

Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica

Volumen
Volume 25

Número
Number 1

Marzo
March 2004

Artículo:




Efectos electrocinéticos de células biológicas y partículas coloidales en la espectroscopia dieléctrica a bajas frecuencias

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica, AC

Otras secciones de
este sitio:

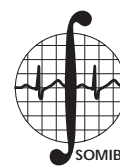
-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



Medigraphic.com



Efectos electrocinéticos de células biológicas y partículas coloidales en la espectroscopia dieléctrica a bajas frecuencias

A. Zehe,* A. Ramírez*

* Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias de la Electrónica.

Correspondencia:

A. Zehe

Apartado Postal No. 1505, 72000 Puebla, México

E-mail: azehe@siu.buap.mx

RESUMEN

La manipulación de células o de macromoléculas (por ej. ADN) biológicas cuyo tamaño físico cubre el rango nanométrico, es parte esencial de la novedosa nanotecnología un híbrido entre biología, química e ingeniería, que pretende el ensamble de bionano estructuras funcionales a través de un posicionamiento físico de sus componentes. Al otro lado permite la manipulación de estos objetos, su análisis biomédico y su separación en poblaciones de ciertos tamaños. Las técnicas electrocinéticas a bajas frecuencias permiten el estudio de la agregación, rotación, deformación y orientación, incluso la manipulación, de pequeños objetos singulares en su dependencia de la frecuencia desde fracciones de 1 Hz hasta la región de varios MHz. La física detrás de estas técnicas está basada en propiedades de impedancia de partículas o células en suspensión. Los efectos electrocinéticos son consecuencia de la interacción entre un campo incidente eléctrico alterno y el momento dipolar inducido en estos objetos. Presentamos en este trabajo los aspectos físicos detrás de los diferentes métodos electrocinéticos, que debido a los avances en la microestructuración litográfica para la fabricación de microcámaras de medición encuentran un creciente interés en la investigación bioquímica y el diagnóstico médico. Particularmente apuntan las actividades de investigación en este campo a la creación de biosensores en un amplio rango de aplicaciones, e incluso a la integración de diferentes aspectos de análisis biomédico y bioquímico en un "laboratorio -sobre-un-chip".

Palabras clave:

Células biológicas, electrocinética, partículas elipsoidales, lab-on-a-chip.

ABSTRACT

The manipulation of nanometer-size biological cells or macromolecules (e.g. DNA) is an essential approach in recent nanotechnology, -hybride of biology, chemistry and engineering-, which pretends the assembly of functional bionanostructures by means of a mechanical positioning of its components. On the other hand provides the manipulation of these objects for a biomedical analysis and size separation into certain populations. Electrokinetic techniques at low frequency allow to study aggregation, rotation, deformation, and orientation, including manipulation, of small single objects in a wide frequency range between 1 Hz up to several MHz. The physics behind

these techniques is based on impedance properties of particles or cells in suspension. The electrokinetic effects are consequence of the interaction between an incident electric a.c.-field and the induced dipole moment of the dielectric objects. In the present paper we outline physical aspects behind different electrokinetic methods. The advanced state of lithographic techniques allows to make micro chambers suitable for both biochemical investigation and medical diagnostics. In particular point research activities in this field toward the fabrication of biosensors in wide range of applications, including the integration of different biomedical and biochemical analysis aspects within a single "lab-on-a-chip".

Key Words:

Biological cells, Electrokinetics, Ellipsoidal particles, Lab-on-a-chip.

1. INTRODUCCIÓN

Los métodos clásicos de impedancia registran la respuesta dieléctrica de una suspensión a un campo eléctrico externo¹⁻⁴. Los sistemas biológicos son complejos con respecto a su composición y estructura geométrica. La interacción con un campo eléctrico involucra por lo tanto múltiples procesos de relajamiento, e inclusive polarizaciones interfaciales con los electrodos⁵⁻⁸. Informaciones útiles respecto a las propiedades dieléctricas se obtienen solamente, si cada proceso de relajamiento puede ser extraído del comportamiento total del sistema. Son indispensables para este fin mediciones sobre un amplio rango de frecuencias y con una alta resolución. Los métodos electrocinéticos con campos eléctricos alternos a baja frecuencia están actualmente, y en creciente grado, sustituyendo las técnicas comunes de impedancia⁹⁻¹¹. La razón principal consiste en la alta resolución de estos métodos referente a los parámetros eléctricos de objetos singulares, basados en sus principios de medición diferentes. Los métodos electrocinéticos determinan o aplican efectos de fuerza, que surgen de la interacción entre un momento dipolar inducido en un objeto y el campo eléctrico externo. El análisis microscópico de movimientos de partículas o células en función de la frecuencia del campo eléctrico permite estudios tanto de traslación y rotación, como de deformación, orientación y agregación de partículas o células singulares¹²⁻¹⁴.

Los mecanismos responsables para los procesos de relajamiento grandes a baja frecuencia incluyen el efecto MAXWELL-WAGNER¹⁵ y el efecto interfacial de polarización¹⁶. El anterior efecto ocurre en partículas, que son compuestas de un material aislante, cubiertas con una capa de mate-

rial conductivo, que resulta en una permitividad compleja efectiva, y que depende de los volúmenes relativos y sus propiedades dieléctricas. Para su descripción se aplican fórmulas de mixtura¹⁷, que se basan en el cálculo del potencial interno y externo de partículas esféricas dispersas¹⁸ o en muestras con geometrías elípticas, e incluso cilíndricas¹⁹. Establecidos sobre la teoría MAXWELL-WAGNER-SILLARS (MWS) de la polarización interfacial²⁰⁻²¹, y considerando solamente partículas esféricas, la fórmula de mixtura para la función dieléctrica de la suspensión resulta en

$$\epsilon_{sus}^* = \epsilon_{liq}^* \left[2 \frac{\epsilon_{sph}^*}{\epsilon_{liq}^*} - 2p \left(\frac{\epsilon_{sph}^*}{\epsilon_{liq}^*} \right) \right] \left[2 \frac{\epsilon_{sph}^*}{\epsilon_{liq}^*} - 2p \left(\frac{\epsilon_{sph}^*}{\epsilon_{liq}^*} \right) \right]^{-1} \quad (1)$$

donde ϵ_{sus}^* es la permitividad dieléctrica compleja de las partículas esféricas suspendidas, ϵ_{liq}^* se refiere al medio de suspensión, y p es la fracción de volumen, que constituyen las partículas dispersadas. Los métodos basados en suspensiones detectan muchas partículas en un instante y pueden lograr así un significado estadístico dentro de cortos tiempos de medición. Son útiles también para partículas submicrométricas, que no permiten una detección visual. No obstante, si se observa por ejemplo un ensanchamiento de un proceso de dispersión determinado, no será posible asociarlo o con las propiedades de cada partícula singular o con la dispersión de la partícula dentro de la población de partículas suspendidas. Además, la teoría MWS de polarización lleva a resultados erróneos, si las superficies de las partículas contienen una densidad de carga eléctrica alta.

Aunque cualquier respuesta dieléctrica es basada en el mismo principio de polarización interfacial y puede por tanto ser descrito por una teo-

ría unificada, las propiedades de partículas singulares se presentan más claramente en sus efectos electrocinéticos. La razón para esto consiste en el hecho, que estos efectos son consecuencia de la diferencia de la polarizabilidad entre el medio de suspensión y las partículas, mientras la técnica de impedancia simplemente determina la permitividad dieléctrica integral de la suspensión^{*} como señala la ecuación (1).

2. EFECTOS ELECTROKINÉTICOS

Las características de los campos eléctricos aplicados determinan esencialmente, cuál de los varios efectos electrocinéticos ocurre. Esto se refiere a campos homogéneos o inhomogéneos, tanto como a campos rotativos o traslativos, más a la inducción de los momentos dipolares, es decir, de las fuerzas correspondientes. En la Figura 1 se presenta la actuación de campos eléctricos homogéneos sobre una partícula singular, que técnicamente se realiza entre las placas planas de una capacitancia como contactos eléctricos. Los efectos electrocinéticos son diferentes, si se expone la partícula a un campo eléctrico inhomogéneo, como se muestra en la Figura 2. Las relaciones de fase del campo eléctrico en cuatro contactos, que rodean la partícula en una microcámara, resulta en el efecto de electro-rotación^{22,23}. Su realización esquemática se muestra en la Figura 3. Finalmente se puede generar un campo eléctrico traslativo con un arreglo especial de contactos, donde las partículas no solamente se mueven en forma traslatoria, sino dependiendo de sus propiedades dieléctricas sufren fuerzas diferentes, que las separan en dirección vertical sobre el arreglo de contactos (Figura 4). Este método es conocido como técnica de *'field flow fractionation'*^{24,25}.

3. POLARIZACIÓN Y FUERZA DE CAMPO

Los efectos de polarización de células biológicas o partículas son aplicados para su manipulación, entrapamiento, fusión e incluso transfección. El conocimiento de los parámetros externos e internos, que afectan la polarización, es por tanto indispensable para la descripción de los efectos esperados. Para células biológicas, los cambios en la polarización más pronunciados, dependiendo de la frecuencia en un campo eléctrico externo, resultan de efectos estructurales. Modelos dieléctricos consideran las carac-

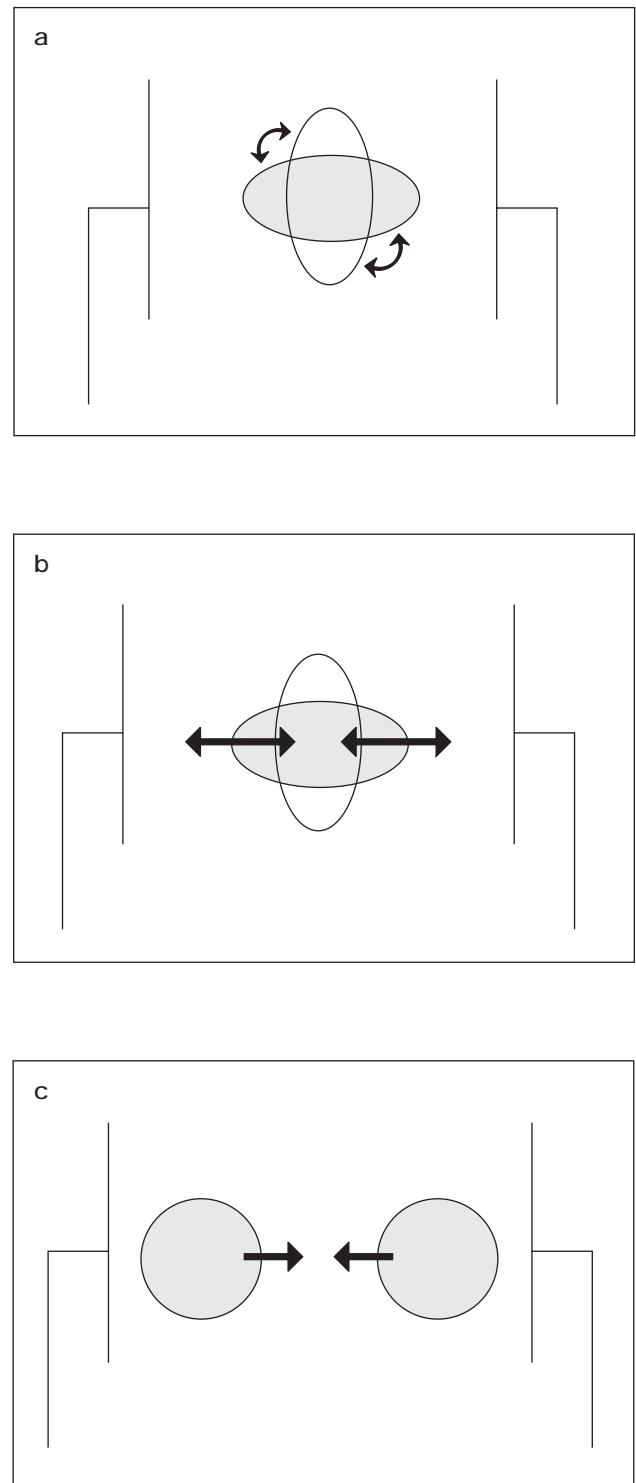
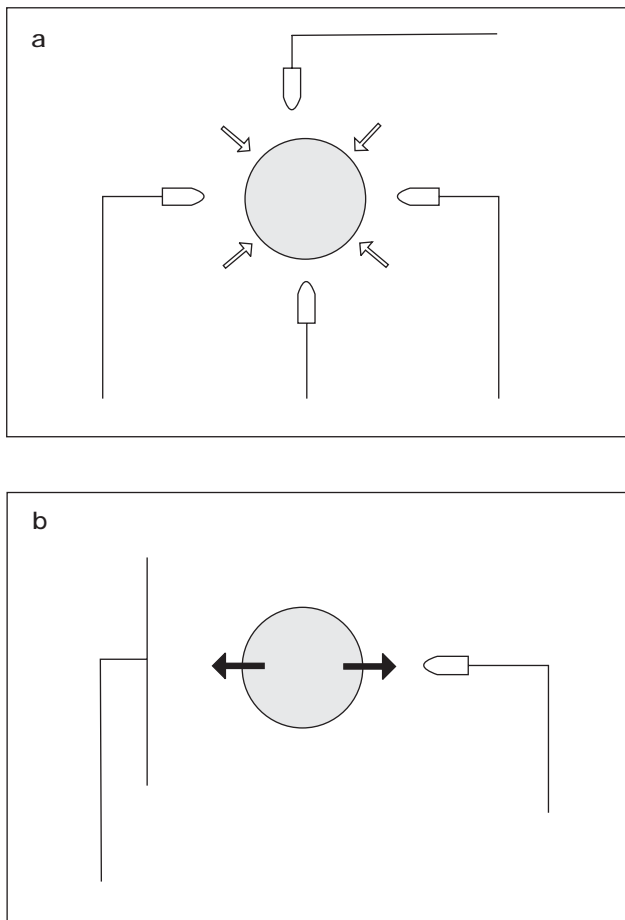


Figura 1. Presentación esquemática de efectos dieléctricos en campos homogéneos eléctricos alternos. (a) Orientación de una celda no-esférica; (b) Deformación (elongación y compresión); (c) Atracción entre varias partículas. El campo eléctrico homogéneo se genera con dos contactos planos (capacitancia de capas planas).



(a) Entrapamiento de células o partículas
 (b) Dielectroforesis
 Campos inhomogéneos se generan con una combinación de contactos placa-punta.

Figura 2. Efectos electrocinéticos en un campo eléctrico inhomogéneo.

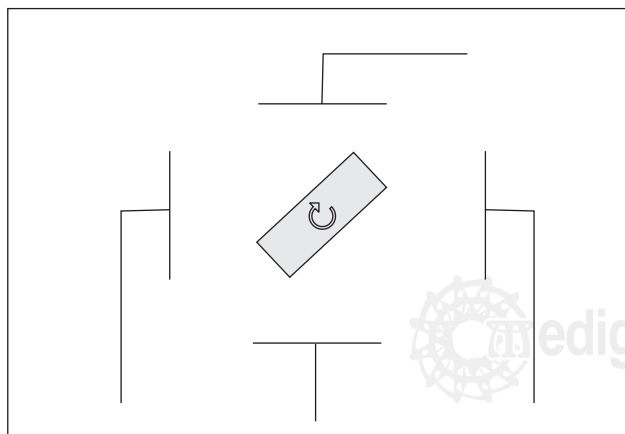


Figura 3. La rotación de una partícula suspendida se realiza con un arreglo de 4 contactos eléctricos.

terísticas de células suponiendo geometrías esféricas o elipsoidales^{26,27}, y recientemente también cilíndricas¹⁹. Existen dos casos extremos para la polarizabilidad de células biológicas al sumergirlas en un medio con conductividad eléctrica baja: o su polarizabilidad es mucho menor que la del medio o viceversa. El primer caso aplica para frecuencias bajas, donde la membrana aísla al contenido de la célula. Con creciente frecuencia se disminuye el efecto de la membrana, y la conductividad alta del (por ejemplo) cytoplasma domina la polarización, como se muestra en la Figura 5. Las fuerzas generadas por las capas de polarización resultan en una compresión (caso b en Figura 5) o en una elongación de la célula esférica. Si la partícula tiene una geometría no-esférica, aparte de las fuerzas de deformación resulta una reorientación tal, que el eje mayor de la partícula se alinea con el campo externo eléctrico (consulte Figura 1a). Un arreglo de los contactos eléctricos externos como placa-punta (viz. Figura 2) genera un campo eléctrico inhomogéneo y consecuentemente un desequilibrio de las fuerzas de polarización entre los dos hemisferios de la esfera (Figura 5) con el efecto, que la célula se mueve hacia la región del campo eléctrico alto o en dirección opuesta, dependiendo del grado de su polarizabilidad relativa al medio de suspensión. Como la última depende también de la frecuencia del campo eléctrico, esta dirección puede ser controlada y aprovechada en el experimento. La técnica lleva el nombre de dielectroforesis en el arreglo de con-

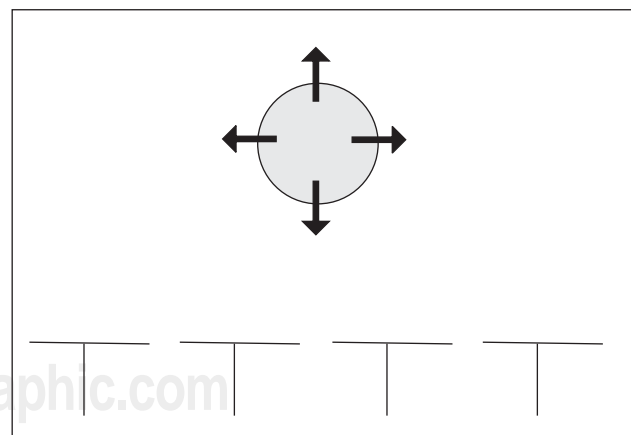


Figura 4. Esquema de un sistema de dielectroforesis con onda viajera. No solamente una fuerza traslatoria actúa, sino la partícula puede levitarse de la cadena de contactos eléctricos.

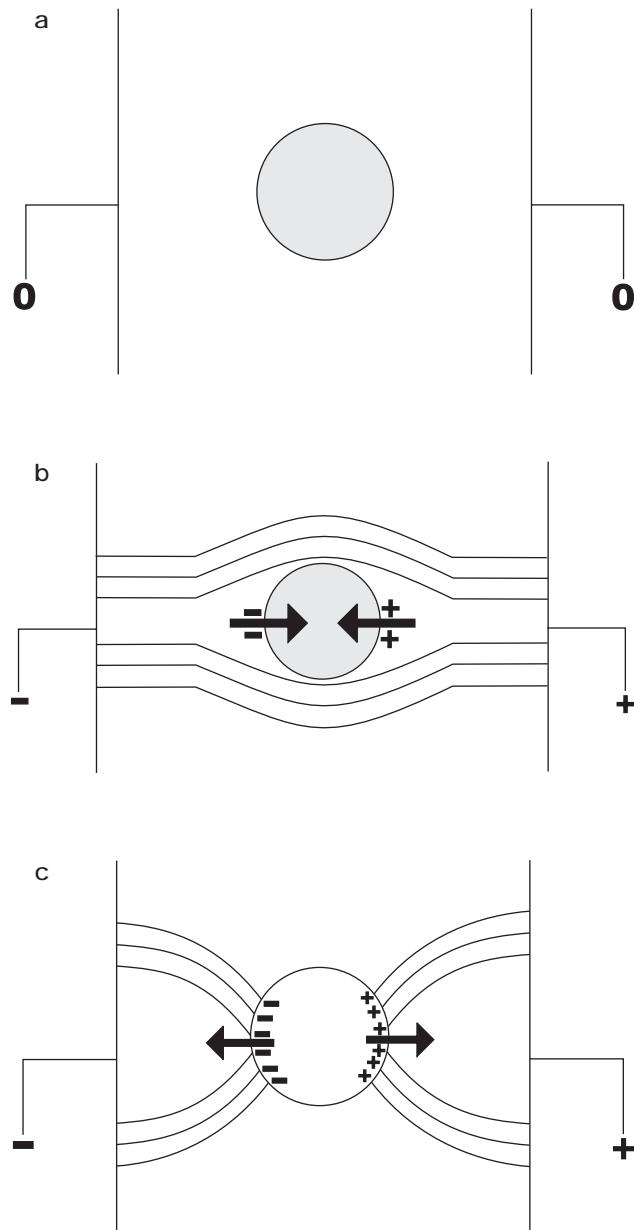


Figura 5. La acción de fuerza y distribución del campo sobre una célula con geometría esférica. (a): sin aplicación de un campo, y en un campo eléctrico homogéneo a bajas (b) y altas (c) frecuencias. El medio de suspensión es de baja conductividad eléctrica. Los dos casos extremos de polarizabilidad tienen analogía con una 'burbuja de aire' y a una 'esfera metálica' en un campo magnético.

tactos mostrado en la Figura 2b. Con el uso de cuatro contactos (viz. Figura 2a) se puede mover la célula (o las células en el caso de una población mayor) hacia el centro, o despoblar el centro, dependiendo de la frecuencia aplicada.

3.1 DIELECTROFORESIS

En campos eléctricos alternos, y referente a su distribución en el espacio inhomogéneo, se calcula la fuerza promediada en tiempo $\langle \vec{F} \rangle$ sobre una partícula dieléctrica por

$$\vec{F} = \frac{1}{2} \text{Re} \{ \vec{m} \cdot \nabla E^* \} \quad (2)$$

donde \vec{m} es el momento dipolar inducido, ∇E^* es el gradiente del conjugado complejo del campo eléctrico externo, Re denota la parte real del producto escalar. \vec{m} es proporcional al volumen de la partícula. El campo eléctrico externo E con su frecuencia circular ω se escribe cómodamente como

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{j\omega t}, \quad (1)^{1/2} \quad (3)$$

y tomado la permitividad del medio alrededor de la célula como $\epsilon_0 \epsilon_m$, se llega a la fuerza de dielectroforesis (DEP) sobre una partícula elipsoide

$$\vec{F}_{DEP} = \epsilon_0 \epsilon_m V \text{Re} \{ K(\omega) \} |E_{rms}|^2 \quad (4)$$

El componente en dirección x del factor Clausius-Mossotti, $K(\omega)$, es

$$K(\omega)_x = \left(\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right) / \left[\frac{\epsilon_m^* - \epsilon_0^*}{\epsilon_m^* + 2\epsilon_0^*} \right] n_x \quad (5)$$

Las permitividades ϵ_p^* de la partícula, y ϵ_m^* del medio de suspensión son números complejos, mientras ϵ_0 es la común constante dieléctrica del vacío ($\epsilon_0 \cdot \mu_0 \cdot c^2 = 1$, c es la velocidad de luz, μ_0 permeabilidad magnética del vacío). n_x es el factor de depolarización en dirección x paralelo al campo eléctrico externo²⁸. Esferoides poseen dos ejes iguales, y la tercera puede tomar valores entre cero (disco infinitamente delgado) e infinito (cilindro infinitamente largo; 'aguja'). Tres ejes iguales corresponden a la esfera. Suponiendo que este tercer eje se orienta paralelo al campo eléctrico externo, los factores de depolarización toman valores $n_x = 1; 1/3; 0$ para el disco delgado, la esfera y el cilindro largo, respectivamente. Para cilindros cortos y discos gruesos, que no pueden ser representados por esferoides, se desarrolló un procedimiento de aproximación¹⁹. Uno de los ejemplos más llamativos al respecto lo forman los 'rouleaux',

que son agregaciones de eritrocitos en forma de los llamados 'coin stacks'²³.

La relación entre la conductividad eléctrica σ de un medio y su permitividad real ϵ se expresa por

$$j(\sigma / \omega \epsilon) \quad (6)$$

El factor Clausius-Mossotti (CM) constituye una medida para la polarizabilidad efectiva de una partícula, y depende a través de n_x fuertemente de su forma geométrica, pero también debido según la ecuación (5) a la frecuencia del campo eléctrico externo. Variaciones de este factor (CM) con la frecuencia modifican la fuerza, que actúa sobre una determinada partícula. La fuerza $\langle F_{DEP} \rangle$ mueve la partícula hacia la región del campo (inhomogéneo) fuerte, es decir, hacia el electrodo de punta, si $Re\{K(\omega)\} > 0$. En caso contrario, la fuerza es orientada en dirección del campo eléctrico decreciente, si $Re\{K(\omega)\}$ es negativo. Obviamente definen estas diferencias un protocolo de separación de partículas con diferente tamaño (V) y geometría (n_x). Comparamos en calidad de ejemplo una partícula esférica de radios r ($n_x = 1/3$) con una partícula larga (ℓ) en forma de cilindro ($n_x = 0$), se reconocen las diferencias en las fuerzas dielectroforéticas, cuya dirección depende además de la frecuencia aplicada (viz. ecuación 5):

$$F_{DEP \text{ esfera}} = 2 r^3 \epsilon_o \epsilon_m^* \text{Re} \left[\frac{p}{p^*} \frac{m}{m^*} \right] |E|^2 \quad (7)$$

$$F_{DEP \text{ cilindro}} = \frac{r^2 \ell}{3} \epsilon_o \epsilon_m^* \text{Re} \left[\frac{p}{p^*} \frac{m}{m^*} \right] |E|^2 \quad (8)$$

Se pueden encontrar regiones de frecuencia, en que la fuerza sobre un tipo de partícula es positiva, mientras sobre el otro tipo de partícula es negativa, lo que explicaría su separación en el espacio de la cámara de experimentación. Una evaluación de la ecuación (7) lleva a la Figura 6. La fuerza dielectroforética es mayor para elipsoides largos ($s = \ell / r = 30$) comparada con la esfera ($s = 1$). Sin embargo, tiene importancia mayor el hecho, que la dirección de la fuerza se reserva en regiones de diferentes frecuencias para diferentes longitudes de partículas. Esto permite (como ejemplo) una separación en el espacio de partí-

culas esféricas dentro de una población de partículas cilíndricas.

El campo eléctrico rotativo sobre los electrodos de la celda de Figura 3 puede inducir un momento dipolar rotativo en la célula biológica. Cualquier proceso de dispersión causa un desplazamiento espacial de fase entre el vector de campo externo y el momento dipolar inducido, dando lugar a un torque, que pone la célula en rotación permanente en el sentido de rotación del campo externo, o en su contra sentido.

3.2 ELECTORROTACIÓN

En analogía al cálculo de la fuerza $\vec{F} = (\vec{P}) \vec{E}$, que lleva con la parte real del vector de polarización \vec{P} a la ecuación (1), se encuentra para un campo rotativo \vec{E} el torque \vec{T} proporcional a la parte imaginaria de la polarización \vec{P} . El torque rotacional promedio en campos eléctricos con polarización circular sobre una partícula con momento dipolar \vec{m} es

$$\vec{T} = \frac{1}{2} \text{Im} \vec{m} \vec{E} \quad (9)$$

Con las mismas denominaciones dadas en la ecuación (2, 3, 4), se llega a

$$\vec{m} = \epsilon_o \epsilon_m^* V K(\omega) \vec{E} \quad (10)$$

$$\epsilon_o \epsilon_m V [K^r(\omega)_x, jK^i(\omega)_x, K^r(\omega)_y, jK^i(\omega)_y, K^r(\omega)_z, jK^i(\omega)_z] \vec{E} \quad (11)$$

(i , r , parte imaginaria y, real, respectivamente). El campo eléctrico de la ecuación (2) tiene sus componentes E_x, E_y, E_z paralelo al mismo sistema ortogonal de \vec{m} . Circulando en el plano x-y con la amplitud E_o , tenemos

$$E_y = jE_x; E_y^* = jE_x^*; E_z = 0 \quad (12)$$

En los casos prácticos, uno de los ejes principales del elipsoide siempre es vertical al plano de campo, el componente k (sea x, y) del torque será

$$T_k = \frac{1}{2} \epsilon_o \epsilon_m^* V E_o^2 K(\omega)_x K(\omega)_y k \quad (13)$$

Para una partícula con geometría elipsoidal aplica el factor Clausius-Mossotti según la ecuación (4). No obstante son solamente las partes imaginarias $K^i(\omega)_x$ y $K^i(\omega)_y$ según la ecuación (5), determinan la dependencia en frecuencia del torque sobre la partícula. Por su proporcionalidad al torque será suficiente dibujar la parte imaginaria del factor Clausius-Mossotti para reconocer la fuerza en dependencia de la frecuencia, que

experimenta una partícula. En la Figura 7 se puede apreciar, que el torque tiene un máximo (aquí) en el rango de 10 megahertz, dependiendo además de la longitud del elipsoide, inducido con $s = 1$ para una esfera de radius r , y extendiendo el eje paralelo al plano de campo por factores $s = 2, 3, \dots$. Valores mayores de $s = \ell / r$ corresponden a una elipsoide larga con el mismo radius r de la esfera. No solamente se detecta un

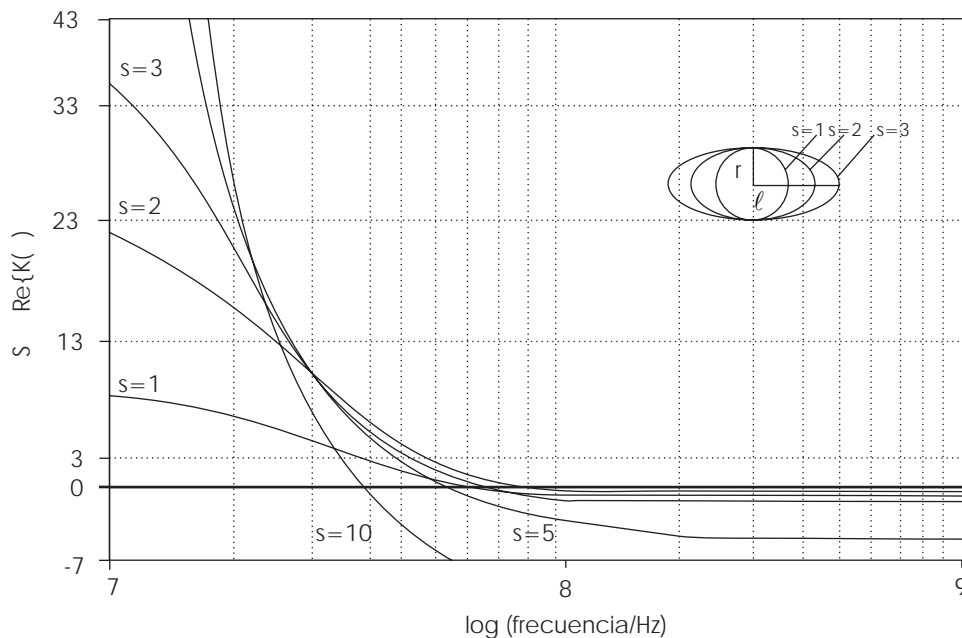


Figura 6. La fuerza vs la frecuencia del campo eléctrico inhomogéneo en el espectro de dielectroforesis para partículas elipsoides con diferente largo ℓ de su eje mayor, descrita por el parámetro $s = \ell / r$ y manteniendo constante el radio r . La fuerza dielectroforética es proporcional a la parte real del factor Clausius-Mossotti. En el cálculo se usó $\sigma_m = 0.01$ S/m; $\epsilon_m = 80$; $\sigma_p = 0.45$ S/m; $\epsilon_p = 52$.

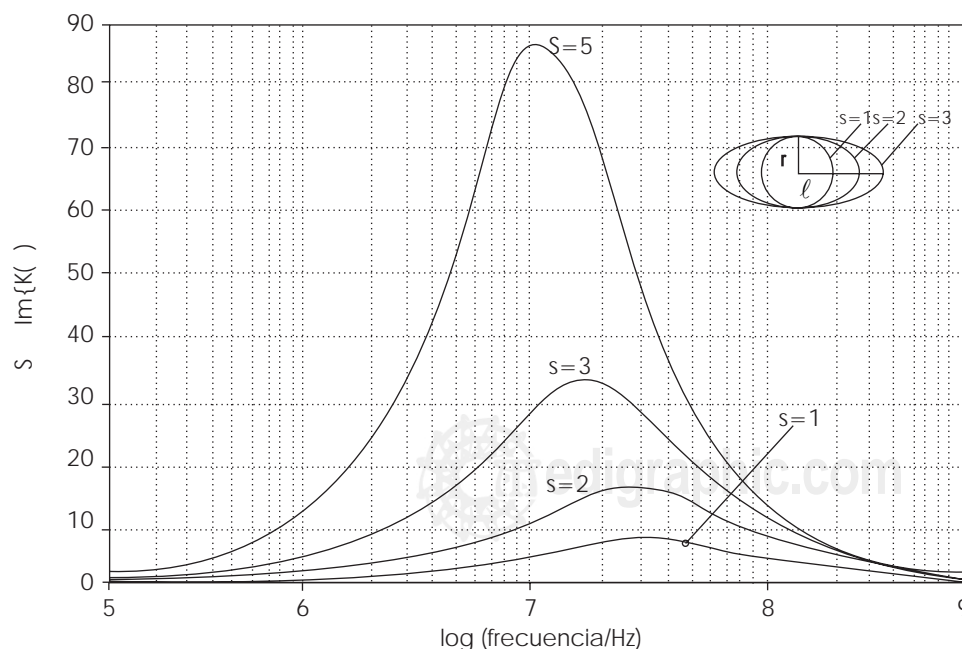


Figura 7. El torque vs la frecuencia del campo eléctrico en el espectro de electrorrotación para partículas elipsoides con diferente largo ℓ de su eje mayor, descrito por el parámetro $s = \ell / r$ y manteniendo constante el radio r . El torque sobre la partícula es proporcional a la parte imaginaria del factor Clausius-Mossotti. ($\sigma_m = 0.01$ S/m; $\epsilon_m = 80$; $\sigma_p = 0.45$ S/m; $\epsilon_p = 52$)

aumento del torque con la longitud ℓ del elipsoide, sino también un corrimiento de su máximo hacia frecuencias menores.

4. CONCLUSIONES

En general, los diferentes métodos de espectroscopia dieléctrica muestran tanto ventajas como desventajas en su comparación mutua. Los métodos clásicos de suspensiones detectan propiedades de muchas partículas en un solo turno de medición y asumen un significado estadístico mayor. Sin embargo, los sistemas biológicos muchas veces son complejos en su composición y estructura geométrica de las partículas involucradas. Los espectros dieléctricos vs la frecuencia del campo eléctrico aplicado pueden contener múltiples procesos de relajamiento, y para una interpretación correcta se requiere la identificación de cada uno de ellos. Interacciones entre las partículas y con los electrodos de la cámara de medición frecuentemente dificultan este procedimiento. Un aspecto positivo más de esta técnica es su potencial también para partículas sub-microscópicas, que en el caso de partículas singulares puede ser restringido al rango de partículas microscópicas. No obstante, resulta una ventaja clara de los métodos electrocinéticos para el hecho, que la geometría y las características estructurales de las partículas bajo observación son conocidas. Como se ha visto en los dos ejemplos tratados aquí, esto es un prerrequisito para el correcto modelo geométrico (factor de depolarización) y la deducción de las propiedades del objeto en estudio. Los avances en la tecnología microelectrónica referente a la transferencia de estructuras finas sobre un sustrato a través de la fotolitografía ha dado lugar a cámaras de medición con arreglos de microelectrodos altamente precisos. Una desventaja mayor de los métodos de partículas singulares, a saber, el rango limitado de la conductividad del medio de suspensión y de la frecuencia, ha sido levantada. La descripción de efectos novedosos de dispersión al nivel de células singulares²⁹ es uno de sus logros. Particularmente aprovecharán las técnicas 'lab-on-a-chip' efectos electrocinéticos para un eficiente y confiable diagnóstico médico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pauly H, Schwan HP. Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. Z. Naturforsch. 14b: 125-131. (in German) 1959.
2. Foster KR, Schwan HP. Dielectric properties of tissue In: Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields" C. Polk and E. Postow, editors. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. 1996: 25-102.
3. Asami KT, Hanai, Koizumi N. Dielectric approach to suspensions of ellipsoidal particles covered with a shell in particular reference to biological cells. Jpn J Appl Phys 1980; 19: 359-365.
4. Jonscher AK. The universal dielectric response: A review of data and their new interpretation, Physics of thin films. Acad Press N.Y., 1980; 11: 205-317.
5. Gimsa JP, Eppmann, Pruger B. Introducing phase analysis light scattering for dielectric characterization: measurement of traveling-wave pumping. Biophys J 1997; 73: 309-316.
6. Fuhr GU, Zimmermann U, Lucas K. High-frequency electric field trapping of individual human spermatozoa Hum. Report 1998; 13: 136-141.
7. Sukhorokoz VL, Mussauer H, Zimmermann U. The effect of electrical deformation forces on the electroporabilization of erythrocyte membranes in low- and high-conductivity media. J Membr Biol 1998; 163: 235-245.
8. Fuhr G, Zimmermann U, Shirley SG. Cell motion in time-varying fields: Principles and potential. In: Electromanipulation of cells. Zimmermann U, Neil GA, editors. Boca Raton, New York, London, Tokyo. 1996: 259-328.
9. Jones TB. Electromechanics of Particles. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, 1995.
10. Kakutani TS, Shibata, Sugai M. Electrorotation of nonspherical cells: theory for ellipsoidal cells with an arbitrary number of shells. Bioelectrochem Bioenerg 1993; 31: 131-145.
11. Stoylov SP. Electric polarization of polyelectrolyte and colloid media: dielectric versus electro-optic approach. Biophys Chem 1996; 58: 165-172.
12. Pastushenko V, Kuzmin PI, Chizmadzhev YA. Dielectrophoresis and electrorotation of cells: unified theory for spherically symmetric cells with arbitrary structure of membrane. Biol Mem 1998; 5: 65-78 (in Russian).
13. Sauer FA, Schlegl RW. Torques exerted on cylinders and spheres by external electromagnetic fields. A contribution to the theory of field-induced cell rotation. In: Interactions between electromagnetic fields and cells. Chiabrera A, Nicolini C, Schwan HP, editors. Plenum Press, New York. 1985; 203-251.
14. Engelhardt H, Gaub H, Sackmann E. Viscoelastic properties of erythrocyte membranes in high-frequency electric fields. Nature 1984; 307: 378-380.
15. Wagner KW. Arch. Elektrotech. 1984; 2: 371.
16. Schwan HP. Linear and nonlinear electrode polarization and biological materials. Annals of Biomedical Engineering 1992; 20: 269-288.
17. Looyenga H. Dielectric constants of heterogeneous mixture. Physica 1965; 31: 401-406.
18. Takashima S. Electrical properties of biopolymers and membranes. IOP, Philadelphia, PA. 1989.
19. Zehe A, Ramirez A. The depolarization field in polarizable objects of general shape. Rev Mex de Física 2002; 48(5): 427-431.
20. Polevaya Yu, Ermolina I, Schlesinger M, Ginzburg BZ, Feldman Yu. Time domain dielectric spectroscopy of human cells. II. Normal and malignant white blood cells. Biochim Biophys Acta 1999; 1419: 257-271.
21. Ermolina I, Polevaya Yu, Feldman Yu. Analysis of dielectric spectra of eukaryotic cells by computer modeling. Eur Biophys J 2000; 29: 141-145.

22. Gascoyne PRC, Becker FF, Wang XB. Numerical analysis of the influence of experimental conditions on the accuracy of dielectric parameters derived from electrorotation measurements. *Bioelectrochem Bioenerg* 1995; 36: 115-125.
23. Zehe A, Ramirez A, Starostenko O. Dielectrophoretic field-fractionation of rouleaux formed of human erythrocytes: A feasibility study. *Rev Mex Ing Biomédica* 2003; 1.
24. Hagedorn R, Fuhr G, Muller T, Gimsa J. Traveling-wave dielectrophoresis of microparticles. *Electrophoresis* 1992; 13: 49-54.
25. Pastushenco V, Kuzmin PI, Chizmadzhev Yu A. Dielectrophoresis and electrorotation: a unified theory of spherically symmetrical cells. *Stud Biophys* 1985; 110: 51-57.
26. Sebastian JL, Muñoz S, Sancho M, Miranda JM. Analysis of cell geometry, orientation and cell proximity effects on the electric field distribution from direct R. F. Exposure. *Phys Med Biol* 2001; 46, 213-225.
27. Irimajiri A, Hanai T, Inouye A. A dielectric theory of 'Multi-Stratified Shell' model with its applications to a lymphoma cell. *J Theor Biol* 1979; 78; 251-269.
28. Landau LD, Lifschitz EM. *Elektroynamik der Kontinua*. Vol. 8. Akademie-Verlag, Berlin. (in German), 1985.
29. Zehe A et al. Dielectric dissipation resonances of human blood due to forced low-frequency cell oscillations, Technical Report, BUAP, (to be published), 2003.