

Medición de las propiedades eléctricas de la sangre humana utilizando un arreglo de microelectrodos coplanares

J. Prado Olivarez,*
R. Gómez,**
J. Díaz Carmona,*
J.A. Padilla Medina,*
M. Nadi***

- * Departamento de Ingeniería Electrónica, Instituto Tecnológico de Celaya, México.
** Centro Nacional de Microelectrónica, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
*** LIEN, Faculte des sciences et techniques, Université Henri Poincaré, Francia.

Correspondencia:
Juan Prado Olivarez
ITC, Av. Tecnológico esq. García
Cubas s/n, Celaya Gto. 38010, México.
Tel: (461) 611 75 75, Ext. 215.
Fax: (461) 611 79 79.
E mail: jprado@itc.mx

Artículo recibido: 31/enero/2008
Artículo aceptado: 5/febrero/2009

RESUMEN

Este artículo describe los resultados en la medición de las propiedades eléctricas de la sangre humana utilizando una célula de medición formada por un arreglo de microelectrodos de platino, fabricado mediante la técnica de litografía electrónica, y un medidor de impedancias. El rango de frecuencia de medición fue de 100 Hz a 1 MHz y una temperatura de la sangre controlada de 37 ± 0.5 . De acuerdo a los resultados experimentales, con el fin de obtener los valores de las propiedades eléctricas esperadas los efectos de la impedancia de polarización deben tenerse en cuenta. En este trabajo dichos efectos de impedancia fueron simulados mediante un modelo eléctrico. Los datos obtenidos muestran también que para frecuencias de medición bajas, los valores obtenidos tanto de la constante del dieléctrico como de la conductividad eléctrica de la sangre humana son muy afectados por la geometría de la célula de medición, así como por las capacitancias parásitas. Los resultados experimentales obtenidos para valores bajos y altos de la frecuencia de medición son comparados con los resultados reportados por otros autores.

Palabras clave: Espectroscopia de impedancia eléctrica, célula de medición, propiedades eléctricas, impedancia de polarización.

ABSTRACT

This paper describes results in electrical properties measurement of human blood based on a platinum microelectrodes array, manufactured with electronic lithographic technique, and an impedance meter. The measurement frequency range was from 100 Hz up to 1 MHz and controlled blood temperature of 37 ± 0.5 C. According with the experimental results in order to obtain the expected electrical properties values the polarization impedance effects must be taken into account. Such impedance effects were simulated in this work through an electrical model. The obtained data also show that for low measurement frequencies both the dielectric constant and the electric conductivity values of human blood are strongly influenced by the measurement cell geometry and parasite capacitances. The experimental results obtained for low and high measurement frequency values are compared with the results reported by other authors.

Key Words: Electrical impedance spectroscopy, measurement cell, electrical properties, polarization impedance.

INTRODUCCIÓN

La espectroscopia de bioimpedancia es rápida y relativamente un método de fácil aplicación en la caracterización de tejidos. Para frecuencias superiores de 10 MHz, las corrientes de conducción a través del tejido son principalmente determinadas por su estructura, por ejemplo, el comportamiento extra e intracelular y el aislamiento de la membrana celular, producen cambios en el volumen extra e intracelular que son reflejados en el espectro de la impedancia¹. La espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) ha sido utilizada ampliamente para evaluar las condiciones de los tejidos de animales y plantas²⁻⁴. Las ventajas de la EIE es que un diagrama de circuito eléctrico puede ser utilizado para interpretar el espectro de la impedancia en término de los componentes resistivos y capacitivos asociados con estructuras y niveles celulares^{5,6}.

La aproximación general por espectroscopia de impedancia o admitancia eléctrica se debe a la aplicación de un voltaje entre los electrodos y el flujo de corriente entre ellos. La impedancia es medida en el dominio de la frecuencia por el monitoreo de la amplitud y el ángulo de fase de la corriente resultante. Para fines de nuestro trabajo este procedimiento fue repetido para diferentes frecuencias para generar un espectro de impedancia. La EIE puede ser utilizada como un método *no invasivo* para identificar la anatomía y patología de un tejido específico. Osterman mostró que la EIE es útil para estimar con precisión los efectos posteriores de exposición a un tiempo de radiación sobre un tejido muscular y muestra que con la EIE es posible predecir la radiosensibilidad de los tejidos antes de que los efectos sean desarrollados completamente⁷. Por los resultados obtenidos, estos investigadores creen que la EIE puede ser usada como una herramienta *no invasiva* para monitorear el progreso de la radioterapia en pacientes con cáncer.

En la última década, los equipos de investigación se interesan en la caracterización dieléctrica a una escala celular a base de microsensors de medición de impedancia. La rápida expansión de técnicas de miniaturización ha permitido la realización de matrices de medición de impedancia micrométricas y es posible que en poco tiempo la nanometría sea útil en la caracterización de ciertas sustancias biológicas o bioquímicas⁸. Los progresos recientes de la tecnología de microsistemas son evidentemente utilizados para fabricar dispositivos biomédicos miniaturizados para una

variedad de aplicaciones. En la actualidad se desarrollan laboratorios encapsulados en un circuito integrado llamados Lab-on-Chip, como ejemplo están las prótesis neuronales^{9,10}. Estos sistemas ofrecen muchas ventajas sobre otros dispositivos como son: 1. Las pequeñas dimensiones disponibles, 2. Un costo más reducido en la fabricación en serie, 3. La capacidad de incorporar adquisición, el tratamiento de la señal y las funciones de interfase de las diferentes etapas del sistema en un mismo circuito integrado. Tradicionalmente, el silicio y el vidrio han sido los dos materiales más frecuentemente utilizados para la fabricación de micromáquinas y dispositivos MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems). Estos materiales presentan propiedades mecánicas apropiadas a una variedad de aplicaciones como los transductores (acelerómetros, giroscopios, etc.). Sin embargo, muchos dispositivos biomédicos requieren materiales en espuma o polímeros alternativos tales como el caucho de silicón, policarbonato, acrilato de isobornyl y la poliamida¹¹. Los polímeros son poco costosos y pueden ser utilizados dentro de los dispositivos desechables, evitando las condiciones rigurosas de esterilización sobre reutilización.

La mayor parte de las aplicaciones de los MEMS dentro del dominio biomédico (BioMEMS) fueron desarrollados en un medio universitario durante los años 90. Posteriormente, numerosos dispositivos han sido comercializados. Así, los contadores secuenciales de ADN basados en MEMS están en desarrollo. De la misma forma, sistemas de detección de drogas han sido desarrollados dentro de un circuito integrado¹². En efecto, la relación de las biotecnologías con la micro y nano-biotecnología, se resume en nano-biotecnología, la cual es una actividad en pleno desarrollo que presagia numerosas aplicaciones en el dominio de la bio-detección. Los dos principales obstáculos para el éxito de la comercialización de BioMEMS, son el control de calidad y una integración biocompatible. La biocompatibilidad constituye el 80% del costo final del dispositivo. Su implementación es igualmente un desafío debido a que dentro de estos casos otros criterios, como las características físicas, deben ser considerados para su aplicación. El diseño y la ingeniería constituyen a diferentes niveles (material, dispositivo, sistema, pruebas y ensamble) las etapas críticas que pueden poner en entredicho el desarrollo final del dispositivo¹³. Los microelectrodos son la base del funcionamiento de una gran parte de los BioMEMS, muchos de éstos funcionan con microelectrodos planos. Para la bioimpedancime-

tría, el modelado y la realización de los microelectrodos es crucial.

Este artículo presenta las propiedades eléctricas de la sangre humana, para lo cual se utilizó un impedancímetro para medir la impedancia compleja y el rango de medición fue de 100 Hz a 1 MHz, aplicando un potencial de 25 mV a cada par de microelectrodos. La temperatura fue controlada por un horno fabricado específicamente para el desarrollo de nuestro trabajo, éste utiliza dos focos de 6 watts, un ventilador y un termostato, la temperatura de la solución fue de $37 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. La estructura de este trabajo consta de cinco partes principales. La primera muestra las ecuaciones que permitieron calcular conductividad y permitividad eléctrica. La segunda parte indica la metodología a seguir y que fue descrita a detalle en una publicación anterior. Los resultados experimentales son mostrados en la tercera parte. Dentro de la cuarta parte se presenta una comparación de resultados y finalmente se muestra una conclusión de este artículo.

TEORÍA

Permitividad y conductividad eléctrica

La permitividad ϵ (adimensional) y conductividad eléctrica σ (S/m) de una muestra biológica no puede ser medida directamente, es necesario medir la impedancia compleja Z (ohms) representada por la ecuación (1) y deducir las ecuaciones (2) y (3) para calcular las propiedades eléctricas de la muestra a evaluar¹⁴.

$$(1) \quad Z = \frac{V}{I} = \kappa \frac{I}{(\sigma + j \cdot \omega \cdot \epsilon)}$$

$$(2) \quad \sigma = \kappa \cdot G$$

$$(3) \quad \epsilon = \kappa \cdot \frac{I}{\omega} \cdot B$$

Donde el factor de célula κ (m^{-1}), es una función de las dimensiones y geometría de la célula de medición. Está definida $\epsilon = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r$, como la permitividad del vacío ($\epsilon_0 = 8.854187818 \times 10^{-12}$ (F/m)) y la velocidad angular como $\omega = 2\pi f$, f representa la frecuencia de trabajo. Las ecuaciones conductancia G y susceptancia B (m/S^{-1}) son definidas por las ecuaciones (4) y (5).

$$(4) \quad G = \frac{I}{|Z|} \cdot \cos(\theta)$$

$$(5) \quad B = -\frac{I}{|Z|} \cdot \sin(\theta)$$

Célula de medición

La estructura de la célula de medición tiene como geometría una matriz de microelectrodos y puede ser utilizada en investigaciones de EIE (Figura 1). La matriz de microelectrodos está dividida en dos grupos, el primer grupo está compuesto de ocho microelectrodos de inyección (E1 a E8) y un microelectrodo de referencia o tierra (M1). El segundo grupo incluye los microelectrodos de inyección (E9 a E16) y M2, estos dos grupos son completamente simétricos. Para fines de nuestro trabajo los microelectrodos de inyección E1, E2...E16 se utilizan para realizar la simulación y la experimentación¹⁴.

Factor de célula κ

La simulación del comportamiento eléctrico de la célula de medición fue realizada con el software Femlab (Prado Olivarez *J et al*) y permitió calcular la magnitud del factor de célula κ para cada microelectrodo del primer grupo de microelectrodos, el resultado κ para el segundo grupo es de la misma magnitud por la simetría de los grupos, el Cuadro 1 muestra los resultados.

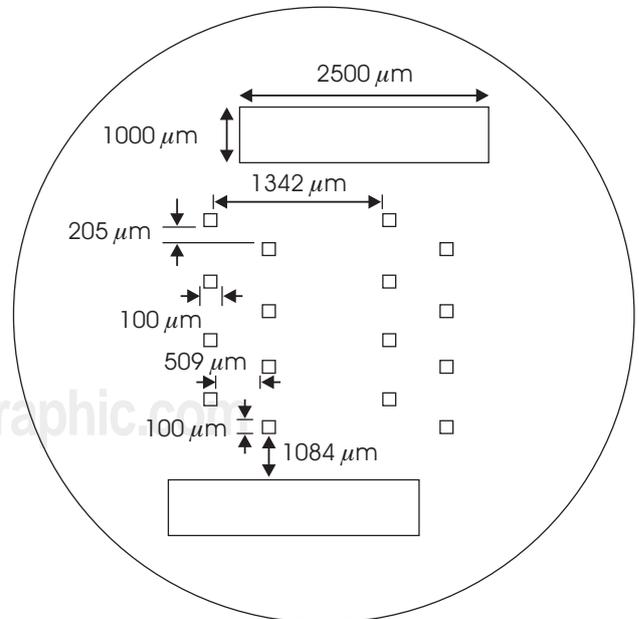


Figura 1. Geometría del microsensado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumentación electrónica

El sistema de medición es mostrado en la Figura 2, el cual incluye: la célula de medición la cual incluye un recipiente de material como plexiglas que es utilizado para colocar la muestra de sangre a evaluar, una tarjeta de adquisición de datos, un medidor de impedancias Hioki 3532-50 y una computadora para el análisis de resultados y cálculo de las propiedades eléctricas de la sangre.

El medidor LRC HIOKI 3532-50 permite la medición de la impedancia eléctrica en la gama de frecuencia de 100 Hz a 1 MHz. El muestreo es contro-

Cuadro 1. Comportamiento eléctrico simulado del grupo 1 del microsensor.

No. μ Elec.	V(V)	I (μ A)	Z (k Ω)	k(m ⁻¹)
1	0.025	7.89	3.42	5,652.67
2	0.025	7.75	3.18	5,256.02
3	0.025	7.54	3.31	5,470.07
4	0.025	7.40	3.37	5,573.93
5	0.025	7.56	3.31	5,452.81
6	0.025	7.33	3.41	5,627.89
7	0.025	7.46	3.34	5,526.39
8	0.025	7.26	3.43	5,678.22

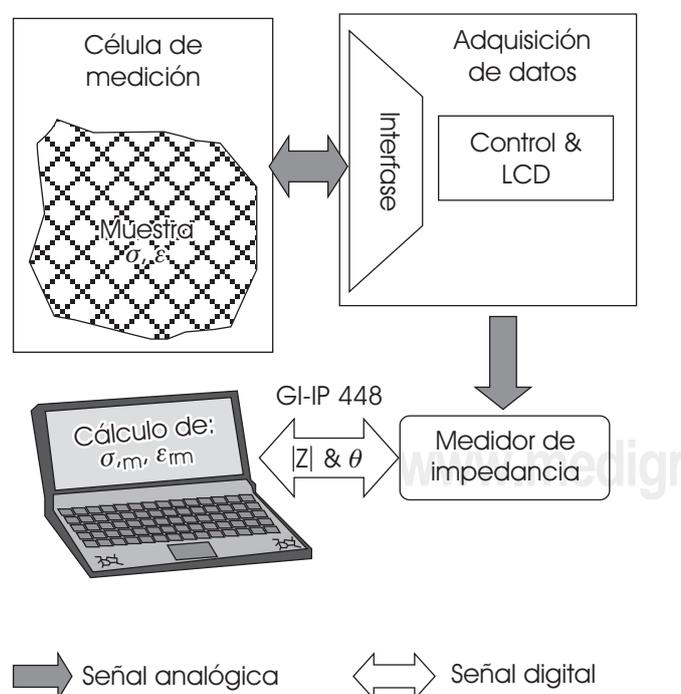


Figura 2. Sistema de adquisición de datos.

lado por el medidor LRC 3532-50 y la PC vía una interfase IEEE448.

Matriz de microelectrodos

La matriz de microelectrodos consiste en 18 microelectrodos (2 de tierra y 16 de medición) colocados sobre un sustrato de vidrio (1 x 1.2 cm). Los microelectrodos de inyección son cuadrados (16 piezas) con dimensiones de 100 x 100 μ m y 180 nm de espesor. Los microelectrodos de tierra son dos piezas con 1 x 2.5 mm de superficie y 180 nm de espesor¹⁴ (Figura 1).

Esta célula de medición fue fabricada en el Centro Nacional de Microelectrónica (CNM) campus Barcelona¹⁵. Un recipiente cilíndrico de plexiglas de 8.32 mm de diámetro interior y con una altura de 20 mm se utilizó para colocar la muestra. Éste fue adherido sobre el sustrato de vidrio de la matriz de microelectrodos, permitiendo que éstos se localicen dentro del recipiente. El pegamento utilizado es no conductor del tipo MED-1511, el cual es transparente y tiene alta resistencia a los ataques químicos. La Figura 3 muestra el recipiente con la matriz de microelectrodos y la tarjeta del circuito impreso donde se instaló el microsensor.



Figura 3. Posición del recipiente.

Electrodos con negro de platino

Para eliminar al máximo los efectos de la impedancia de polarización a bajas frecuencias, los microelectrodos de inyección fueron cubiertos con una capa de negro de platino. El material utilizado para el depósito (capa) negro de platino es una solución Kohlraush, un ánodo y un baño ultrasónico¹⁶.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

La sangre utilizada para la etapa experimental es de un individuo adulto sano de 35 años, con un hematocrito del 42%. La muestra sangre se colocó en un recipiente y se efectuó la medición de la impedancia compleja de forma estática. La temperatura de la muestra fue de $37^\circ \pm 0.5$, la cual fue controlada con un horno fabricado específicamente para esta investigación. El recipiente de la muestra fue llenado con 2 ml de sangre para llevar a cabo las mediciones. EL anticoagulante heparina fue utilizado y éste no afecta las mediciones finales¹⁷.

La Figura 4 presenta los resultados de la medición de $|Z|$ y θ del electrodo número 3 del grupo 1. El valor de los microelectrodos 1 al 8 varía en un 3.7% máximo, en la magnitud de $|Z|$ y θ .

Similares resultados fueron obtenidos para el otro grupo de microelectrodos y no son mostrados por la claridad de la gráfica.

Permitividad y conductividad eléctrica de la sangre

Como ya se ha mencionado la impedancia de la sangre depende de diferentes parámetros, fisiológicos y eléctricos. Los efectos de los principales parámetros eléctricos fueron discutidos en este trabajo. Los resultados presentados fueron seleccionados de experimentos con un gran número de muestras y pueden ser tomados como comportamiento típico.

Las variaciones en las propiedades eléctricas

Las variaciones en las mediciones de las propiedades eléctricas muestran con frecuencia que para minimizar los efectos de la impedancia de polarización se requiere el uso de altas frecuencias mayores a 10kHz para este trabajo. Para frecuencias superiores a 100kHz, el efecto de la impedancia de polarización es mínimo y el valor de la permitividad relativa se reduce. El valor óptimo depende principalmente de la geometría de los electrodos.

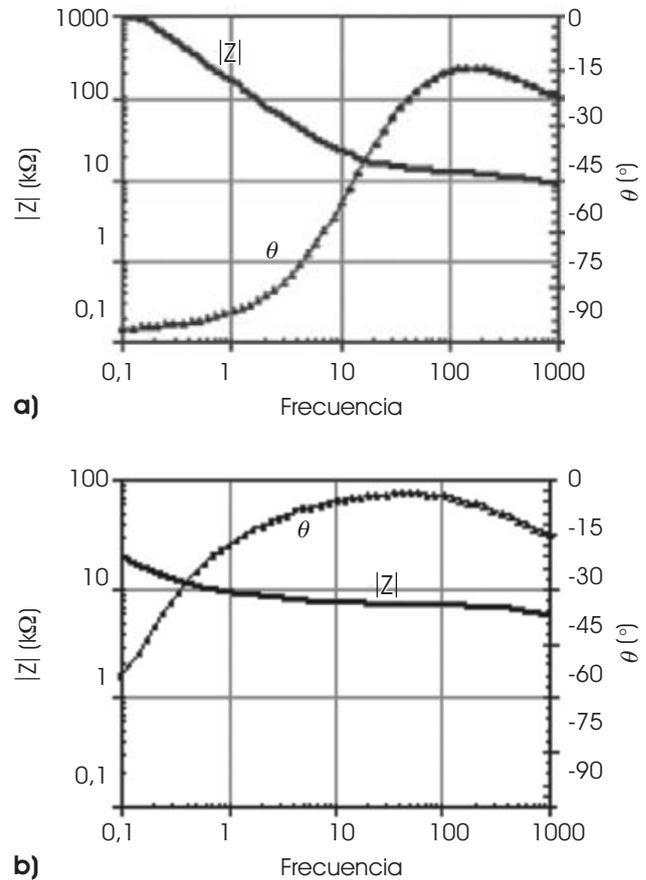


Figura 4. Magnitud de la impedancia compleja de la sangre: a) Electrodo de platino y b) Electrodo con depósito de negro de platino.

El objetivo final de este artículo es la caracterización dieléctrica de un tejido en nuestro caso es la sangre para bajas frecuencias. La permitividad ϵ_r y conductividad σ eléctrica de una muestra de sangre fueron calculados para una temperatura de $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, las magnitudes de estas propiedades eléctricas son mostradas en la Figura 5.

DISCUSIÓN

A fin de discutir los resultados obtenidos y los publicados por otros autores, las gráficas de la Figura 6 muestran una comparación entre los resultados de nuestro estudio y los publicados por otros investigadores sobre las propiedades eléctricas de la sangre humana a bajas y altas frecuencias. En la Figura 6(a) se presenta una curva denominada mediciones, la cual indica los valores calculados para la permitividad eléctrica de la sangre a partir del sistema de medición desarrollado para esta inves-

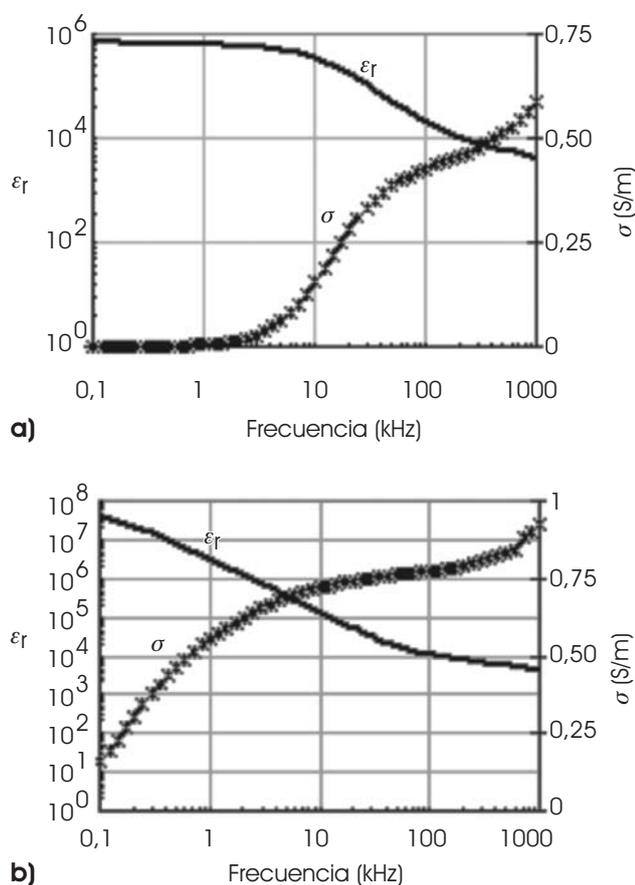


Figura 5. Propiedades eléctricas de la sangre: a) Electrodo de platino y b) Electrodo con negro de platino.

tigación. En la Figura 6(b) la curva denominada mediciones indica la conductividad eléctrica de la sangre.

Se debe considerar que los autores con los que se han comparado nuestras mediciones utilizaron sensores con dimensiones macrométricas y los electrodos fueron desarrollados con una estructura paralela. Por lo anterior, los efectos de la impedancia de polarización son casi nulos para bajas frecuencias.

CONCLUSIÓN

La medición de la impedancia de los microelectrodos cubiertos con negro de platino eliminó aproximadamente un 50% de los efectos de la impedancia de polarización para frecuencias superiores a 10 kHz. Para frecuencias inferiores de 10 kHz, la interfase electrodo-electrolito influye claramente en dichas mediciones. El error en la

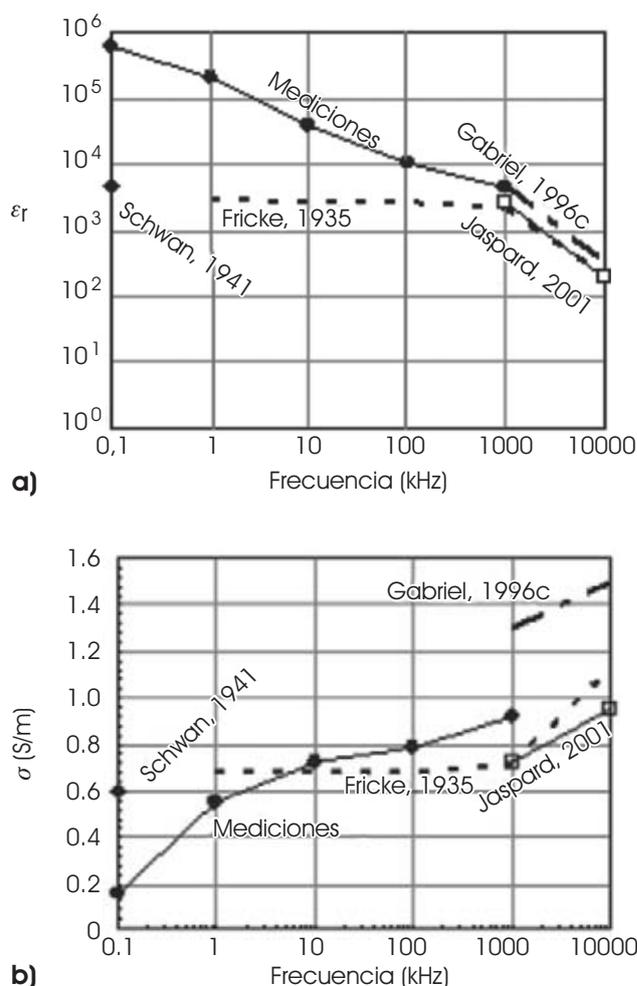


Figura 6. Propiedades eléctricas de la sangre humana comparadas con otros resultados publicados: a) Permittividad y b) Conductividad.

magnitud de la conductividad es aproximadamente 20% del valor esperado (0.7 S/m) esto es debido a los efectos de la temperatura, la impedancia electrodo-electrolito, el tamaño de los electrodos así como la geometría de la célula de medición.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Centro Nacional de Microelectrónica (CNM) por la fabricación del microsensado, al Dr. Antoni Ivorra y al M.C. Rodrigo Gómez de la Universidad Autónoma de Barcelona por su ayuda y sus opiniones. Así también al CONCYTEG (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el financiamiento en parte de este proyecto convenio 07-09-K662-556 A02.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gersing E, Kelleher DK, Vaupe P. Tumour tissue monitoring during males photodynamic and Hyperthermic treatment using bioimpedance Spectroscopy. *Physiol Meas* 2003; 24: 625-637.
2. Cole KS. Membranes, ions, and impulses. *Classical Biophysics*, editor University of California Press (Berkeley, CA), 1972.
3. Settle RG, Foster KR, Epstein BR, Mullen JL. Nutritional assessment: whole body impedance and body fluid compartments. *Nutr Cancer* 1980; 2: 72-80.
4. Lewis GS, Aizinbud E, Lehrer AR. Changes in electrical resistance of vulvar tissue in Holstein cows during ovarian cycles and after treatment with prostaglandin F2a. *Anim Reprod Sci* 1989; 18: 183-197.
5. Zhang MIN, Stout DG, Willison JHM. Electrical impedance analysis in plant tissues: symplasmic resistance and membrane capacitance in the Hayden model. *J Exp Bot* 1990; 41: 371-380.
6. Zhang MIN, Willison JHM. Electrical impedance analysis in plant tissues: a double shell model. *J Exp Bot* 1991; 42: 1465-1475.
7. Osterman KS, Hoopes PJ, DeLorenzo C, Gladstone DJ, Paulsen KD. Non-invasive assessment of radiation injury with electrical impedance spectroscopy. *Phys Med Biol* 2004; 49(5): 665-683.
8. Prado J. Conception et réalisation d'un microsystème par spectroscopie de bioimpédance. Tesis Doctoral, Nancy Francia, 2006.
9. Wise K.D. Integrated sensors, microactuators, and microsystems (MEMS). *Proc IEEE* 1998; 86: 1531-1746.
10. Manz A, Becker H. *Microsystem Technology in Chemistry and Life*. Sciences Springer (New York) 1999.
11. Whitesides GM, Ostuni E, Takayam S, Jiang X, Ingber DE. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng* 2001; 3: 335-373.
12. Thielecke H, Mack A, Robitzki A. Living Chips: Cell sensors for toxicity and therapeutical biomonitoring. Germany *Proc of Micro Tec* 2000.
13. Ziaie B, Baldi B, Lei M, Gu Y, Siegel RA. Hard and soft micromachining for BioMEMS: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. *Advance Drug Delivery* 2004; 56: 145-172.
14. Prado OJ, Padilla MJA, Díaz CJ, Nadi M. Caracterización de un microsensor por espectroscopia electroquímica de impedancia RMIB-12-21; 2007.
15. Ivorra A, Gomez R, Noguera N, Villa R, Sola A, Palacios et al. Minimally invasive silicon probe for electrical impedance measurements in small animals. *Biosensors Bioelectron* 2003; 19: 391-399.
16. Prado J. Conception et réalisation d'un microsystème par spectroscopie de bioimpédance". Tesis Doctoral, Nancy Francia, 2006.
17. Jaspard F. Caractérisation diélectrique du sang par spectroscopie de bioimpédance dans la bande [1MHz – 1GHz]: Conception et réalisation d'une cellule de mesure, Thesis, Henri Poincaré University, Nancy 1. 2001.
18. Schwan HP. Über die Niederfrequenz-Leitfähigkeit von Blut und Nlutzerum bei verschiedenen temperaturen'. *Z Ges Exp Med* 1941; 119: 531.
19. Fricke H, Curtis HJ. The electric impedance of hemolyzed suspension of mammalian erythrocytes. *J Gen Physiol* 1935; 18(6): 821.
20. Gabriel S, Lau RW, Gabriel C. The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissue. *Phys Med Biol* 1996c; 41: 2271-2293.