular, los investigadores se preguntaban cómo es posible que un cambio tan sutil en las condiciones fisicoquímicas (variación del parámetro χ) lleve a una reorganización tan drástica de la estructura membranal. Uno de los grandes logros de la teoría de Helfrich consiste en que este fenómeno puede ser explicado en términos de las propiedades elásticas de membranas. A continuación veremos un modelo sencillo que explica la transición lamelar-esponja en estos sistemas.

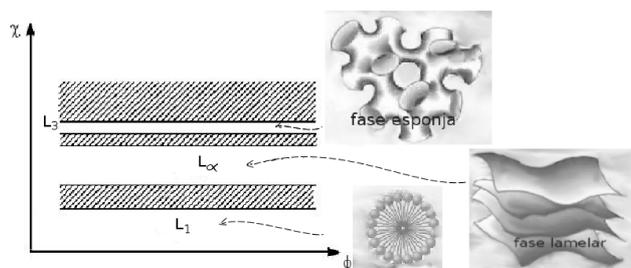


FIGURA 11. Diagrama de fase esquemático en términos de los parámetros χ y ϕ que resume las características principales de las fases en sistemas de surfactante y agua. Gráfica tomada de la Ref. 26.

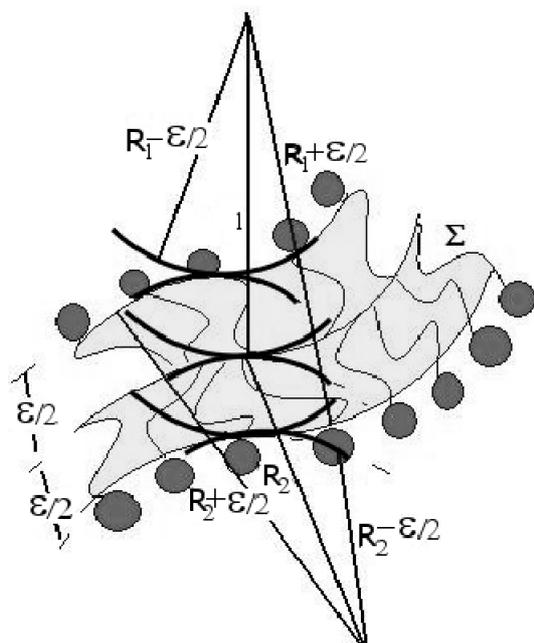


FIGURA 12. Estructura esquemática de una bicapa. La superficie incompresible de cada monocapa permanece a una distancia $\epsilon/2$ de la mitad de la superficie Σ .

Considerando la energía de una bicapa de moléculas anfifílicas es posible construir un modelo sencillo que explique por qué una fase lamelar se transforma en una fase esponja al variar el parámetro χ . Para esto se modela a la fase esponja como una superficie periódica mínima de Schwarz [26], es decir, una superficie con curvatura media H idénticamente cero. Aún cuando los experimentos de microscopía electrónica indican que la fase esponja es desordenada [26] (a diferencia de la fase cúbica que es periódica), esta simplificación ayuda a visualizar dos características esenciales de la fase:

- 1) En cualquier parte de la estructura los dos radios principales de curvatura tienen similar magnitud pero signos opuestos.
- 2) La curvatura gaussiana tiene en cualquier parte una magnitud grande comparada con la curvatura media y tiene signo negativo.

La primera característica permite despreciar a la curvatura media (de hecho, ésta es idénticamente cero cuando la fase es una superficie periódica mínima). Bajo dichas condiciones, las contribuciones de la curvatura media a la energía libre de Helfrich para la fase lamelar y para la esponja son básicamente iguales. Por lo tanto, la principal diferencia entre estas fases es debida al término gaussiano, como se observa en la Ec. (4).

Por otra parte, es posible deducir a partir del teorema de Gauss-Bonnet que la diferencia en la energía de Helfrich por unidad de área, Ec. (4), entre las fases lamelar y esponja es del orden de $E_{lamelar} - E_{esponja} = -4p\pi\bar{\kappa}$, como se sigue de la Ec. (5). Con base en esto podemos ver qué valores del módulo elástico gaussiano estabilizan la fase lamelar y cuáles la fase esponja. El criterio a seguir es la minimización de la energía elástica. Así, se espera que el valor de $\bar{\kappa}$ que estabiliza la fase lamelar sea negativo, pues en ese caso, esta fase tendría menos energía elástica que la esponja. En cambio, para estabilizar la fase esponja, $\bar{\kappa}$ deberá ser positiva.

Para entender la transición lamelar-esponja, vamos a describir un modelo que predice cómo el parámetro fisicoquímico χ afecta el valor del módulo elástico gaussiano $\bar{\kappa}$. Para ello vamos a analizar la energía libre de Helfrich de una bicapa partiendo de la energía de cada una de las monocapas que la constituyen.

Consideramos que las monocapas no son simétricas respecto a la mitad de su superficie, es decir, presentan curvatura espontánea c_0 . Así, la energía de curvatura para cada monocapa puede escribirse como

$$f_m = \frac{1}{2}\kappa_m (H - c_0)^2 + \tilde{\kappa}_m K. \tag{25}$$

Puesto que en el proceso de pasar de una bicapa plana a una curvada no se involucra cambio de topología, es posible abandonar el término gaussiano al hacer los cálculos y reincorporarlo en la expresión final. Para evitar confusiones en este cálculo, usamos los subíndices m y b señalando que estamos hablando de una monocapa o una bicapa, respectivamente. Por ejemplo, κ_m es el módulo de curvatura media de una monocapa y κ_b el módulo de curvatura media de una bicapa.

Cuando las monocapas están unidas frente a frente formando la bicapa, cada una está en un estado que no corresponde a su curvatura de equilibrio. La presencia de la otra monocapa hace que necesariamente alguna de las dos no se pueda plegar en la dirección requerida por la curvatura espontánea. Para una monocapa la curvatura espontánea es $1/R_1 = c_0$, mientras que para la otra es $-1/R_2 = -c_0$ (ver Fig. 11). Los radios de curvatura que tiene cada monocapa definen su energía elástica según la Ec. (25). La energía libre de la bicapa puede ser formulada sumando las contribuciones de las monocapas. Así, sustituyendo la curvatura media en función de los radios principales de curvatura de cada monocapa a una distancia $\epsilon/2$, medida desde la mitad de la super-

fie (Fig. 12) en la Ec. (25), tenemos que

$$f_b = \frac{1}{2}\kappa_m \left[\frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{R_1 + \frac{\epsilon}{2}} + \frac{1}{R_2 + \frac{\epsilon}{2}} \right\} - c_0 \right]^2 + \frac{1}{2}\kappa_m \left[\frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{R_1 - \frac{\epsilon}{2}} + \frac{1}{R_2 - \frac{\epsilon}{2}} \right\} + c_0 \right]^2.$$

Haciendo un desarrollo en serie de Taylor a segundo orden alrededor de $\epsilon/2$ tenemos

$$f_b \approx \frac{\kappa_m}{8} \left[\frac{1}{R_1} - \frac{\epsilon}{2R_1^2} + \frac{1}{R_2} - \frac{\epsilon}{2R_2^2} - 2c_0 \right]^2 + \frac{\kappa_m}{8} \left[\frac{1}{R_1} + \frac{\epsilon}{2R_1^2} + \frac{1}{R_2} + \frac{\epsilon}{2R_2^2} + 2c_0 \right]^2.$$

Desarrollando los paréntesis y despreciando los términos de tercer orden y superior en los radios principales de curvatura

$$f_b \approx \frac{1}{2}\kappa_m \left[\frac{1}{2R_1^2} + \frac{1}{2R_2^2} + \frac{1}{R_1R_2} + \left(\frac{1}{R_1^2} + \frac{1}{R_2^2} \right) c_0\epsilon \right] + \kappa_m c_0^2$$

lo que puede reescribirse como

$$f_b = \frac{1}{4}\kappa_m \left\{ \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right\}^2 + \frac{1}{2}\kappa_m \left(c_0\epsilon \left[\left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 - \frac{2}{R_1R_2} \right] + 2c_0^2 \right).$$

Considerando ahora las definiciones de las curvaturas media y gaussiana en función de los radios principales de curvatura, tenemos que

$$f_b = \frac{1}{2}(2\kappa_m)H^2 + 2H^2\epsilon c_0\kappa_m - K\epsilon c_0\kappa_m + c_0^2\kappa_m.$$

Puesto que $c_0^2\kappa_m$ es una constante independiente de la forma que adquiere la membrana y $2\epsilon H^2 c_0\kappa_m$ es despreciable en comparación con $H^2\kappa_m$, es posible despreciar estos términos, con lo que se obtiene

$$f_b = \frac{1}{2}(2\kappa_m)H^2 + (-\epsilon c_0\kappa_m)K. \quad (26)$$

Comparando el término que involucra la curvatura gaussiana en esta expresión con el de la Ec. (3), se puede concluir que

$$\bar{\kappa}_b = -\epsilon c_0\kappa_m. \quad (27)$$

Esta ecuación es importante pues relaciona una constante elástica de la membrana ($\bar{\kappa}_b$) con propiedades de las monocapas que la constituyen: su curvatura espontánea (c_0) y su módulo elástico de curvatura media (κ_m).

Esto permite entender la transición lamelar-esponja de la siguiente manera. Al variar las condiciones fisicoquímicas (parámetro χ) en la dirección apropiada, las propiedades de las monocapas cambian en consecuencia, por ejemplo, su

curvatura espontánea. Esto ocasiona que el módulo de curvatura gaussiano de la membrana cambie (Ec. 27), lo que, si el cambio tiene los valores apropiados, se refleja en un cambio de topología de membranas abiertas (fase lamelar) a membranas en forma de silla de montar a caballo (fase esponja).

Usando la Ec. (27) podemos ver que, en la aproximación en que la fase esponja es modelada como una superficie mínima de curvatura media nula, la energía libre de curvatura tiene la forma

$$f = -\epsilon c_0\kappa_m K$$

y por el teorema de Gauss-Bonnet, Ec. (5), la energía sobre toda la membrana está dada por

$$F = -4\pi\epsilon c_0\kappa_m(1-p).$$

En esta ecuación vemos que el género de la superficie, p , es también un factor que influye en la energía elástica de la membrana.

En esta expresión la única constante que puede cambiar de signo es la curvatura espontánea de la monocapa. De donde es claro que si $c_0 < 0$ la energía mínima corresponde a una superficie cuyo género es mayor que uno (pues p mayor que uno resulta en energías negativas). Es decir, la energía elástica favorece la fase esponja. Sin embargo, cuando $c_0 > 0$ la energía mínima corresponde a una superficie sin agujeros ($p = 0$) y como consecuencia la fase lamelar es mayormente favorecida. Vemos pues que este modelo sencillo permite entender, al menos cualitativamente, cuándo la fase lamelar o la fase esponja son estables en términos de la energía elástica de las membranas.

4.2. Interacción estérica de Helfrich

En esta sección vamos a comentar brevemente una consecuencia más de la elasticidad de las membranas. Como veremos, este efecto tiene que ver con las interacciones que estabilizan arreglos de membranas como la fase lamelar o la fase esponja.

Para ejemplificar, consideremos una fase lamelar, la cual presenta orden a una escala mucho mayor que el espesor de las membranas. La distancia media entre bicapas en esta fase está determinada por las interacciones entre ellas. Por ejemplo, las fuerzas de van der Waals, que son siempre atractivas y de corto alcance, tienden a hacer que las membranas se adhieran entre sí y que la fase lamelar se desestabilice y colapse. En la práctica esto no sucede debido al efecto estabilizador de fuerzas repulsivas, como en el caso de las membranas cargadas, donde la interacción repulsiva es electrostática.

Sin embargo, veremos que en sistemas sin carga también es posible estabilizar una fase lamelar con distancias entre membranas muy grandes, del orden de 1000Å. En un principio no se entendía cual era la fuerza repulsiva que lograba equilibrar a las interacciones de van der Waals en este caso de ausencia de fuerzas electrostáticas. Ahora sabemos que esta fuerza tiene su origen en las fluctuaciones de forma de la membrana.

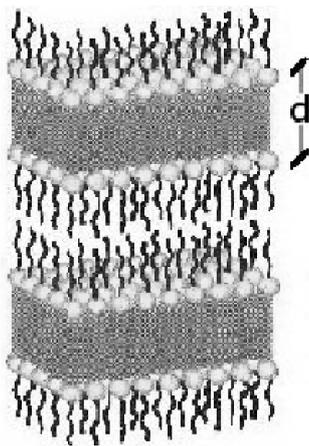


FIGURA 13. Vista esquemática de una fase lamelar formada por arreglos periódicos de membranas surfactantes.

Cualitativamente, este efecto repulsivo puede entenderse de la siguiente manera. Cuando las membranas de un sistema son muy flexibles, las fluctuaciones de curvatura tienen una amplitud muy grande (inversamente proporcional al módulo de curvatura media, que es pequeño). Sin embargo, el confinamiento de cada membrana por sus vecinas en la fase lamelar reduce efectivamente el espacio configuracional que cada bicapa puede explorar con sus fluctuaciones, tendiendo a reducir la entropía del sistema. Es precisamente esta reducción de entropía, efecto no favorecido en términos de la energía libre, la que da lugar a la fuerza repulsiva conocida como interacción estérica de Helfrich. El sistema alcanza un equilibrio, donde la energía libre es mínima.

El efecto directo del confinamiento es mejor modelado como una restricción a las posibles conformaciones de la membrana. Si la distancia promedio entre las membranas es d , (Fig. 13), de acuerdo con la Ec. (16), el confinamiento será sentido por una membrana cuando su tamaño sea del orden de L_d , tal que

$$\frac{K_B T}{\kappa} L_d^2 \approx d^2.$$

Podemos ahora pensar en la bicapa dividida en bloques de tamaño lateral $L_d \times L_d$ y suponer que cada uno de los bloques no es afectado por las interacciones entre las membranas vecinas. Así, el confinamiento no restringe las posibles conformaciones internas dentro de un bloque. Sin embargo, sí restringe el número de posibles configuraciones de los centros de masas de todos los bloques en la bicapa; esto es, restringe los posibles valores de $N_d = (L/L_d)^2$ coordenadas configuracionales. Hagamos ahora la analogía con un gas ideal tridimensional de N partículas, cuya entropía es proporcional a $3Nk_B$, donde k_B es la constante de Boltzmann. Si un número N_d de las coordenadas configuracionales fueran restringidas, la pérdida de entropía será proporcional a $-N_d k_B$. Aplicando el mismo criterio a nuestro sistema encontramos que la energía libre debida a la pérdida de entropía por el

confinamiento es

$$F = -TS \approx k_B T N_d = k_B T \left(\frac{L}{L_d} \right)^2 \approx \frac{1}{\kappa} \left(\frac{L}{d} k_B T \right)^2.$$

Por consiguiente, la energía libre de las interacciones estéricas por unidad de área de una membrana en la fase lamelar puede escribirse como

$$\frac{F}{A} \approx \frac{1}{\kappa} \left(\frac{k_B T}{d} \right)^2.$$

Otras derivaciones de la fórmula obtenida pueden encontrarse en la literatura [27, 28]. Esta energía corresponde a una interacción repulsiva entre bicapas, que varía como el inverso del cuadrado de la distancia de separación entre ellas. Cuando ésta es combinada con otro tipo de interacción como la de van der Waals o la electrostática, estas interacciones determinan la periodicidad de la fase lamelar. Este resultado fue derivado en 1978 por Helfrich [27], mostrando que las propiedades de la fase lamelar son determinadas en buena medida por las propiedades elásticas de las membranas.

5. Conclusiones

En este artículo presentamos una derivación de la energía de Helfrich, la cual describe las propiedades elásticas de membranas. Según este modelo, toda membrana tiene dos módulos elásticos: el de curvatura media y el de curvatura gaussiana. El primero de ellos está relacionado con la rigidez de la membrana y determina que tanto se deforma, sin cambiar de topología, debido a las fluctuaciones térmicas. El módulo elástico de curvatura gaussiana está relacionado al tipo de topología que adquiere una membrana. En el texto describimos un método para medir el módulo de curvatura media de una membrana, basado en la manipulación de vesículas con micropipetas. Hemos visto también que la elasticidad de las membranas da lugar a consecuencias físicas importantes, como la transición entre una fase lamelar y otra esponja, o la existencia de una interacción estérica entre membranas. Las propiedades elásticas de membranas juegan un papel importante en la forma que adquieren las membranas biológicas en la célula. Diversos grupos de investigación han explotado estos conceptos para predecir con cierto éxito la forma tanto de células como los glóbulos rojos [29], o de organelos como el complejo de Golgi [16]. Dejamos para un trabajo posterior una descripción de algunos de estos resultados. Cabe decir que el modelo presentado es relativamente simple. De hecho, sólo considera membranas fluidas con pequeñas fluctuaciones, despreciando efectos como el citoesqueleto de la célula, las deformaciones laterales, las proteínas transmembranales y demás complejidades presentadas en las membranas biológicas. Sin embargo, en la literatura hay extensiones del modelo, las cuales rescatan como límite el modelo de Helfrich [30–32]. Sin embargo, pese a sus limitantes, el modelo de Helfrich ha sido muy exitoso y es una referencia fundamental en el estudio de membranas biológicas.

Agradecimientos

Agradecemos a Gerardo Paredes y Carlos Luna, estudiantes de la Universidad de Sonora, por compartir con nosotros sus gráficas y resultados experimentales de manipulación con micropipetas. LMB agradece a Conacyt por la beca de maestría otorgada.

Apéndice

A. El teorema de equipartición de la energía

Consideremos un sistema compuesto por un gran número de partículas N (que, por simplicidad, supondremos tienen idéntica masa m). El estado microscópico del sistema está caracterizado por las $6N$ coordenadas de las posiciones $(\vec{q}_1, \vec{q}_2, \dots, \vec{q}_N)$ y los momentos $(\vec{p}_1, \vec{p}_2, \dots, \vec{p}_N)$ de las partículas. Supongamos que el sistema está en contacto con un baño térmico a temperatura T con el cuál intercambia energía (en forma de calor) pero no volumen ni partículas. Uno de los teoremas fundamentales de la mecánica estadística clásica establece que la densidad de probabilidad de que el sistema se encuentre en un microestado particular con energía $E = H(\vec{q}_1, \dots, \vec{q}_N; \vec{p}_1, \dots, \vec{p}_N)$ está dada por

$$P[\vec{q}_1, \dots, \vec{q}_N; \vec{p}_1, \dots, \vec{p}_N] = \frac{e^{-\beta H(\vec{q}_1, \dots, \vec{q}_N; \vec{p}_1, \dots, \vec{p}_N)}}{\int d^N \vec{q} \int d^N \vec{p} e^{-\beta H(\vec{q}_1, \dots, \vec{q}_N; \vec{p}_1, \dots, \vec{p}_N)}}, \quad (\text{A.1})$$

donde $\beta = (k_B T)^{-1}$ y k_B es la constante de Boltzmann. Esta es la llamada “distribución canónica”. La energía cinética de la i -ésima partícula es $p_i^2 / (2m)$, por lo que es fácil ver de la Ec. (A.1) que la energía cinética promedio de cada partícula es

$$\left\langle \frac{p_i^2}{2m} \right\rangle = \frac{\int d^3 \vec{p} [p_i^2 / (2m)] e^{-\beta \frac{p_i^2}{2m}}}{\int d^3 \vec{p} e^{-\beta \frac{p_i^2}{2m}}} = \frac{3}{2} k_B T$$

De aquí se sigue que la energía promedio correspondiente a cada coordenada de momento es $(k_B T) / 2$. Supongamos

ahora que nuestro sistema particular consiste en un conjunto de osciladores armónicos desacoplados, de manera que la energía correspondiente a cada coordenada (o “grado de libertad”) tiene la forma: $kx_i^2/2$, con k una constante. Utilizando nuevamente la Ec. (A.1) es fácil ver que

$$\left\langle \frac{kx_i^2}{2} \right\rangle = \frac{\int dx_i [kx_i^2/2] e^{-\beta \frac{kx_i^2}{2}}}{\int dx_i e^{-\beta \frac{kx_i^2}{2}}} = \frac{1}{2} k_B T.$$

Concluimos que cuando la energía es cuadrática en alguna de las coordenadas (ya sea de posición o de momento) obtendremos que la energía promedio correspondiente a ese grado de libertad es igual a $(k_B T) / 2$. Este resultado se conoce como el teorema de equipartición de la energía.

Otro resultado que se sigue de la distribución canónica y de que las coordenadas x_i están desacopladas en la expresión para la energía, es que dos coordenadas diferentes, x_i y x_j , son estadísticamente independientes. En efecto,

$$\langle x_i x_j \rangle = \frac{\int dx_i x_i e^{-\beta \frac{kx_i^2}{2}} \int dx_j x_j e^{-\beta \frac{kx_j^2}{2}}}{\int dx_i e^{-\beta \frac{kx_i^2}{2}} \int dx_j e^{-\beta \frac{kx_j^2}{2}}} = 0. \quad (\text{A.2})$$

Regresemos al caso más complejo de la membrana plana con pequeñas fluctuaciones térmicas de la Sec. 3.2. De acuerdo a la Ec. (12), la energía de la membrana es cuadrática en las coordenadas (en el espacio de Fourier) $h_{\vec{q}}$. A cada uno de los modos de Fourier (desacoplado a los otros modos) corresponde una energía cuadrática igual a $L^2 (\kappa q^4 + \sigma q^2) |h_{\vec{q}}|^2 / 2$. En analogía con los casos más simples discutidos arriba, la energía promedio por modo de Fourier será:

$$\left\langle \frac{L^2 (\kappa q^4 + \sigma q^2) |h_{\vec{q}}|^2}{2} \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T,$$

lo que nos lleva directamente a la Ec. (13). Del mismo modo, en analogía con el resultado de la Ec. (A.2), obtenemos para el caso de la membrana la Ec. (14).

1. P.L. Yeagle, *The Structure of Biological Membranes* (CRC Press 2005).
2. H. Lodish *et al.*, *Molecular Cell Biology* (Freeman 2000).
3. P.B. Canham, *J. Theor. Biol.* **26** (1970) 61.
4. H.J. Deuling y W. Helfrich, *J. Phys. (Paris)* **37** (1976) 1335.
5. F.C. Frank, *Discuss. Faraday Soc.* **25** (1958) 19.
6. W. Helfrich, *Z. Naturforsch.* **28c** (1973) 693.
7. S.J. Singer y G.L. Nicolson, *Science* **175** (1972) 720.
8. D. Roux *et al.*, *Eur. Phys. Lett.* **17** (1992) 575.
9. A. Caillé y C.R. Hebdo, *Acad. Sci. Paris B* **274** (1972) 981.
10. P.G. De Gennes, *J. Phys. Colloq. France* **30** (1969) c4.
11. Gregor Cevc (ed.), *Phospholipids Handbook* (Marcel Dekker Inc. 1993).
12. J.N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces* (Academic Press 1985).
13. Zhong-Can Ou-Yang *et al.*, *Geometric Methods in the Elastic Theory of Membranes in Liquid Crystal Phases* (World Scientific 1999).
14. S.A. Safran *Statistical thermodynamics of surfaces, interfaces, and membranes* (Addison-Wesley 1994).

15. E. Kreyszing, *Differential Geometry* (Dover 1991).
16. J. Derganc, A. Mironov y S. Svetina, *Traffic* **7** (2006) 85.
17. Y.C.B. Fung y P. Tomg, *Biophys. J.* **8** (1968) 175.
18. E. Evans y W. Rawicz., *Phys. Rev. Lett.* **64** (1990) 2094.
19. W. Rawicz, K.C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham y E. Evans., *Biophys. J.* **79** (2000) 328.
20. W. Helfrich y R.M. Servuss, *Nuovo Cimento* **3** (1984) 137.
21. J.R. Henriksen y J.H. Ipsen, *Eur. Phys. J. E* **14** (2004) 149.
22. V. Ly Hung y L. Longo Marjorie, *Biophys. J.* **87** (2004) 1013.
23. S.T. Milner y S.A. Safran, *Phys. Rev. A* **36** (1987) 4371.
24. D. Boal, *Mechanics of the Cell* (Cambridge University Press 2002).
25. M. Antonietti y S. Forster, *Adv. Mater.* **15** (2003) 1323.
26. G. Porte, J. Appell, P. Bassereau y J. Marignan, *J. Phys. France* **50** (1987) 1335.
27. W. Helfrich, *Z. Naturforsch* **33a** (1978) 305.
28. M. Deserno *Fluid lipid membranes a primer*; http://www.mpip-mainz.mpg.de/~deserno/scripts/IMPRS/IMPRS_lipidmembranes.pdf
29. Ou-Yang-can y Xie Zhang, *Phys. Rev. A* **41** (1990) 3381.
30. Z.C. Tu y Z.C. Ou-Yang, *Phys. Rev. E* **68** (2003) 061915.
31. Z.C. Tu y Z.C. Ou-Yang, *J. Phys. A: Math. Gen.* **37** (2004) 11407.
32. Z.C. Tu, L.Q. Ge, J.B. Li y Z.C. Ou-Yang, *Phys. Rev. E* **72** (2005) 021806.