

Espectroscopia eléctrica aplicada para determinar osteoporosis en muestras óseas

Fernando Ireta M., René Martínez C., Eduardo Morales S.,
Bárbara González R.

Universidad de Guanajuato,
División de Ingenierías campus Irapuato-Salamanca,
México

`fireta@salamanca.ugto.mx`

Resumen. La osteoporosis es considerada como la pérdida de calcio en los hueso, en el presente trabajo se muestran los resultados al desarrollar una técnica que emplea espectroscopia de impedancia eléctrica para determinar la pérdida de calcio en muestras óseas, las cuales se sometieron a un proceso de descalcificación químico controlado, a fin de simular el proceso de osteoporosis o pérdida de calcio y probar que es posible medir una variación de la pérdida de calcio en dichas muestras, empleando la técnica de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica, la cual relaciona los parámetros del valor real y reactivo de la impedancia con respecto a la frecuencia de la señal de entrada, en un diagrama Cole-Cole.

Palabras clave: Espectroscopia eléctrica, osteoporosis.

Electrical Spectroscopy Applied to Determine Osteoporosis in Bone Samples

Abstract. Osteoporosis is considered as the loss of calcium in the bones, in the present work the results are shown by developing a technique that uses electrical impedance spectroscopy to determine the loss of calcium in bone samples, which were subjected to a process of controlled chemical decalcification, in order to simulate the process of osteoporosis or calcium loss and prove that it is possible to measure a variation of the loss of calcium in said samples, using the technique of Electrical Impedance Spectroscopy, which relates the parameters of the real and reactive value of the impedance with respect to the frequency of the input signal, in a Cole-Cole diagram.

Keywords: Electrical spectroscopy, osteoporosis.

1. Introducción

La osteoporosis ya no es considerada una enfermedad que afecta solo a las mujeres ni una consecuencia natural del envejecimiento; porejemplo en los hombres se sabe que son más los que presentan fracturas de la cadera debidas a osteoporosis que las mujeres. La pérdida mineral ósea se produce tanto en el hueso trabecular como en el cortical y la fortaleza de un hueso depende de la cantidad de masa mineral que posee. Una disminución en la densidad mineral ósea (DMO) causa la subsecuente reducción de la fuerza del hueso y un incremento del riesgo de fractura.

Las técnicas de medición más comunes del DMO, puede ser Ultrasonido o por Rayos X, por lo que se propone una nueva técnica para la medición de la perdida de calcio que es por medio de un método no invasivo a través de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica, y en el estado del arte no hay un estudio similar al propuesto en este proyecto.

La Espectroscopia de Impedancia Eléctrica es una técnica no invasiva que se basa en el principio de que los tejidos se comportan como conductores o dieléctricos de la corriente eléctrica dependiendo de su composición [1], por ejemplo un tejido blando es buen conductor; y un tejido óseo se considera [5] como un buen aislante

El principio de medida usado en la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) es que la impedancia eléctrica de un medio con estas características es función de la frecuencia y viene usualmente descrita por (1) como sigue:

$$Z = Re(Z) + j Im (Z), \quad (1)$$

donde $Re(Z)=Z'$ es la parte real de la impedancia eléctrica Z y $Im(Z)=Z''$ la parte imaginaria de Z . El valor de $Im(Z)$ es normalmente negativo lo que indica efectos capacitivos, y dado que el hueso es un tejido biológico este no contiene la parte inductiva, y si representamos la parte imaginaria de la impedancia eléctrica de un sistema biológico respecto a la parte real de dicha impedancia a varias frecuencias (diagrama Cole-Cole), la figura resultante se aproxima a un semicírculo figura 1 según un modelo bien descrito en la literatura [2], donde el intervalo de frecuencia es por lo general de 40Hz a 100 MHz.

Este diagrama correspondería generalmente a un circuito eléctrico RC en paralelo como el de la figura 2, donde R_s es la resistencia de contacto de los electrodos y R_1, C_1 nos representa el compuesto de los cual esta formado el material, al que se le aplico la prueba de espectroscopia de impedancia eléctrica.

La Espectroscopia de Impedancia Eléctrica[3] puede separar las diferentes contribuciones a la respuesta de impedancia de un material[4], mediante la medición de dicha respuesta en un intervalo amplio de frecuencias, ya que los materiales tienen una constante de tiempo la cual indica que llega un momento en que el material deja de ser capaz de seguir al campo eléctrico, y ya no contribuye al valor de la impedancia; y es cuando se dice ocurre una dispersión o relajación, por lo que el diagrama de la figura 1 corresponde a un componente que tiene una sola relajación.

Una relajación se obtiene por medio de un circuito equivalente RC paralelo. La frecuencia de relajación corresponde a la condición de igualdad de R y C del circuito (2):

$$R = 1/\omega_x, \quad (2)$$

en donde R y C son los componentes del circuito equivalente y ω_x es la frecuencia angular donde $\omega_x = 2\pi f_x$, y en la impedancia como función de la frecuencia, la relajación aparece como un máximo, centrado en ω_x .

Así, se obtiene un semicírculo en el plano complejo o gráficas Cole-Cole la figura 3 corresponde al diagrama Cole-Cole de un material con dos relajaciones.

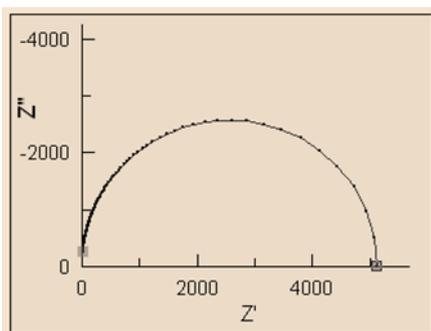


Fig. 1. Diagrama Cole-Cole.

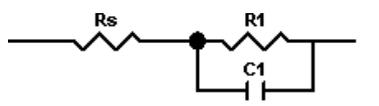


Fig. 2. Circuito eléctrico equivalente del semicírculo de la figura 1.

2. Desarrollo

Para el estudio de espectroscopia de muestras de hueso descalcificado, primeramente se cortaron 10 muestras de hueso de cerdo de aproximadamente 3mm de espesor con un diámetro de 2 cm, las cuales se lavaron y se quita el máximo de cartílago y sangre, después se colocaron en una solución descalcificante la cual es como la empleada por los patólogos para descalcificar. Que consiste de una solución compuesta de HCl (ácido clorhídrico) concentrado al 0.001 % usándose la cantidad de 0.002 ml y 10 ml de H₂C=O (formol), y se controla el tiempo que actúa la solución descalcificante.

Una vez descalcificadas las piezas, estas son lavadas con agua destilada para neutralizar el ataque y son observadas en el microscopio para ver como han sido descalcificadas, en la figura 4 se aprecia una muestra ósea sin descalcificar y otra con 5 días de descalcificación.

El siguiente paso es que las muestras son secadas en un horno a 25°C por 5 días hasta lograr un peso constante, el cual es medido para compararlo con el peso de la pieza sin descalcificar y así conocer la cantidad de pérdida de Ca⁺². Después de esto, las piezas son pulverizadas usando un mortero de ágata, en la tabla I se indican los

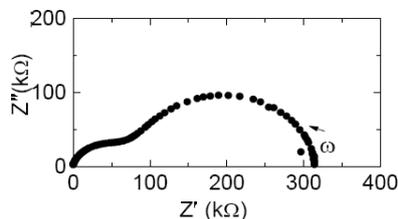


Fig. 3. Diagrama Cole-Cole de un material con dos relajaciones.

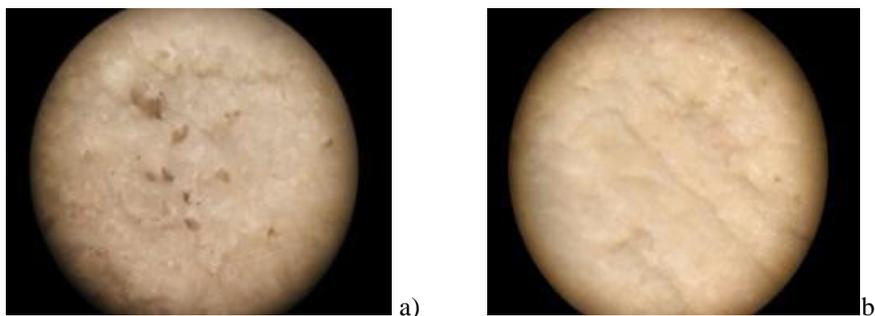


Fig. 4. Muestras óseas sin descalcificar (a) y con 5 días de descalcificación (b).

valores de calcio determinado por pérdida de peso después del proceso descalcificante.

Finalmente todas las muestras son molidas hasta formar un polvo fino; se preparan las 10 muestras con un peso de 0.280 gramos cada una; y esto es lo que se colocara en la celda de prueba para gráficos Impedancia RX y los de Cole-Cole de las pruebas de Espectroscopia.

Se anexo el medidor de fuerza porque la presión aplicada a la celda de prueba altera los resultados de la impedancia, para lo cual se realizó una prueba de Impedancia contra ángulo a distintas presiones en KgF, el resultado mostrado en la figura 6 nos indica si es posible una variación de la impedancia por el cambio de presión en la muestra ósea, realizar la prueba de espectroscopia de Impedancia Eléctrica.

a) Medición de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica en muestras descalcificadas

Para la realización de las pruebas de espectroscopia de impedancia eléctrica se muestra en la figura 5 el arreglo experimental empleado para la realización de dicha prueba.

En el diagrama se tiene una celda de prueba, que consiste en dos electrodos de bronce dentro de un cilindro de material aislante, el cual tiene dos terminales de contacto para adaptarse al puente medidor de impedancia Agilent HP4294A.

La celda tiene acoplado un medidor de fuerza marca Mecmesin con un intervalo de 0 a 25 KgF, y los datos capturados por el HP4294A son procesados en una PC, a fin de obtener los resultados.

Tabla 1. Cantidad de calcio perdida en cada unade las 10 muestras descalcificadas.

Muestra	Calcio(gr)
1	0.103
2	0.164
3	0.244
4	0.324
5	0.384
6	0.473
7	0.603
8	0.694
9	0.771
10	0.864

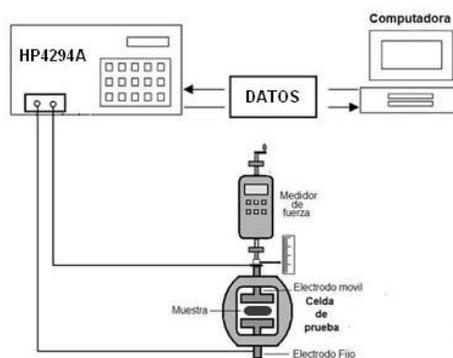


Fig. 5. Arreglo experimental para realizar las pruebas de espectroscopia de Impedancia Eléctrica.

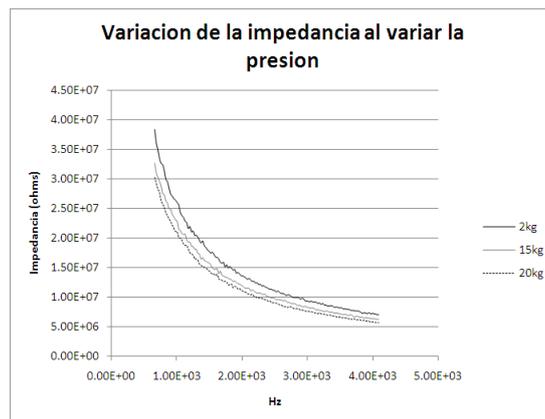


Fig. 6. Variación de la Impedancia con diferentes valores de presión en la celda de prueba.



Fig. 7. Arreglo experimental empleado para la medición de Espectroscopia.

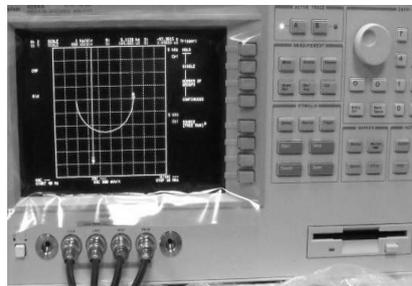


Fig. 8. Medición de circuito de prueba RC y sudiagrama Cole-Cole.

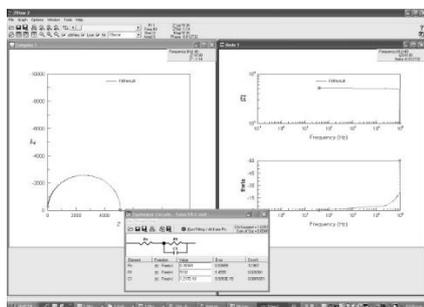


Fig. 9. Grafica Cole-Cole y de Impedancia-ángulo en el programa Z-view.

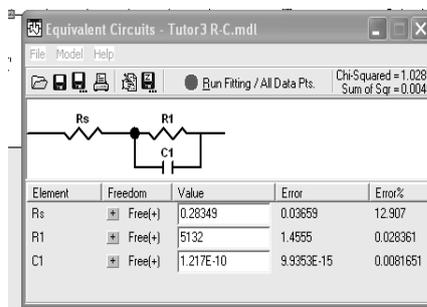


Fig. 10. Circuito equivalente simulado con el programa Z-view del circuito RC de prueba.

Y como apreciamos en la figura 6 si es posible registrar un cambio en la impedancia cuando aplicamos 2, 15 y 20 KgF, por lo que las pruebas a realizar serán a una presión de 15 KgF, para evitar alterar los datos de la espectroscopia, en la figura 7 se muestra la celda de prueba con el medidor de fuerza y el puente medidor de impedancia HP4294A.

3. Pruebas y Resultados

Para la realización de las pruebas de espectroscopia de Impedancia Eléctrica primeramente se requiere calibrar el medidor de Impedancia HP4294A, para lo cual el puente de impedancias cuenta con un protocolo de calibración utilizando una resistencia de precisión de 100%. Después de calibrar se midió un circuito RC en paralelo de $R=5.1\text{ k}$ y $C=120\text{ pF}$ con el puente de Impedancias, en un intervalo de 40hz a 5Mhz cuyo resultado se aprecia en la figura 8 y observamos como en el equipo se aprecia el diagrama Cole-Cole.

Para comprobar que la medición realizada con el puente sea correcta, los datos capturados en la prueba son procesados en el programa Z-view a fin de graficar el

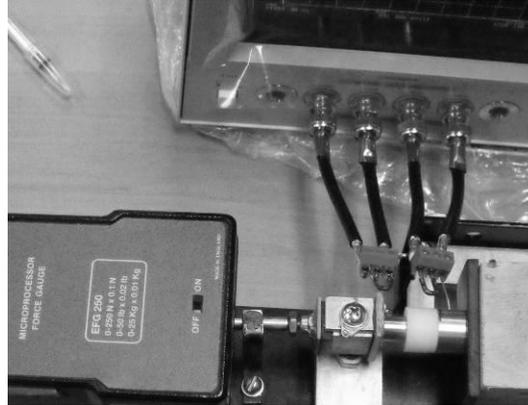


Fig. 11. Prueba de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica a las 10 muestras.

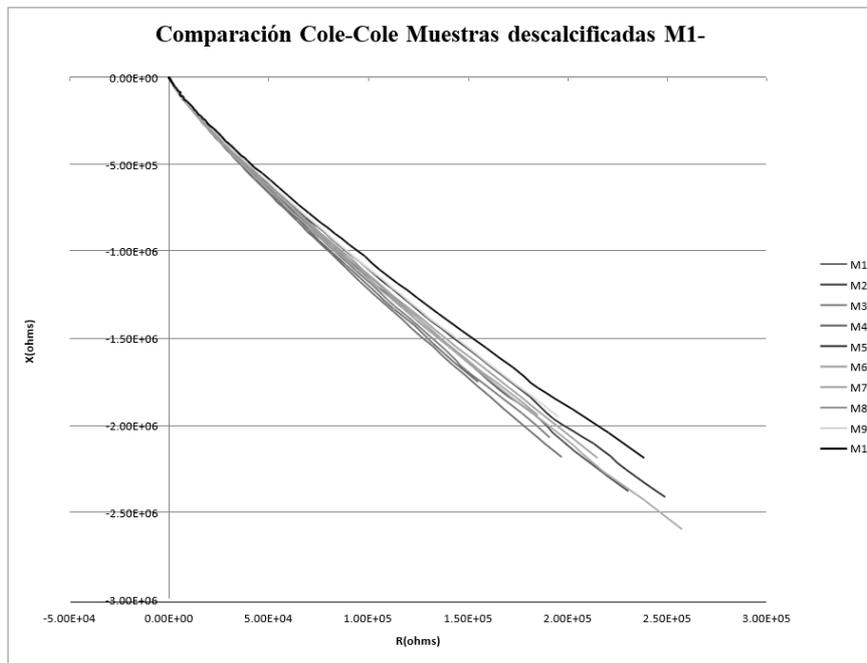


Fig. 12. Comparación de resultados de los diagramas Cole-Cole obtenidos de la prueba de espectroscopia de impedancia eléctrica en las 10 muestras descalcificadas de hueso.

diagrama Cole-Cole y obtener el circuito equivalente del circuito de prueba, los resultados se muestran en la figura 9.

Y de acuerdo a cálculo del circuito equivalente por medio del programa Z-view se obtienen los siguientes valores (fig10) del circuito RC en donde $R_s=0.28349$, que representa la resistencia de contacto en los electrodos, $R_1=5132\Omega$ y $C_1=1.217E-10$ o $C_1=121.7E-12$ que es equivalente a 121.7 pF.

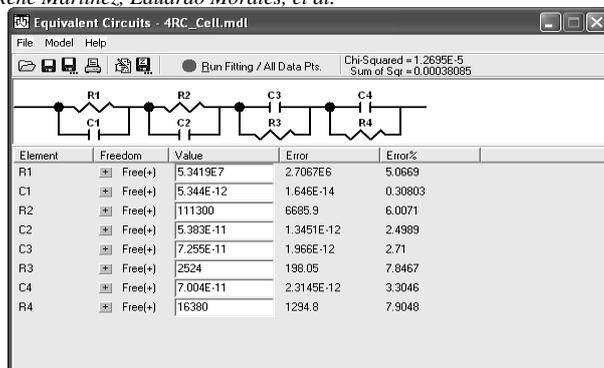


Fig. 13. Circuito Equivalente huesodescalcificado.

De acuerdo a los resultados tenemos que el error en R es 0.62% y en C 0.41%, acorde lo medido con el puente y calculado con el programa Z-view, con respecto a los valores RC de prueba utilizados por tanto consideramos que el puente Hp4294A funciona correctamente.

En base a la anterior prueba se procedió a realizar la prueba de Espectroscopia de impedancia Eléctrica en las 10 muestras de tejido descalcificado en la figura 11 se aprecia la celda de prueba conectada al puente Hp4294A para la realización de la prueba de Espectroscopia, dicha prueba se realizó para un intervalo de frecuencia de 50 hz a 110Mhz, y con la opción del puente para incrementar la frecuencia de forma logarítmica, los resultados de las mediciones se observan en la figura 12 (mostrada en la última página), en donde se comparan los diagramas Cole-Cole [6] de las 10 muestras de hueso de 1 a 10 días de descalcificación, esto con el fin de contar con una muestra ósea descalcificada controlada que sería la forma de simular osteoporosis. De los datos del diagrama Cole-Cole obtenido de una de las muestras, se simula en el programa Z-view y se obtiene el siguiente circuito equivalente (fig 13), que relaciona el comportamiento de la muestra ósea descalcificada.

4. Conclusiones

Conforme a los resultados obtenidos y mostrados en la figura 12 se puede apreciar un cambio en el diagrama Cole-Cole, la muestra M1 corresponde a un día de descalcificación y la M10 a 10 días, lo que indica que hay una variación en la impedancia de la muestra ósea descalcificada, por tanto se puede relacionar un cambio de impedancia con la pérdida de calcio, que sería una forma de simulación de osteoporosis en hueso.

Por tanto, se cumple plenamente el objetivo del proyecto que era comprobar si es posible medir descalcificación ósea por medio de espectroscopia de Impedancia Eléctrica, lo que estos resultados dan la pauta para considerar sea esta una nueva técnica de medición para descalcificación ósea.

A su vez en un trabajo futuro sería obtener el comportamiento de los 10 circuitos equivalentes y relacionarlos con las cantidades de calcio obtenidos en la prueba de descalcificación y observar que parámetros se mantienen casi sin variación, y

determinar en el circuito equivalente obtenido a que corresponden los cuatro circuitos RC obtenidos.

Agradecimientos. El estudio realizado formo parte del proyecto “Estudio Espectroscópico de Tejidos Biológicos” financiado por Concyteg Guanajuato proyecto NoCI30380407.

Referencias

1. Macdonald, J. R.: Impedance Spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering*, 20, pp. 289–305 (1992)
2. Jonscher, A.K.: *Dielectric Relaxation in Solids*. Chelsea Dielectrics Press, London (1983)
3. Duck, F.A.: *Physical Properties of Tissues. A Comprehensive Reference Book* (1990)
4. Duck, F.A.: *A comprehensive Reference Book*. Ed. Academic Press: San Diego (1990)
5. Bourne, J.R., Rigaud, B., Morucci, J.P., Chauveau, N.: Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine, *Physiol. Meas.*, 24, pp. 545–554 (2003)
6. Zehe, A., Ramírez, A.: Efectos electrocinéticos de células biológicas y partículas coloidales en la espectroscopia dieléctrica a bajas frecuencias *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, XXV(1), pp. 16–24 (2004)
7. Bragos, R.: Biomass monitoring using impedance spectroscopy, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 873, pp. 299–305 (1999)