

CAPITOLO 4

Elettroforesi, dielettroforesi, magnetoforesi e dielettromagnetoforesi

Contenuti:

4.1 Introduzione	2
4.2 Elettroforesi	2
4.2.1 Mezzi di supporto	2
4.2.2 Controllo del pH	2
4.2.3 Campo elettrico	3
4.2.4 Modello per l'elettroforesi	3
4.2.5 Apparati per elettroforesi	4
4.2.6 Quantificazione dell'efficacia della separazione	4
4.3 Dielettroforesi	5
4.3.1 Confronto fra principio elettroforetico e dielettroforetico	5
4.3.2 Modello per la dielettroforesi	6
4.4 Elettroforesi e dielettroforesi cellulare	9
4.4.1 Polarizzabilità cellulare	9
4.4.2 Riscaldamento per effetto Joule	9
4.4.3 Effetti dovuti all'interazione diretta con il campo	9
4.4.4 Elettroporazione	10
4.4.5 Formazioni di catene cellulari	10
4.5 Magnetoforesi	10
4.5.1 Proprietà dei campi magnetici nella materia: cenni	10
4.5.2 Magnetoforesi: principio di base	13
4.5.3 Magnetoforesi di globuli rossi	13
4.6 Dielettromagnetoforesi	14
4.6.1 Dielettromagnetoforesi: principio di base	14
4.6.2 Dielettromagnetoforesi centripeta	16
Riferimenti bibliografici	19

4.1 Introduzione

Il presente capitolo descrive aspetti di base relativi alle seguenti tecniche per indagini analitiche di soluzioni o sospensioni contenenti sostanze biologiche: elettroforesi, dielettroforesi, magnetoforesi e dielettromagnetoforesi. Tali tecniche sono tipicamente usate, in particolare, per effettuare separazioni di differenti sostanze, quali molecole o cellule. Le sezioni seguenti descrivono separatamente ciascuna di tali tecniche.

4.2 Elettroforesi

Si definisce *elettroforesi* il movimento di una sostanza avente una carica elettrica netta, che sia sottoposta ad un campo elettrico. In ambito biomedico l'elettroforesi rappresenta una tecnica utilizzata per separare molecole biologiche presenti in una soluzione, quali ad esempio amminoacidi, proteine, acidi nucleici o cellule. La tecnica elettroforetica si basa sull'applicazione di un campo elettrico all'interno del quale migrano le biomolecole; ciò è possibile se esse possiedono una carica netta, ad esempio dovuta a gruppi ionizzabili.

La tecnica più elementare per realizzare una elettroforesi consiste nel porre la soluzione in esame fra due elettrodi tra i quali viene stabilita una differenza di potenziale elettrico. In un sistema di questo tipo, però, il moto delle molecole non è dovuto esclusivamente alla *migrazione sostenuta dal campo elettrico*, ma anche alla *diffusione*. Ciò impedisce una sufficiente discriminazione delle diverse biomolecole. Per tale motivo, gli apparati elettroforetici comunemente utilizzati presentano degli opportuni accorgimenti, come descritto nelle sezioni seguenti.

4.2.1 Mezzi di supporto

Al fine di ridurre i moti dei soluti per semplice diffusione, si utilizza tipicamente un *gel* quale mezzo di supporto per la soluzione da analizzare. I gel sono tipicamente costituiti da una matrice macromolecolare che, pur consentendo il trasporto di biomolecole al suo interno, ha proprietà semisolide. Un gel è infatti assimilabile ad una spugna, i cui pori sono però di dimensioni molecolari. Esso può assorbire una grande quantità di fluido, senza disciogliersi (ossia senza che si rompano i legami del proprio reticolo). L'uso di un gel come mezzo di supporto per elettroforesi ha il vantaggio di diminuire il coefficiente di diffusione dei soluti e di limitare anche eventuali moti convettivi.

Il *gel di poliacrilammide* è il materiale più usato per elettroforesi. E' facile da preparare ed è stabile. In base alla quantità di agente reticolante usato per la sua preparazione, è possibile controllare la dimensione media dei pori risultanti. Esso è trasparente nel visibile e nell'ultravioletto, risultando pertanto utile per eseguire ad esempio spettrofotometrie in tempo reale, quali tecniche usate per seguire l'evoluzione del processo elettroforetico stesso (come meglio chiarito nel seguito). Un altro tipo di composto impiegato è il *gel di agar*. Esso rappresenta il supporto preferenziale ad esempio per l'*immuno-elettroforesi*. Anch'esso è trasparente ed è poco costoso. Talvolta sono utilizzati come supporto anche *grani di amido (polisaccaride) pressati*, che trovano impiego per la separazione e l'isolamento ad esempio di *isoenzimi*.

4.2.2 Controllo del pH

Nelle analisi elettroforetiche è fondamentale il controllo del pH; da esso dipende infatti il grado di dissociazione dei gruppi ionizzabili, e quindi il numero di cariche elettriche presenti sulle biomolecole.

E' opportuno ricordare a tale riguardo che ogni tipo di molecola è caratterizzata da un proprio *punto isoelettrico*, definito come il valore del pH per il quale la molecola non reca alcuna carica elettrica netta. Quindi, se una molecola si trova nel proprio punto isoelettrico, essa non migra se inserita in un campo elettrico esterno. Pertanto, è possibile effettuare una separazione di differenti biomolecole sulla base dei loro differenti valori del punto isoelettrico, oltre che in base alla quantità di carica o al peso molecolare.

Il pH stabilito nella soluzione non deve tuttavia causare la denaturazione delle molecole in esame. Per controllare l'acidità della soluzione che impregna il gel si utilizzano *soluzioni buffer* (o *soluzioni tampone*), in grado di mantenere il pH costante. La soluzione buffer non deve reagire con le molecole da separare e pertanto occorre scegliere il tampone adeguato.

4.2.3 Campo elettrico

Nell'elettroforesi viene utilizzata *corrente continua*. A temperatura ambiente il campo elettrico imposto è generalmente dell'ordine di 10 V/cm. Al crescere dell'intensità del campo applicato, si inducono velocità di migrazione crescenti, quindi separazioni più veloci. Tuttavia, per campi elevati occorre una particolare cautela a causa dell'elevato riscaldamento provocato per effetto Joule, potenzialmente pericoloso per l'integrità delle biomolecole in soluzione (come ad esempio nel caso di denaturazioni di proteine). Per evitare inconvenienti di questo tipo si adottano comunque tecniche di raffreddamento della soluzione (come descritto nel seguito).

La lunghezza di un supporto elettroforetico può raggiungere in alcuni casi anche valori di 20-30 cm, per cui le tensioni da applicare per ottenere il campo elettrico desiderato possono essere elevate (dell'ordine di 100 V). A tali livelli di tensione, gli elettrodi danno luogo ad *elettrolisi della soluzione*. Per tale motivo gli elettrodi sono realizzati in materiale inerte, tipicamente platino, e sono usualmente isolati dal mezzo in cui si svolge l'elettroforesi.

4.2.4 Modello per l'elettroforesi

La migrazione per elettroforesi di una biomolecola avente massa m_i e carica q_i può essere descritta in termini di un semplice modello classico, già presentato nel capitolo 4 in relazione al processo di conduzione ionica (e al quale si rimanda per maggiori dettagli). La forza elettroforetica \vec{F}_{ef} consiste semplicemente nella forza di Coulomb che agisce sulla biomolecola a seguito del campo elettrico \vec{E} applicato:

$$\vec{F}_{ef} = q_i \vec{E} \quad (5.1)$$

Tale forza si somma ad una forza d'attrito viscoso, che risulta proporzionale, secondo un coefficiente di attrito viscoso b_i , alla velocità v_i della biomolecola. La forza viscosa riduce progressivamente l'accelerazione della molecola, determinando la seguente espressione della velocità (capitolo 4):

$$v_i(t) = \frac{q_i E}{b_i} \left(1 - e^{-\frac{b_i}{m_i} t} \right) \quad (5.2)$$

Il fenomeno è caratterizzato dalla seguente costante di tempo meccanica:

$$\tau = \frac{m_i}{b_i} \quad (5.3)$$

Ad esempio, per macromolecole in soluzione τ può assumere valori caratteristici dell'ordine di $\tau = 10^{-12}$ s, mentre la durata tipica del processo elettroforetico può avere un ordine di grandezza pari a $t = 1$ ora = 3600 s. In casi analoghi all'esempio appena considerato, nell'Eq. (5.2) il termine esponenziale può essere trascurato rispetto all'unità, ottenendo:

$$v_i(t) \cong \frac{q_i}{b_i} E = u_i E \quad (5.4)$$

dove u_i rappresenta la *mobilità elettrica della biomolecola i -esima*. Assumendo che quest'ultima sia schematizzabile con una sfera di raggio r_i , che si muova in un fluido con viscosità η_f , la formula di Stokes (capitolo 3)

$$b_i = 6\pi\eta_f r_i \quad (5.5)$$

fornisce un'espressione per la mobilità:

$$u_i = \frac{q_i}{6\pi\eta_f r_i} \quad (5.6)$$

4.2.5 Apparati per elettroforesi

Esistono differenti tipologie di apparati per elettroforesi. Essi si differenziano in base alla disposizione geometrica e alle dimensioni del mezzo di supporto attraverso il quale avviene l'elettromigrazione. Sono possibili ad esempio disposizioni orizzontali o verticali, pannelli piatti o insiemi di condotti cilindrici. La forma e le dimensioni delle camere elettroforetiche sono usualmente determinate dall'efficacia dell'apparato di raffreddamento, che tipicamente viene impiegato per ridurre il riscaldamento dovuto all'effetto Joule. A tale riguardo si sottolinea che molti apparati elettroforetici utilizzano sistemi di capillari. La Fig. 5.1 mostra la rappresentazione di un apparato per elettroforesi verticale.

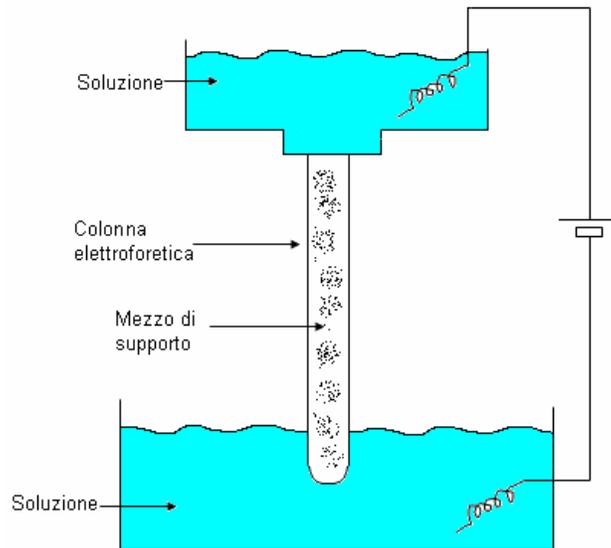


Fig. 5.1. Rappresentazione schematica di un apparato per elettroforesi.

4.2.6 Quantificazione dell'efficacia della separazione

L'efficacia di una separazione elettroforetica può essere eseguita impiegando diversi metodi di analisi. Ad esempio, se la tecnica impiegata permette di raccogliere in fasi distinte le sostanze separate, è naturalmente possibile analizzare ciascuna di tali fasi con metodiche standard di analisi chimico-fisica. In alcuni casi, la separazione viene monitorata durante lo svolgimento del processo elettroforetico stesso; a tal fine, il moto di un grande numero di molecole può essere analizzato indagando ad esempio le variazioni spettrali, causate dall'effetto Doppler, dello scattering di una luce laser che investe il campione.

In molti casi, la distribuzione delle specie separate può essere misurata direttamente sul supporto, quantificando ad esempio l'assorbimento di luce ultravioletta da parte del campione. Alcuni metodi molto comuni, specialmente per la separazione di proteine, prevedono la precipitazione delle sostanze sulla matrice di supporto (ad esempio imbevendo il supporto stesso di acidi diluiti). Il precipitato può avere un grande peso molecolare e può intorpidire la zona di precipitazione, permettendo così un'indagine ottica. Molto spesso, al fine di aumentare la visibilità di tali zone, si utilizzano dei coloranti. In particolare, il supporto è imbevuto di una soluzione di un

colorante in grado di essere assorbita in modo specifico dal precipitato. L'analisi del supporto colorato può avvenire o per fotografia (se il colore del precipitato è nel visibile) o mediante spettrofotometri.

Indipendentemente dalla tecnica specifica impiegata per la discriminazione delle sostanze separate, il risultato di un'indagine elettroforetica consiste nella determinazione di un pattern o di un profilo di distribuzione in funzione della distanza di migrazione. L'accuratezza di separazione delle tecniche elettroforetiche è elevata. Ad esempio, senza l'uso di un mezzo di supporto è possibile separare proteine i cui punti isoelettrici differiscono di circa 0.01 unità di pH; accuratezze maggiori possono essere ottenute mediante l'utilizzo di gel, che, come ricordato, limitano la diffusione. L'elettroforesi può essere pertanto considerata come un'ottima tecnica di indagine analitica caratterizzata da alta risoluzione, discreta riproducibilità e in grado di fornire informazioni su dimensioni, forma e composizione di specifiche macromolecole presenti in una soluzione.

4.3 Dielettroforesi

Si definisce *dielettroforesi* il fenomeno secondo il quale una forza viene applicata ad una particella dielettrica mediante l'interazione con un campo elettrico non uniforme spazialmente (gradiente di campo). Tale forza non richiede che la particella abbia una carica netta, bensì che la particella sia polarizzabile. Infatti, la forza nasce dall'interazione tra il campo e il momento di dipolo della particella. Inoltre, se il momento di dipolo è indotto dal campo applicato, la particella si muove nella direzione del campo stesso (*dielettroforesi*), mentre se la particella possiede un momento di dipolo proprio si può creare una rotazione della particella (*elettrorotazione*). Da ciò si evince che qualsiasi particella può esibire attività dielettroforetica in presenza di campi elettrici. Tuttavia, l'intensità della forza dipende da diversi fattori, come ad esempio le proprietà elettriche della particella e del mezzo, la forma e le dimensioni della particella e l'intensità e la frequenza del campo applicato. Pertanto, l'impiego di campi elettrici con caratteristiche specifiche può consentire manipolazioni selettive di particelle differenti.

In campo biomedico la dielettroforesi è largamente utilizzata per la separazione di micro-particelle biologiche, come ad esempio cellule. Il moto di particelle polarizzabili disposte in un campo elettrico non uniforme venne descritto per la prima volta da Pohl a metà del secolo scorso. Tale tecnica consentì i primi studi sulle cellule, permettendo di separare e classificare varie popolazioni in base alla diversa polarizzabilità e alle diverse dimensioni.

4.3.1 Confronto fra principio elettroforetico e dielettroforetico

La necessità di impiego di campi elettrici spazialmente non uniformi per dielettroforesi si evince dalle schematizzazioni riportate in Fig. 5.2. In essa sono poste a confronto le seguenti situazioni: elettroforesi di una particella che abbia carica netta e che sia posta in un campo uniforme (Fig. 5.2a); particella neutra posta in un campo uniforme (Fig. 5.2b); dielettroforesi di una particella neutra posta in un campo non uniforme ottenuto impiegando elettrodi con dimensioni differenti (Fig. 5.2c).

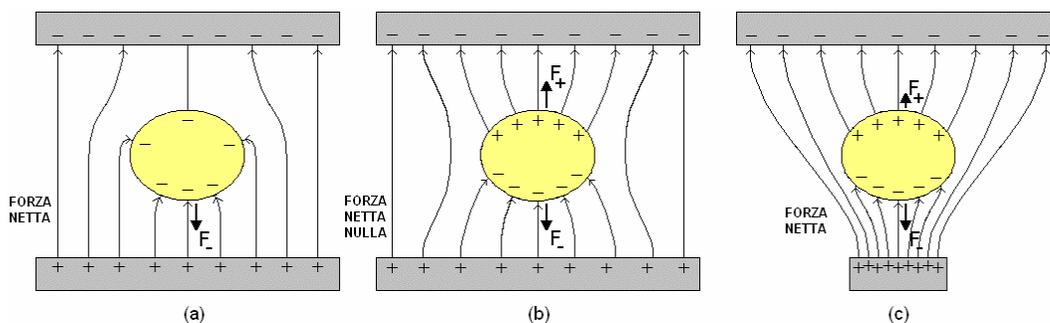


Fig. 5.2. Particella carica (a) e neutra (b) in un campo elettrico uniforme; particella neutra in un campo non uniforme (c).

Una particella con carica netta subisce in un campo uniforme una forza elettroforetica netta; nell'esempio

rappresentato in Fig. 5.2a, tale forza coincide con la forza F_- agente sulla carica netta negativa della particella. Se un campo uniforme viene invece applicato ad una particella neutra, si ha che il dipolo indotto risulta in una forza netta nulla; come si osserva infatti nell'esempio di Fig. 5.2b, in questo caso si ha che la forza F_- agente sul baricentro della carica negativa del dipolo ha la stessa intensità ma verso opposto della forza F_+ agente sul baricentro della carica positiva ($|F_-| = |F_+|$) e pertanto la particella non si muove. Affinchè una particella neutra subisca una forza netta non nulla è necessario applicare un campo elettrico non uniforme; in questo caso, infatti, la particella subisce una forza netta orientata verso la regione di massimo campo elettrico, ossia dove si ha una maggiore densità di campo. Dall'esempio riportato in Fig. 5.2c si riscontra che, essendo l'intensità del campo differente sulle due estremità della particella, sui baricentri della carica negativa e positiva agiranno due forze con diversa intensità ($|F_-| > |F_+|$), che daranno origine ad un moto dielettroforetico.

4.3.2 Modello per la dielettroforesi

Si consideri una particella neutra posta in un campo non uniforme generato da un condensatore con armature parallele di differenti dimensioni (Fig. 5.3a). La particella risulta polarizzata dal campo, dando origine ad un dipolo sulle cui estremità risultano applicati due valori differenti del campo (\vec{E}_1 ed \vec{E}_2), essendo esso non uniforme (Fig. 5.4a).

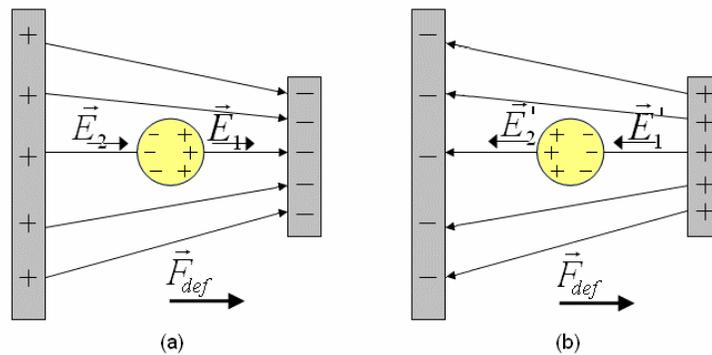


Fig. 5.3. Particella neutra polarizzabile posta in un in un campo non uniforme. La differenza di potenziale stabilita tra le armature del condensatore è opposta nei due casi (a) e (b).

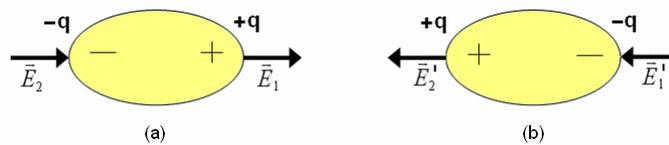


Fig. 5.4. Dipolo indotto nella particella nei due casi di Fig. 5.3.

Si instaura pertanto una forza netta dielettroforetica \vec{F}_{def} agente sul dipolo. Essa è data dalla somma delle forze (\vec{F}_+ e \vec{F}_-) impresse sui baricentri di carica del dipolo (Fig. 5.4a):

$$\vec{F}_{def} = \vec{F}_+ + \vec{F}_- = q\vec{E}_1 - q\vec{E}_2 \tag{5.7}$$

Si osservi che, invertendo il segno della differenza di potenziale stabilita tra le armature del condensatore, cambia il verso del campo elettrico e la particella si polarizza in modo opposto (Fig. 5.3b e 5.4b). Tuttavia la forza \vec{F}_{def} alla quale è soggetta la particella rimane inalterata sia in intensità che in verso (Fig. 5.3b). Infatti, poichè vale:

$$\begin{cases} \vec{E}'_1 = -\vec{E}_1 \\ \vec{E}'_2 = -\vec{E}_2 \end{cases} \quad (5.8)$$

Si ha che nella situazione descritta in Fig. 5.3b e 5.4b la forza netta risultante \vec{F}'_{def} è data da:

$$\vec{F}'_{def} = \vec{F}'_+ + \vec{F}'_- = q\vec{E}'_2 - q\vec{E}'_1 = -q\vec{E}_2 + q\vec{E}_1 = \vec{F}_{def} \quad (5.9)$$

Pertanto, una particella neutra posta in un campo spazialmente non uniforme è soggetta ad una forza dielettroforetica che è sempre diretta verso la regione di massimo valore del campo. Fissato un riferimento cartesiano x, y, z , il dipolo è individuato dai vettori posizione rappresentati in Fig. 5.5.

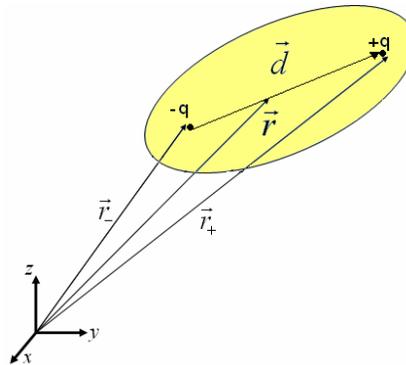


Fig. 5.5. Identificazione della posizione ed orientazione del dipolo rispetto ad un riferimento cartesiano.

Conseguentemente, la forza agente sul dipolo elettrico può essere riscritta nel seguente modo:

$$\vec{F}_{def} = q\vec{E}_{(\vec{r}_+)} - q\vec{E}_{(\vec{r}_-)} = q(\vec{E}_{(\vec{r}_+)} - \vec{E}_{(\vec{r}_-)}) \quad (5.10)$$

I vettori posizione \vec{r}_+ ed \vec{r}_- possono essere espressi in termini di un vettore medio \vec{r} relativo alla posizione del punto intermedio tra i baricentri di carica

$$\begin{cases} \vec{r}_+ = \vec{r} + \frac{\vec{d}}{2} \\ \vec{r}_- = \vec{r} - \frac{\vec{d}}{2} \end{cases} \quad (5.11)$$

Quindi si ha:

$$\begin{cases} \vec{E}_{(\vec{r}_+)} = \vec{E}_{(\vec{r}+\vec{d}/2)} \\ \vec{E}_{(\vec{r}_-)} = \vec{E}_{(\vec{r}-\vec{d}/2)} \end{cases} \quad (5.12)$$

Espandendo le funzioni relative all'Eq. (5.12) in serie di Taylor arrestata al primo ordine in un intorno di $\vec{r} + \vec{d}/2 = \vec{r}$ (ossia per $\vec{d} \rightarrow 0$) si ottiene:

$$\begin{cases} E_{x(\vec{r}+\vec{d}/2)} \cong E_{x(\vec{r})} + \vec{\nabla} E_x|_{\vec{r}} \cdot \frac{\vec{d}}{2} = E_{x(\vec{r})} + \frac{\partial E_x}{\partial x}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_x}{2} + \frac{\partial E_x}{\partial y}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_y}{2} + \frac{\partial E_x}{\partial z}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_z}{2} \\ E_{y(\vec{r}+\vec{d}/2)} \cong E_{y(\vec{r})} + \vec{\nabla} E_y|_{\vec{r}} \cdot \frac{\vec{d}}{2} = E_{y(\vec{r})} + \frac{\partial E_y}{\partial x}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_x}{2} + \frac{\partial E_y}{\partial y}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_y}{2} + \frac{\partial E_y}{\partial z}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_z}{2} \\ E_{z(\vec{r}+\vec{d}/2)} \cong E_{z(\vec{r})} + \vec{\nabla} E_z|_{\vec{r}} \cdot \frac{\vec{d}}{2} = E_{z(\vec{r})} + \frac{\partial E_z}{\partial x}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_x}{2} + \frac{\partial E_z}{\partial y}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_y}{2} + \frac{\partial E_z}{\partial z}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_z}{2} \end{cases} \quad (5.13)$$

e analogamente:

$$\begin{cases} E_{x(\vec{r}-\vec{d}/2)} \cong E_{x(\vec{r})} - \vec{\nabla} E_x|_{\vec{r}} \cdot \frac{\vec{d}}{2} = E_{x(\vec{r})} - \frac{\partial E_x}{\partial x}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_x}{2} - \frac{\partial E_x}{\partial y}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_y}{2} - \frac{\partial E_x}{\partial z}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_z}{2} \\ E_{y(\vec{r}-\vec{d}/2)} \cong E_{y(\vec{r})} - \vec{\nabla} E_y|_{\vec{r}} \cdot \frac{\vec{d}}{2} = E_{y(\vec{r})} - \frac{\partial E_y}{\partial x}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_x}{2} - \frac{\partial E_y}{\partial y}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_y}{2} - \frac{\partial E_y}{\partial z}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_z}{2} \\ E_{z(\vec{r}-\vec{d}/2)} \cong E_{z(\vec{r})} - \vec{\nabla} E_z|_{\vec{r}} \cdot \frac{\vec{d}}{2} = E_{z(\vec{r})} - \frac{\partial E_z}{\partial x}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_x}{2} - \frac{\partial E_z}{\partial y}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_y}{2} - \frac{\partial E_z}{\partial z}|_{\vec{r}} \cdot \frac{d_z}{2} \end{cases} \quad (5.14)$$

Pertanto, sostituendo le Eq. (5.13) e (5.14) nella (5.10) è possibile riscrivere l'espressione della forza dielettroforetica in tal modo:

$$\begin{aligned} \vec{F}_{def} &= q \left[\left(E_x + \vec{\nabla} E_x \cdot \frac{\vec{d}}{2} \right) \hat{i}_x + \left(E_y + \vec{\nabla} E_y \cdot \frac{\vec{d}}{2} \right) \hat{i}_y + \left(E_z + \vec{\nabla} E_z \cdot \frac{\vec{d}}{2} \right) \hat{i}_z \right] - \\ &- q \left[\left(E_x - \vec{\nabla} E_x \cdot \frac{\vec{d}}{2} \right) \hat{i}_x + \left(E_y - \vec{\nabla} E_y \cdot \frac{\vec{d}}{2} \right) \hat{i}_y + \left(E_z - \vec{\nabla} E_z \cdot \frac{\vec{d}}{2} \right) \hat{i}_z \right] = \\ &= q \left[(\vec{\nabla} E_x \cdot \vec{d}) \hat{i}_x + (\vec{\nabla} E_y \cdot \vec{d}) \hat{i}_y + (\vec{\nabla} E_z \cdot \vec{d}) \hat{i}_z \right] = \\ &= q \vec{d} \cdot \vec{\nabla} (E_x \hat{i}_x + E_y \hat{i}_y + E_z \hat{i}_z) \end{aligned} \quad (5.15)$$

Tale espressione, infine, può essere condensata nel modo seguente:

$$\vec{F}_{def} = \vec{P} \cdot \vec{\nabla} \vec{E} \quad (5.16)$$

dove \vec{P} è il momento di dipolo della particella.

4.4 Elettroforesi e dielettroforesi cellulare

La maggior parte delle tipologie di cellule sono ricoperte di gruppi funzionali carichi negativamente in condizioni di pH neutro. Inoltre, se sottoposte a campi elettrici, le cellule si polarizzano. Pertanto, una cellula può essere suscettibile a forze sia tipo elettroforetico che dielettroforetico. In effetti, entrambi tali tipi di forze sono correntemente impiegate per indurre migrazioni e separazioni di cellule all'interno di soluzioni. L'elettroforesi e la dielettroforesi cellulare presuppongono una esposizione delle cellule a campi elettrici, i cui effetti, tuttavia, sono ad oggi poco noti, specialmente ad elevate intensità del campo. Le cellule sono infatti sistemi molto complessi, ancora scarsamente conosciuti. Ciò vale in special modo per quanto riguarda gli effetti dovuti alla applicazione di campi elettrici. A tale riguardo, si menzionano brevemente di seguito alcuni semplici fenomeni relativi ad interazioni tra cellule e campi elettrici.

4.4.1 Polarizzabilità cellulare

La polarizzabilità di una cellula risente di contributi derivanti da differenti compartimenti interni, ciascuno avente una propria cinetica, che risente della frequenza del campo elettrico applicato. Pertanto, applicando campi in alternata è possibile eseguire dielettroforesi utili a discriminare cellule differenti, utilizzando campi con diverse frequenze.

4.4.2 Riscaldamento per effetto Joule

Come noto, l'applicazione di campi elettrici in mezzi conduttori determina una dissipazione di potenza in forma di calore dovuta all'effetto Joule. Nel caso di una cellula, le variazioni termiche indotte possono influire sulla fisiologia cellulare stessa. Per le cellule dei mammiferi, è noto che temperature elevate (oltre i 4 °C sopra il valore fisiologico) possono progressivamente indurre la morte cellulare. Pertanto, nel caso di elettroforesi e dielettroforesi cellulare, una particolare attenzione deve essere dedicata alla progettazione del sistema, al fine di limitare il riscaldamento del campione. Come già ricordato precedentemente, è utile adottare a tale scopo specifiche tecniche di raffreddamento.

4.4.3 Effetti dovuti all'interazione diretta con il campo

Una indicazione approssimativa ma significativa sull'effetto che un campo elettrico applicato ad una cellula può avere sulla variazione del potenziale transmembrana di riposo può essere ottenuta nel modo seguente. Assumendo per la cellula un modello costituito da una sfera ricoperta da una membrana, è possibile dimostrare che un campo avente pulsazione ω può indurre il seguente incremento ΔV_m del potenziale di membrana [1]:

$$|\Delta V_m| = \frac{3}{2} \frac{|\vec{E}|R}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}} \quad (5.17)$$

dove R è il raggio della sfera (cellula) e τ è la seguente costante di tempo:

$$\tau = \frac{RC_m(\rho_{cito} + 1/2\rho_{mezzo})}{1 + Rg_m(\rho_{cito} + 1/2\rho_{mezzo})} \quad (5.18)$$

dove ρ_{cito} e ρ_{mezzo} indicano le resistività rispettivamente del citoplasma e del mezzo extracellulare, mentre C_m e g_m esprimono la capacità specifica [F/m²] e la conduttanza specifica [S/m²] della membrana cellulare. L'Eq. (5.17) suggerisce che per limitare tale effetto è opportuno utilizzare campi elettrici ad elevata frequenza. Al diminuire della frequenza il potenziale di membrana subisce un pericoloso incremento, che raggiunge il suo

valore massimo in continua. Ad esempio, per una cellula con raggio $R=10\ \mu\text{m}$ soggetta ad un campo statico $E_{dc}=100\ \text{V/cm}$ si otterrebbe un incremento di circa 75 mV, ossia avente lo stesso ordine di grandezza del valore di riposo stesso. Pertanto, nel caso di cellule, al fine di limitare tale tipo di effetto è opportuno impiegare campi dinamici e ad elevata frequenza.

4.4.4 Elettroporazione

Come un qualsiasi dielettrico, anche la membrana cellulare presenta una propria *rigidità dielettrica*. Esiste pertanto un valore di limite del campo elettrico oltre il quale essa si “fora”, presentando dei veri e propri *pori* e dando così luogo al fenomeno chiamato *elettroporazione*.

Tale condizione limite non sempre è un evento nefasto. Infatti, l'elettroporazione è talvolta deliberatamente indotta per l'attuazione di manipolazioni cellulari. In particolare, l'elettroporazione è usata in biologia molecolare per introdurre dentro la cellule molecole specifiche (ad esempio farmaci o parti di DNA).

Se l'intensità del campo elettrico applicato e/o la durata dell'esposizione ad esso sono opportunamente scelti, i pori formati da un impulso elettrico possono richiudersi dopo un certo lasso di tempo, durante il quale sono possibili scambi diretti tra i compartimenti intra- ed extra- cellulari. Tuttavia, un'eccessiva esposizione di cellule vive al campo elettrico può causare la loro morte. L'elettroporazione è eseguita mediante l'uso di *elettroporatori*; essi consistono in sistemi che creano una corrente elettrica che viene fatta scorrere all'interno di una soluzione contenente le cellule in esame. La soluzione è inserita all'interno di contenitori di vetro o plastica, equipaggiati con una coppia di elettrodi, tra i quali vengono stabilite alte differenze di potenziale (frequentemente dell'ordine dei kV).

4.4.5 Formazioni di catene cellulari

Applicando un campo elettrico ad un insieme di cellule, i momenti di dipolo in esse indotti tendono ad attrarsi. E' pertanto possibile che si formino delle cosiddette catene cellulari. Questo effetto può essere talvolta benefico (nel caso in cui si desideri promuovere, ad esempio, una fusione cellulare) o deleterio (se si intende operare una separazione tra popolazioni cellulari).

4.5 Magnetoforesi

La *magnetoforesi* è il fenomeno duale alla elettroforesi. Essa infatti consiste in un movimento indotto in una sostanza magnetizzabile, causato da un gradiente spaziale di campo magnetico. Lo studio di sistemi magnetoforetici presuppone la conoscenza delle proprietà dei campi magnetici nella materia. A tale riguardo si richiamano brevemente di seguito alcune nozioni elementari.

4.5.1 Proprietà dei campi magnetici nella materia: cenni

4.5.1.1 Magnetizzazione

Un campo magnetico può indurre nella materia una *magnetizzazione*, così come avviene per la polarizzazione elettrica dovuta ad un campo elettrico. Gli effetti della magnetizzazione variano a seconda dei materiali. Il fenomeno può essere spiegato a livello microscopico dalla presenza di *dipoli magnetici*, che in assenza di un campo magnetico sono disposti in modo casuale entro il materiale. Applicando un campo magnetico, questi tendono ad orientarsi parallelamente al campo stesso, determinando una *polarizzazione magnetica*, espressa da un *momento magnetico di dipolo*. La presenza di dipoli magnetici è dovuta al moto degli elettroni attorno al nucleo; infatti essi producono correnti elettriche tali che ogni atomo possa essere considerato come una spira magnetica infinitesima in grado di generare un campo magnetico e, pertanto, un dipolo magnetico. L'effetto della polarizzazione magnetica è rappresentato dall'intensità e dalla orientazione, rispetto ad esempio ad una terna

cartesiana x,y,z , del vettore *magnetizzazione* $\vec{M}(x,y,z)$. Esso può essere definito come il valore mediato su N particelle dotate di momento magnetico proprio \vec{m} contenute in un volume infinitesimo $dVol$:

$$\vec{M}(x, y, z) = \lim_{\Delta Vol \rightarrow 0} \frac{\Delta N}{\Delta Vol} \langle \vec{m} \rangle = \frac{d\vec{m}}{dVol} \quad (5.19)$$

dove $\langle \vec{m} \rangle$ indica il valore medio dei momento di dipolo delle ΔN particelle contenute nel volume ΔVol . Nel vuoto vale $\vec{M} = 0$.

4.5.1.2 Diamagnetismo, paramagnetismo e ferromagnetismo

A seguito della applicazione di un campo magnetico, materiali diversi rispondono in modo differente. In particolare, si distinguono le seguenti classi di materiali: diamagnetici, paramagnetici e ferromagnetici.

I *materiali diamagnetici* sono sostanze che vengono respinte debolmente da un campo magnetico esterno. In particolare il diamagnetismo si osserva in quei materiali i cui atomi non posseggono un momento di dipolo magnetico proprio. Ne sono esempi l'acqua, il DNA, la maggior parte dei composti organici e alcuni metalli come il rame, l'argento, il mercurio, l'oro e il bismuto.

I *materiali paramagnetici* sono sostanze attratte debolmente da un campo magnetico esterno. In particolare il paramagnetismo si osserva in quei materiali i cui atomi posseggono un momento di dipolo magnetico proprio; quindi si ha un effetto prevalentemente dovuto a polarizzazione magnetica per orientamento. Ne sono esempi l'ossigeno e l'alluminio.

I *materiali ferromagnetici* sono sostanze attratte fortemente da un campo magnetico esterno. Come per i paramagnetici, anche gli atomi dei materiali ferromagnetici hanno un momento magnetico proprio. Tuttavia, i relativi dipoli magnetici hanno un allineamento comune (dovuto ad interazioni di natura quantistica tra atomi vicini). Ne sono esempi la magnetite e numerosi metalli di transizione, quali il ferro (da cui il termine *ferromagnetismo*), il cobalto, il nichel e le loro rispettive leghe. I materiali ferromagnetici diventano a loro volta dei magneti quando vengono immersi in un campo magnetico; ciò infatti determina una orientazione dei momenti magnetici propri delle molecole, parallelamente alla direzione del campo stesso.

4.5.1.3 Induzione magnetica e suscettività magnetica

Per i materiali diamagnetici e paramagnetici, la relazione che lega il vettore campo magnetico \vec{H} al vettore magnetizzazione \vec{M} è di tipo lineare:

$$\vec{M} = \chi_m \vec{H} \quad (5.20)$$

dove χ_m è una costante adimensionale definita *suscettività magnetica*. Il segno di χ_m dipende dal tipo di materiale:

$$\begin{cases} \text{diamagnetici} : \chi_m < 0 \\ \text{paramagnetici} : \chi_m > 0 \end{cases} \quad (5.21)$$

I vettori \vec{H} ed \vec{M} hanno dimensioni pari a A/m. Inoltre, per i materiali diamagnetici e paramagnetici il vettore *induzione magnetica* \vec{B} è legato al vettore campo magnetico \vec{H} dalla seguente relazione:

$$\vec{B} = \mu_0 \mu_r \vec{H} = \mu_0 (1 + \chi_m) \vec{H} \quad (5.22)$$

dove $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ H/m è la permeabilità magnetica del vuoto e $\mu_r = 1 + \chi_m$ è la *permeabilità magnetica relativa* del materiale. Dalla Eq. (5.22) è possibile ricavare le dimensioni del vettore: $[B] = \text{H A} / \text{m}^2 = \text{V s} / \text{m}^2 = \text{Wb} / \text{m}^2 = \text{T}$.

Per i materiali ferromagnetici, le relazioni che legano i vettori \vec{B} , \vec{H} e \vec{M} non sono lineari. Tali materiali infatti

presentano caratteristici *cicli di isteresi* (analogamente a quanto avviene per i materiali ferroelettrici).

4.5.1.4 Diamagnetismo

Nei materiali *diamagnetici* la magnetizzazione è il risultato di alterazioni del movimento degli elettroni nell'orbitale. Infatti, applicando un campo con induzione magnetica \vec{B} ad un elettrone con carica e in moto con velocità \vec{v} si esercita su di esso una forza magnetica $\vec{F} = e\vec{v} \times \vec{B}$. Ciò crea una variazione della forza centripeta dell'elettrone, causando una accelerazione o rallentamento del suo moto nell'orbitale. Questo cambiamento della velocità dell'elettrone modifica il momento magnetico dell'orbitale in una direzione opposta al campo esterno. Tutti i materiali mostrano una risposta diamagnetica in un campo magnetico applicato; tuttavia per i materiali che mostrano anche qualche altra forma di magnetismo (come il paramagnetismo o il ferromagnetismo), il diamagnetismo è completamente sovrastato. Le sostanze che mostrano solo, o per lo più, un comportamento diamagnetico sono definite materiali diamagnetici, o *diamagneti*. I materiali diamagnetici, sono quelli che volgarmente sono considerati "non magnetici". Infatti, essendo tipicamente il diamagnetismo una proprietà debole, i suoi effetti non sono particolarmente evidenti. In particolare, le suscettività dei materiali diamagnetici sono tipicamente ordini di grandezza più piccole rispetto al magnetismo esibito dai paramagneti e ferromagneti. Ad esempio, la suscettività magnetica di un diamagnete come l'acqua è pari a $\chi_m = -9.05 \times 10^{-6}$ a 20 °C. I superconduttori possono essere considerati diamagneti perfetti ($\chi_m = -1$), dato che essi espellono tutti i campi magnetici dal loro interno (fenomeno noto come *effetto Meissner*).

4.5.1.5 Paramagnetismo

Il paramagnetismo è una forma di magnetismo che si riscontra solo in presenza di un campo magnetico applicato esternamente. Infatti, diversamente dai materiali ferromagnetici, i *paramagneti* non trattengono alcuna magnetizzazione in assenza di un campo esterno. Tuttavia, i loro atomi o molecole hanno comunque momenti magnetici (dipoli magnetici) permanenti, anche in assenza di un campo applicato. Questo generalmente è dovuto alla presenza di elettroni spaiati negli orbitali elettronici. Nel paramagnetismo puro, i dipoli non interagiscono l'uno con l'altro e, a causa dell'agitazione termica, risultano orientati in modo casuale in assenza di un campo esterno. Ciò determina un momento magnetico risultante nullo. Quando invece viene applicato un campo magnetico, i dipoli tendono ad allinearsi con il campo stesso, generando un momento magnetico netto non nullo nella direzione del campo. In generale, gli effetti paramagnetici sono modesti, relativamente ai ferromagnetici: per la maggior parte dei paramagneti, l'ordine di grandezza della suscettività magnetica varia tra 10^{-3} e 10^{-5} . Tuttavia, sono possibili anche valori più elevati; ad esempio, paramagneti sintetici quali i cosiddetti *ferrofluidi* possono esibire suscettività magnetiche anche dell'ordine di 10^{-1} .

4.5.1.6 Ferromagnetismo

Il ferromagnetismo è la forma di magnetismo più "consueta", alla quale si è maggiormente abituati dalla comune esperienza quotidiana. Tutti i magneti permanenti sono infatti costituiti da materiali ferromagnetici. Storicamente, il termine *ferromagnete* era usato per qualunque materiale in grado di esibire una magnetizzazione spontanea (momento magnetico netto in assenza di un campo magnetico esterno). Sebbene questa generica definizione sia ancora in uso, esistono oggi formulazioni più raffinate in contesti specifici (non riportate in questa sede). Il ferromagnetismo è dovuto al fatto che lo spin di un elettrone, combinato con il suo momento angolare orbitale, risulta in un momento di dipolo magnetico e crea un campo magnetico. In molti materiali tuttavia il momento di dipolo risultante di tutti gli elettroni è nullo. Atomi con spin spaiati possono invece mostrare un momento magnetico netto non nullo in assenza di un campo esterno. I dipoli permanenti di un materiale ferromagnetico tendono ad allinearsi in parallelo, sia a seguito dell'applicazione di un campo magnetico esterno (paramagnetismo), sia spontaneamente (per effetto quanto-meccanico). Tuttavia, in un materiale ferromagnetico non magnetizzato i dipoli dell'intero materiale non risultano allineati. Piuttosto, essi si organizzano in domini magnetici (*domini di Weiss*) che risultano allineati (magnetizzati) solo localmente. In questo modo, il materiale ha generalmente un momento magnetico netto di scarsa entità. Comunque, se esso è collocato in un campo magnetico esterno abbastanza forte, i domini si orientano parallelamente al campo e

rimangono orientati anche quando esso è rimosso, creando così un magnete permanente. L'intensità di tale magnetizzazione in funzione del campo esterno è descritta da una curva d'isteresi. Sebbene lo stato di domini allineati non esprima una configurazione di minima energia, esso può essere molto stabile. La magnetizzazione netta può essere comunque distrutta da cicli di riscaldamento e raffreddamento del materiale in assenza di un campo esterno. In particolare, al crescere della temperatura aumenta, l'oscillazione termica dei dipoli compete con la loro tendenza ad allinearsi. Quando la temperatura supera una certa soglia, chiamata *temperatura di Curie*, specifica per ogni materiale, si hanno transizioni di fase che tendono a cancellare ogni magnetizzazione spontanea. Tuttavia, il materiale in tali condizioni è comunque in grado di rispondere paramagneticamente a un campo esterno.

4.5.2 Magnetoforesi: principio di base

La Fig. 5.6 illustra il principio della magnetoforesi nel caso di una soluzione acquosa di macromolecole *diamagnetiche*. Esponendo la soluzione ad un gradiente di campo magnetico, sia sul solvente che sulle particelle agiscono forze magnetiche. La differenza tra tali forze magnetiche è descritta dalla seguente relazione [6,7]:

$$\vec{F} = (\chi_s - \chi_w) \vec{\nabla} \left(\frac{B^2}{2\mu_0} \right) \quad (5.23)$$

dove χ_s e χ_w indicano rispettivamente la suscettività magnetica delle macromolecole e dell'acqua. Le macromolecole diamagnetiche nell'acqua possono essere trasportate in una specifica direzione a causa della differente suscettività rispetto all'acqua. In particolare, secondo l'Eq. (5.23) si ha che, a parità di gradiente, il verso di migrazione dipende dal segno della differenza tra le suscettività magnetiche (Fig. 5.6).

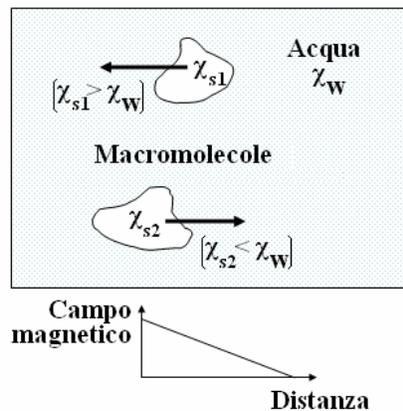


Fig. 5.6. Schematizzazione di una magnetoforesi di macromolecole diamagnetiche in soluzione acquosa.

In base a tale principio è possibile trasportare e separare in una soluzione acquosa differenti sostanze biologiche aventi diverse proprietà magnetiche, come ad esempio cellule, DNA, emoglobina, collagene, ecc. La magnetoforesi di cellule è frequentemente eseguita applicando campi magnetici dell'ordine di 10 T con gradienti di campo dell'ordine di 10-100 T/m. Analogamente all'elettroforesi, anche per la magnetoforesi si hanno durate tipiche aventi ordine di grandezza pari ad 1 ora. Si sottolinea inoltre che, naturalmente, è possibile schematizzare il processo magnetoforetico con un modello analogo a quello precedentemente presentato per l'elettroforesi, prendendo in considerazione le forze di attrito viscoso generate dal moto delle particelle all'interno del fluido.

4.5.3 Magnetoforesi di globuli rossi

A titolo di esempio, si consideri la magnetoforesi di globuli rossi. I globuli rossi umani sono cellule discoidali biconcave (Fig. 5.7), aventi la membrana cellulare trasparente e il citoplasma composto da acqua contenete *emoglobina (Hb)*.

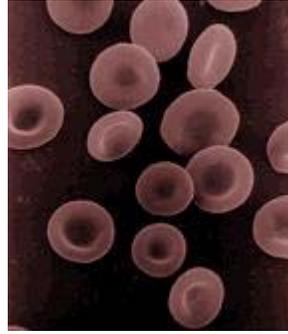


Fig. 5.7. Immagine in falsi colori di globuli rossi al microscopio elettronico a scansione.

Il disco ha un diametro di circa 6-8 μm ed ha uno spessore che da un valore di 2.5 μm , ai bordi, degrada sino a 0.9 μm . L'emoglobina dei globuli rossi trasporta l'ossigeno ed una piccola frazione dell'anidride carbonica prodotta dal metabolismo (20% circa; il resto raggiunge i polmoni disciolta nel plasma sotto forma di carbonati). L'emoglobina è una proteina coniugata molto complessa, formata da otto subunità: quattro gruppi *eme* (con al centro un atomo di Fe^{2+} , che può legare un atomo d'ossigeno), che consiste in un complesso non proteico (anello tetrapirrolico), e quattro catene di *globina* (proteina). Per la presenza del Fe^{2+} , l'emoglobina assume un colore rossastro, che aumenta quando il ferro si combina con l'ossigeno e diminuisce quando la globina si lega con l'anidride carbonica. Ogni globulo rosso contiene 300.000 molecole di emoglobina, per cui ogni globulo rosso può portare 1.200.000 atomi d'ossigeno per volta. La deossi-emoglobina (*deoxyHb*) è paramagnetica, mentre la ossi-emoglobina (*oxyHb*) è diamagnetica. La Tab. 5.1 riporta valori tipici delle principali grandezze magnetoforetiche coinvolte nel trasporto di globuli rossi.

Tab. 5.3.1 Grandezze magnetoforetiche per soluzioni acquose di globuli rossi (da [7]).

Grandezza	Simbolo	Valore	Unità
Raggio idrodinamico di un globulo rosso	r_s	3.85	μm
Volume di un globulo rosso	Vol_s	88.4	μm^3
Viscosità dell'acqua a 20°C	η_w	10^{-3}	Pa s
Coefficiente di attrito tra globulo rosso e acqua a 20°C	$b_s = 6\pi\eta_w r_s$	7.26×10^{-8}	Ns/m = kg/s
Differenza di suscettività tra globulo rosso e acqua	$(\chi_s - \chi_w)Vol_s$	-1.64×10^{-14} (<i>oxyHb</i>) 29.5×10^{-14} (<i>deoxyHb</i>)	mm^3
Gradiente magnetoforetico	$\left \nabla \left(\frac{B^2}{2\mu_0} \right) \right $	1.50×10^2	$\text{kg}/\text{mm}^2/\text{s}^2$
Velocità magnetoforetica di un globulo rosso	v_s	-0.034 (<i>oxyHb</i>) 0.609 (<i>deoxyHb</i>)	$\mu\text{m}/\text{s}$

4.6 Dielettromagnetoforesi

I principi della elettroforesi e dielettroforesi possono essere combinati con quello della magnetoforesi, dando luogo a tecniche combinate, nella quali campi elettrici variabili nel tempo vengono indotti applicando campi magnetici dinamici. Si possono pertanto generare meccanismi di trasporto definiti come *elettromagnetoforesi* o *dielettromagnetoforesi* (il cui significato è implicitamente evidente). A titolo di esempio, si descrive nella presente sezione sia il principio di base per una generica dielettromagnetoforesi, sia la sua applicazione ad una particolare versione di tale tecnica: la cosiddetta *dielettromagnetoforesi centripeta*.

4.6.1 Dielettromagnetoforesi: principio di base

La *dielettromagnetoforesi* consiste in una migrazione di particelle polarizzate da un campo elettrico, indotto da un campo magnetico variabile nel tempo. Al fine di determinare l'espressione della forza a cui una particella è sottoposta in tale situazione, si consideri la generica espressione della forza dielettroforetica ricavata in precedenza:

$$\vec{F}_{def} = \vec{P} \cdot \vec{\nabla} \vec{E} \quad (5.24)$$

Tale espressione può essere riscritta nel modo di seguito esposto. Si considerino le seguenti due identità vettoriali valide per una qualsiasi coppia di vettori \vec{A} e \vec{B} :

$$\begin{cases} \vec{\nabla}(\vec{A} \cdot \vec{B}) \equiv \vec{A} \times (\vec{\nabla} \times \vec{B}) + \vec{B} \times (\vec{\nabla} \times \vec{A}) + (\vec{B} \cdot \vec{\nabla})\vec{A} + (\vec{A} \cdot \vec{\nabla})\vec{B} \\ \vec{\nabla} \times (\vec{A} \cdot \vec{B}) \equiv \vec{A} \vec{\nabla} \cdot \vec{B} + \vec{B} \vec{\nabla} \cdot \vec{A} + (\vec{B} \cdot \vec{\nabla})\vec{A} - (\vec{A} \cdot \vec{\nabla})\vec{B} \end{cases} \quad (5.25)$$

Sottraendo membro a membro tali relazioni, si ottiene:

$$\vec{\nabla}(\vec{A} \cdot \vec{B}) - \vec{\nabla} \times (\vec{A} \times \vec{B}) \equiv \vec{A} \times (\vec{\nabla} \times \vec{B}) + \vec{B} \times (\vec{\nabla} \times \vec{A}) + 2(\vec{A} \cdot \vec{\nabla})\vec{B} - \vec{A} \vec{\nabla} \cdot \vec{B} + \vec{B} \vec{\nabla} \cdot \vec{A} \quad (5.26)$$

Tale espressione può anche essere scritta equivalentemente come:

$$2\vec{A} \cdot \vec{\nabla} \vec{B} \equiv \vec{\nabla}(\vec{A} \cdot \vec{B}) - \vec{\nabla}(\vec{A} \times \vec{B}) - \vec{A} \times (\vec{\nabla} \times \vec{B}) - \vec{B} \times (\vec{\nabla} \times \vec{A}) - \vec{A} \vec{\nabla} \cdot \vec{B} + \vec{B} \vec{\nabla} \cdot \vec{A} \quad (5.27)$$

Eseguendo la seguente sostituzione formale:

$$\begin{cases} \vec{A} \rightarrow \vec{P} \\ \vec{B} \rightarrow \vec{E} \end{cases} \quad (5.28)$$

dove \vec{P} ed \vec{E} indicano i vettori polarizzazione e campo elettrico, rispettivamente, si ottiene:

$$2\vec{P} \cdot \vec{\nabla} \vec{E} \equiv \vec{\nabla}(\vec{P} \cdot \vec{E}) - \vec{\nabla} \times (\vec{P} \times \vec{E}) - \vec{P} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) - \vec{E} \times (\vec{\nabla} \times \vec{P}) - \vec{P} \vec{\nabla} \cdot \vec{E} + \vec{E} \vec{\nabla} \cdot \vec{P} \quad (5.29)$$

Quindi, sostituendo nell'Eq. (5.24), si ha:

$$\vec{F}_{def} = \frac{1}{2} \left[\vec{\nabla}(\vec{P} \cdot \vec{E}) - \vec{\nabla} \times (\vec{P} \times \vec{E}) - \vec{P} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) - \vec{E} \times (\vec{\nabla} \times \vec{P}) - \vec{P} \vec{\nabla} \cdot \vec{E} + \vec{E} \vec{\nabla} \cdot \vec{P} \right] \quad (5.30)$$

La polarizzazione \vec{P} della particella è data da:

$$\vec{P} = \varepsilon_0(\varepsilon_r - 1)\vec{E} \equiv \alpha\vec{E} \quad (5.31)$$

dove ε_r rappresenta la permittività dielettrica relativa della particella. Pertanto, l'Eq. (5.30) può essere riscritta come:

$$\vec{F}_{def} = \frac{1}{2} \left[\vec{\nabla}(\alpha\vec{E} \cdot \vec{E}) - \vec{\nabla} \times (\alpha\vec{E} \times \vec{E}) - \alpha\vec{E} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) - \vec{E} \times (\vec{\nabla} \times \alpha\vec{E}) - \alpha\vec{E} \vec{\nabla} \cdot \vec{E} + \vec{E} \vec{\nabla} \cdot \alpha\vec{E} \right] \quad (5.32)$$

Semplificando, si ha:

$$\vec{F}_{def} = \frac{1}{2} \left[\vec{\nabla} (\alpha \vec{E} \cdot \vec{E}) - 2\alpha \vec{E} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) \right] \quad (5.33)$$

Si considerino a questo punto le due seguenti *equazioni di Maxwell*:

$$\begin{cases} \vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \\ \vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\rho_{lib}}{\epsilon_0 \epsilon_r} \end{cases} \quad (5.34)$$

Per inciso, si consideri che, essendo globalmente neutra ciascuna molecola del sistema in oggetto, risulta nulla la densità di carica netta libera nel sistema ($\rho_{lib}=0$) e quindi si ha:

$$\begin{cases} \vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \\ \vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 \end{cases} \quad (5.35)$$

Sostituendo la prima delle Eq. (5.35) nell'Eq. (5.33) si ottiene:

$$\vec{F}_{def} = \frac{\alpha}{2} \left[\vec{\nabla} (\vec{E} \cdot \vec{E}) + 2\vec{E} \times \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right] \quad (5.36)$$

4.6.2 Dielettromagnetoforesi centripeta

Si consideri un contenitore cilindrico dielettrico contenente una soluzione fisiologica con particelle dielettriche (molecole o cellule) in sospensione. Ci si prefigge lo scopo di indurre uno spostamento di tali particelle senza utilizzare forze di contatto (al fine, ad esempio, di preservare condizioni di sterilità del sistema). In particolare, ci si pone come obiettivo quello di addensare le particelle in una zona della soluzione, utilizzando una tecnica dielettromagnetoforetica. A tale scopo, si consideri l'applicazione al sistema in esame di un campo magnetico uniforme, generato, ad esempio, da due elettromagneti cilindrici (*bobine di Helmholtz*), coassiali con il sistema in oggetto (Fig. 5.8).

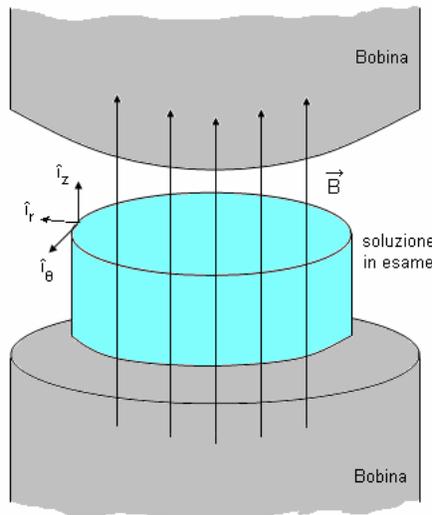


Fig. 5.8. Rappresentazione schematica delle condizioni sperimentali per l’effettuazione di una dielettromagnetoforesi centripeta.

Se la distanza fra le bobine è inferiore o paragonabile al raggio delle stesse, è lecito assumere che nello spazio tra esse il campo magnetico sia spazialmente uniforme. Si assuma, inoltre, che le bobine siano alimentate in modo tale da generare il seguente campo alternato di induzione magnetica:

$$\vec{B}(t) = B_0 \sin(\omega t) \hat{i}_z \quad (5.37)$$

Al fine di ricavare l’espressione della forza dielettroforetica a cui le particelle sono soggette, è necessario valutare il campo elettrico all’interno della soluzione. Si noti che il sistema considerato è a simmetria cilindrica. Pertanto, il campo può essere convenientemente espresso utilizzando un sistema di riferimento di coordinate cilindriche r, θ, z (Fig. 5.8):

$$\vec{E} = E_r \hat{i}_r + E_\theta \hat{i}_\theta + E_z \hat{i}_z \quad (5.38)$$

In ogni punto ad una data distanza $r = \bar{r}$ dall’origine, il campo elettrico è uniforme, ossia:

$$\left. \frac{\partial E_\theta}{\partial \theta} \right|_{\bar{r}} = 0 \quad (5.39)$$

Inoltre, il campo elettrico non ha componenti lungo z , ossia:

$$E_z = 0 \quad (5.40)$$

Si consideri una circonferenza C interna alla soluzione, centrata sull’asse del sistema e che racchiuda una superficie S . Applicando il teorema di Stokes (si veda l’Appendice) al campo elettrico in tale situazione si ottiene:

$$\iint_S (\vec{\nabla} \times \vec{E}) \cdot \vec{n} dS = \oint_C \vec{E} \cdot d\vec{l} \quad (5.41)$$

Si ha pertanto per la prima delle Eq. (5.35):

$$-\frac{\partial}{\partial t} \iint_s \vec{B} \cdot \vec{n} dS = \oint_c E_\theta d\theta \quad (5.42)$$

ossia:

$$-\frac{\partial}{\partial t} (B(t)\pi r^2) = 2\pi r E_\theta \quad (5.43)$$

pertanto:

$$E_\theta = -\frac{r}{2} \omega B_0 \cos(\omega t) \quad (5.44)$$

La seconda delle Eq. (5.35) in coordinate cilindriche diventa:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 \Rightarrow \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (rE_r) + \frac{1}{r} \frac{\partial E_\theta}{\partial \theta} + \frac{\partial E_z}{\partial z} = 0 \quad (5.45)$$

Quindi, considerando le Eq. (5.39) e (5.40) dalla Eq. (5.45) rimane:

$$\frac{\partial}{\partial r} (rE_r) = 0 \quad (5.46)$$

ossia:

$$r \frac{\partial E_r}{\partial r} + E_r = 0 \quad (5.47)$$

La soluzione di questa equazione fornisce:

$$E_r = 0 \quad (5.48)$$

Si osservi che tale risultato è in accordo con la seguente condizione al contorno: sulla periferia del recipiente, la densità di corrente ($\vec{J} = \sigma \vec{E}$) deve necessariamente essere circonferenziale; non può essere radiale perché ciò significherebbe che esistono delle cariche uscenti, ma questo è in contrasto con l'equazione di conservazione della carica. Si conclude che il campo elettrico ha solo la componente tangenziale E_θ :

$$\vec{E} = -\frac{r}{2} \omega B_0 \cos(\omega t) \hat{i}_\theta \quad (5.49)$$

Pertanto, la forza dielettroforetica diviene:

$$\begin{aligned} \vec{F}_{def} &= \frac{\alpha}{2} \left[\vec{\nabla} \left(\frac{r^2}{4} \omega^2 B_0^2 \cos^2(\omega t) \right) + 2 \left(-\frac{r}{2} \omega B_0 \cos(\omega t) \right) \hat{i}_\theta \times B_0 \omega \cos(\omega t) \hat{i}_z \right] = \\ &= \frac{\alpha}{2} \left[\frac{d}{dr} \left(\frac{r^2}{4} \omega^2 B_0^2 \cos^2(\omega t) \right) - r \omega^2 B_0^2 \cos^2(\omega t) \hat{i}_r \right] = -\frac{\alpha}{4} r \omega^2 B_0^2 \cos^2(\omega t) \hat{i}_r \end{aligned} \quad (5.50)$$

Si conclude quindi che, comunque siano disposte inizialmente le particelle, esse subiscono una forza radiale centripeta e proporzionale alla distanza dal centro della soluzione. Tale forza tende ad addensare le particelle verso il centro del sistema.

Come esempio di applicazione, si menziona che tale tecnica può essere impiegata per addensare in una stessa zona cellule diverse, al fine ad esempio di aumentare la probabilità di una loro fusione.

Riferimenti bibliografici

- [1] Voldman J. (2006) Electrical forces for microscale cell manipulation, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8, 425–54.
- [2] Brewer J.M. (1988) Electrophoresis, In *Enciclopedia of medical devices and instrumentation*, Vol. 2, Webster J.G. Editor, Wiley, 1139-1145.
- [3] Plummer D.T. (1971) *An introduction to practical biochemistry*, McGraw-Hill, 90-107.
- [4] Melville D.P., Roath F.S. (1975) Direct magnetic separation of red cells from whole blood, *Nature*, 255, 706
- [5] Melville D.P., Roath F.S. (1975) High gradient magnetic separation of red cells from whole blood, *IEEE Transactions on Magnetics*, 11, 1701- 1704.
- [6] Iwasaka M., Ueno S. (1998) Optical measurements of magnetophoresis of macromolecules, *IEEE Transactions on Magnetics*, 34, 2129 – 2131.
- [7] Zborowski M., Oстера G.R., Moore L.R., Milliron S., Chalmers J.J. and Schechtery A.N. (2003) Red blood cell magnetophoresis, *Biophysical Journal*, 84, 2638-2645.
- [8] Iwasaka M., Miyakoshi J., Ueno S., (2001) Magnetophoresis of diamagnetic cells and microorganisms in a culture medium, *IEEE Transactions on Magnetics*, 37, 2644 – 2646.
- [9] Kolin A. (1954) Centripetal and centrifugal electromagnetophoresis, *Journal of Applied Physics*, 25, 1065-1066.