

# Equipo compacto de medida de impedancia eléctrica multifrecuencia basado en señales multiseno

B. Sánchez Terrones<sup>1</sup>, R. Bragós Bardia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Divisió Instrumentació i Bioenginyeria – Dept. d'Enginyeria Electrònica, Universitat Politècnica de Catalunya UPC  
C/Jordi Girona 1-3, Edifici C4, 08034 Barcelona, España  
Tlf +34 93 4016777, Fax +34 93 4016756  
E-mail: [bsanchez@eel.upc.edu](mailto:bsanchez@eel.upc.edu), [rbb@eel.upc.edu](mailto:rbb@eel.upc.edu)

## Resumen

*A continuación se presenta el desarrollo e implementación de un sistema compacto de medida multifrecuencia de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica (EIE). A diferencia de los equipos clásicos de medida de impedancia eléctrica basados en la técnica de barrido frecuencial, dicho sistema permite la caracterización instantánea del espectro de impedancia gracias a la realización simultánea de múltiples medidas espectrales mediante el uso de señales multiseno. Para disminuir el error en determinación de amplitud y fase en la medida se pretende aumentar la relación señal-ruido mediante la minimización del factor de cresta. Para ello, se ha implementado un algoritmo genético y una distribución bilateral cuasi logarítmica (BQL) de frecuencias que concentra un número mayor de puntos espectrales alrededor de la frecuencia de relajación de la impedancia del sistema biológico a medir. La aplicación final es la caracterización in-vitro del proceso de crecimiento y diferenciación celular de miocitos a partir de células madre, con la intención de regenerar tejido cardíaco en el campo de la ingeniería de tejidos.*

## 1. Introducción

La medida de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica permite la caracterización de materiales y sistemas biológicos a nivel fisiológico. El comportamiento eléctrico del conjunto formado por el líquido extra e intracelular y la membrana celular depende de la frecuencia según las características eléctricas pasivas del material en cuestión (conductividad y permitividad). Para el caso de tejidos biológicos, ocurre que el espectro de impedancia depende de la densidad y morfología de las células, permitiendo la caracterización tisular y la detección de patologías.

En particular, el estudio mediante EIE de objetos biológicos cuyas características eléctricas cambian con el tiempo, precisa que las medidas de biompedancia no se vean afectadas por la modulación inducida por el movimiento mecánico del objeto a medir. La monitorización on-line de medidas multifrecuencia es suficientemente restrictiva para descartar la técnica clásica de medida de impedancia basada en barrido frecuencial. En su lugar, se utiliza ráfagas de señales con contenido frecuencial en el margen de interés, como por ejemplo, ruido blanco, secuencias de pulsos, etc.

## 2. Principios básicos de la medida de bioimpedancia mediante señales multiseno.

A día de hoy, existen múltiples formas de onda útiles para aplicaciones biomédicas [1]. En nuestra aplicación en concreto, los factores a tener en cuenta para escoger una u otra son:

- Mínimo tiempo de medida para garantizar que las medidas de bioimpedancia están libres de la modulación asociada al movimiento mecánico del tejido biológico a medir. La adquisición de dicha modulación permitirá a su vez tener información de estado del tejido.
- Relación Señal-Ruido máxima sin provocar estimulación en el sistema biológico a medir para minimizar el error en la estimación de amplitud y fase a las frecuencias de interés.
- Ancho de banda comprendido entre 1kHz-1MHz.

Para esta aplicación en cuestión se descarta la medida de bioimpedancia por barrido debido al elevado tiempo de medida que implica. El abanico de posibles señales de inyección se restringe a aquellas que permiten la caracterización del espectro en una única ráfaga de señal, como por ejemplo ruido blanco, secuencias pseudo-aleatorias o señales multiseno. La principal ventaja de la señal multiseno frente a las otras señales es que permite inyectar mayor cantidad de energía a las frecuencias de interés, mejorando así la relación señal a ruido en dichas frecuencias. Además, permite evitar el promedio sincrónico que sería necesario en el caso de usar ruido blanco, con lo que el tiempo de medida es menor. Otra ventaja es que la distribución de frecuencias a priori puede ser cualquiera, lo que implica máxima flexibilidad en el diseño. No obstante y para la aplicación que nos concierne, conviene concentrar mayor número de puntos alrededor de la frecuencia central de relajación a fin de caracterizar correctamente la característica de la bioimpedancia. Sin embargo, también tiene inconvenientes y es que inyectar múltiples tonos a un sistema no lineal como es la respuesta conjunta de la etapa frontal, electrodos y objeto biológico, provoca la aparición de productos de intermodulación no deseados que pueden afectar en la estimación de la medida. En tal caso, es conveniente minimizar dicho efecto redistribuyendo apropiadamente

las frecuencias fundamentales y asignando un intervalo de guarda entre armónicos fundamentales y productos de intermodulación. Otro punto a tener en cuenta es la distribución de fases, que influye en la envolvente de la señal multiseno. Una distribución de fases conveniente permite aprovechar mejor el rango dinámico y la resolución de la etapa de adquisición.

### 3. Implementación

En un primer paso y para validar el método de medida mediante señales multiseno, se desarrolló un set-up de medida basado en un generador de forma de onda arbitrario, una etapa frontal, un osciloscopio como sistema de adquisición controlados a través de un enlace USB/GPIB. El diseño de la señal multiseno se realizó con Matlab para el cálculo de la distribución de frecuencias casi logarítmica y se implementó un algoritmo genético para la minimización del factor de cresta [2]. Mediante una aplicación realizada con Labview, se programaba y controlaba todo el sistema de medida. La señal de salida del generador arbitrario se aplicaba a la etapa frontal, encargada de hacer la medida de impedancia a 4 electrodos. La medida de corriente y tensión procedente de la etapa frontal se realizaba mediante el osciloscopio. La aplicación de control del PC procesaba las medidas tras recibirlas del enlace USB/GPIB. El principal escollo y cuello de botella del sistema de medida fue la comunicación entre osciloscopio y PC, que limitaba la velocidad del conjunto.

A fin de reducir la cantidad y volumen de equipos de medida y aumentar las prestaciones del sistema, se está llevando a cabo el desarrollo basado en una estructura modular del tipo PXI de *National Instruments*, que integra en un único chasis todas las funcionalidades requeridas.

#### 3.1. Equipo de medida

El equipo actual de medida (figura 1), está compuesto por los siguientes módulos:

- PXIe-8130: Controlador embebido PXI Express, 2GB RAM DDR2, Procesador AMD Turion 64 X2 de 2.3 GHz dual-core.
- PXI-5422: tarjeta generadora de forma de onda arbitraria, 200Ms/s, 32MB y 16 bits.
- PXIe-5122: tarjeta digitalizadora de dos canales, 100Ms/s, 64MB/canal y 14bits.
- PXI-2530: matriz de multiplexación de 128 canales para la conexión simultanea de múltiples etapas frontales analógicas externas.
- PXIe-1062Q: chasis del equipo.
- Etapa Frontal: soporta medidas de impedancia a 2 y 4 hilos. La medida de tensión se realiza mediante un amplificador diferencial de ancho de banda elevado (modelo MAX4145), con dos amplificadores operacionales AD8066 como buffer de entrada. La medida de corriente se lleva a cabo a través de un amplificador de transimpedancia basado también en el AD8066. El conjunto tiene un ancho de banda superior a

20MHz, con un CMRR de más de 60dB hasta 10MHz.

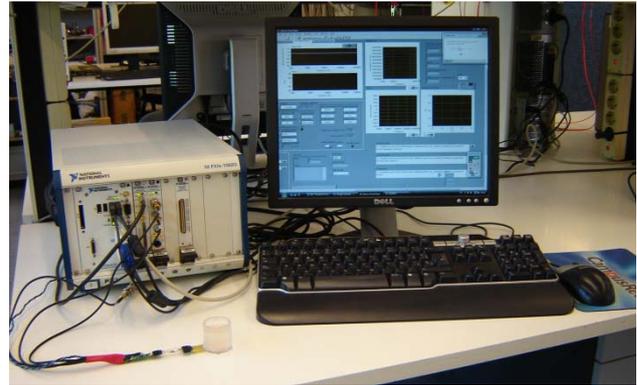


Figura 1. Equipo de medida.

#### 3.2. Demodulación digital de señales multiseno mediante la FFT

En según qué aplicaciones es una tarea ardua realizar medidas en el dominio temporal. En cambio, es posible simplificarlo si se aborda el problema desde un punto de vista del dominio frecuencial.

En concreto, una de las técnicas de análisis espectral en aplicaciones de espectroscopia consiste en el cálculo de la FFT [3]. Su principal ventaja se debe a su elevada velocidad de computación ya que a diferencia de la demodulación coherente, la FFT analiza a la vez todas las frecuencias del espectro. Estas características hacen de la FFT el candidato ideal para la demodulación en aplicaciones donde es un requisito el análisis en tiempo real y la monitorización on-line de las medidas.

A continuación se comentan los principales parámetros que intervienen de forma directa en la demodulación de señales multiseno. Para empezar, la tarjeta PXIe-5122 digitaliza los canales de corriente I y tensión V procedentes de la etapa frontal a 100Ms/s por lo que el ancho de banda máximo teórico aceptable para la señal de entrada es 50MHz, muy por encima del rango de medida comprendido desde 1kHz hasta 1MHz.

Otro parámetro a tener en cuenta para la demodulación digital es el número de muestras (N). El número de muestras determinará la duración temporal, la resolución frecuencial de la señal multiseno, la cantidad de memoria necesaria y el tiempo de cálculo de la FFT. En nuestra aplicación, N toma el valor de 10.000 muestras.

Intrínsecamente, el número de muestras también define la mínima frecuencia detectable del espectro de entrada y que coincide con la resolución espectral. La resolución frecuencial se corresponde a mínima frecuencia que puede ser analizada y generada y define la resolución frecuencial de la FFT. Para los valores de  $F_s$  y  $N$ , obtenemos una resolución frecuencial de 1kHz. Si es posible y respetando los intervalos de guarda comentados en el punto 2, es conveniente distribuir los tonos de la señal multiseno a fin de que sean un múltiplo entero y así coincidir con los *bins* de la FFT.

Con el objetivo de realizar una estimación precisa de amplitud y fase de los armónicos fundamentales de la señal multiseno, la aplicación permite realizar un número arbitrario de promedios de los valores de la FFT (parte real e imaginaria se promedian de forma independiente). Esto permite disminuir el nivel de ruido de señales aleatorias al ser incorreladas con la señal de entrada y aumentar la relación señal a ruido. Aunque no todo son ventajas, ya que aumenta también el tiempo de cálculo.

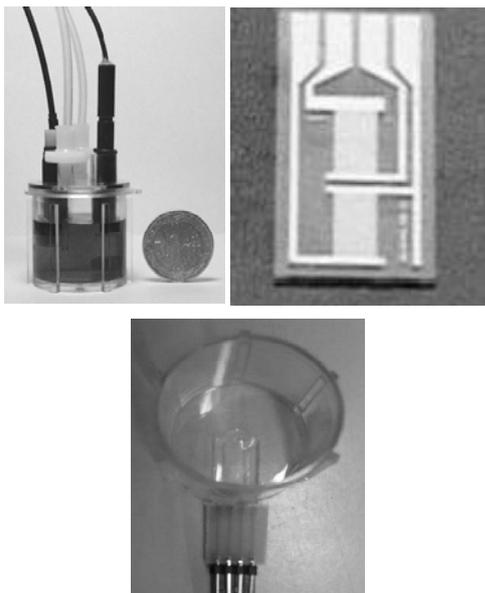
### 3.3. Software de medida

El diseño de la señal multiseno se ha realizado con Matlab y la aplicación de control del sistema de medida con el entorno de programación LabView.

La aplicación de control principal se divide en dos partes: un primer módulo encargado de la inicialización y configuración del hardware seguido de un segundo módulo encargado de la generación, adquisición y procesamiento de las medidas. Referente a la fase de configuración y a fin de garantizar el sincronismo entre las tarjetas de generación y adquisición, la aplicación configura como señal de disparo una línea dedicada interna del chasis destinada a tal fin. Además, con el objetivo de optimizar recursos y aumentar la eficiencia del sistema, se ha implementado un sistema paralelo formado por dos bucles independientes que gobiernan el proceso de adquisición y procesamiento de las medidas y que intercambian información mediante un sistema de colas.

## 4. Materiales y métodos

Después de caracterizar el sistema mediante la medida de resistencias y redes RC, para emular el crecimiento de células sobre los microelectrodos (Fig.2.b) se ha dejado sedimentar una suspensión de levadura durante 12 horas. La suspensión contiene 50g/l (peso húmedo) de levadura (*saccharomyces cerevisiae*) diluida en una solución salina del 0,2%.

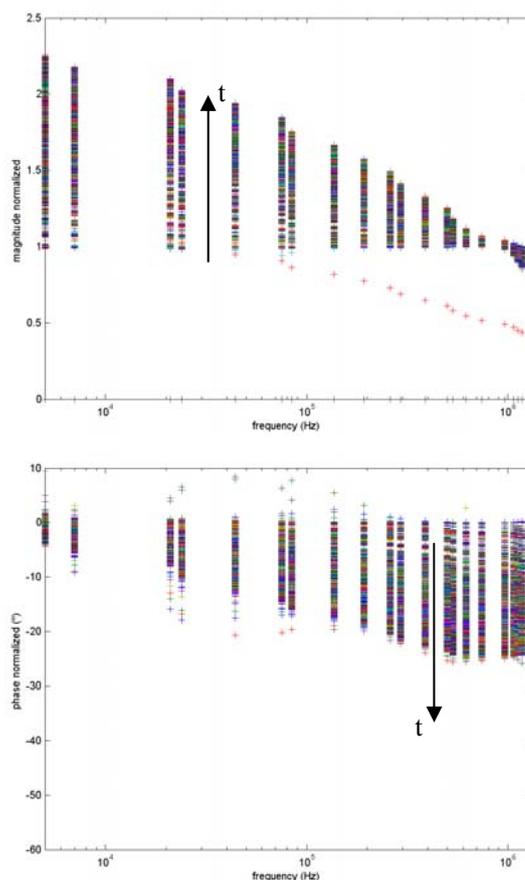


**Figura 2.a.** Minibioreactor, **2.b.** microelectrodo de medida interdigitado (Abtech) y **2.c.** montaje del microelectrodo en el fondo del minibioreactor.

Se ha dispuesto un set up de preliminar para la validación del sistema de medida para la caracterización del proceso de sedimentación de levadura en suspensión. Para ello, se ha vertido la mezcla en un minibioreactor (Fig.2.a) en el fondo del cual se aloja una pletina que contiene electrodos miniaturizados dispuestos en forma de peine para la medida de impedancia a 4 hilos (Fig.2.c) [4]. La conexión entre los electrodos de medida y el equipo se realiza mediante la etapa frontal. Los canales de corriente y tensión procedentes de la etapa frontal se conectan directamente a las entradas analógicas módulo PXI.

## 5. Medidas

Durante 12 horas y cada 5 minutos, el equipo realiza una batería de 100 medidas (10ms), con un total de 14400 medidas. Después de cada medida, calcula el promedio espectral resultante de la FFT y se obtiene el espectro de módulo y fase. El número de frecuencias inyectadas de la señal multiseno es 21 distribuidas entre 5kHz y 1.313MHz con una amplitud de corriente de 1mA. Gracias al ajuste de las fases se obtiene un factor de cresta resultante de 2,7. A continuación se muestra las medidas de magnitud (Fig.3.a) y fase (Fig.3.b) tras el proceso de normalización en el instante 0 y una vez filtrado con un filtro de mediana de orden 5.



**Figura 3.a.** Evolución del módulo y **3.b.** fase de la impedancia debido al proceso de sedimentación de la levadura al cabo de 12 horas en intervalos de 5 minutos.

La siguiente figura muestra, a partir de la medida de módulo de impedancia, la evolución con el tiempo del

estimador de concentración de biomasa (1) propuesto en [5]:

$$E_1 = \frac{|Z_{\omega \rightarrow 0}| - |Z_{\omega \rightarrow \infty}|}{|Z_{\omega \rightarrow 0}|} \quad (1)$$

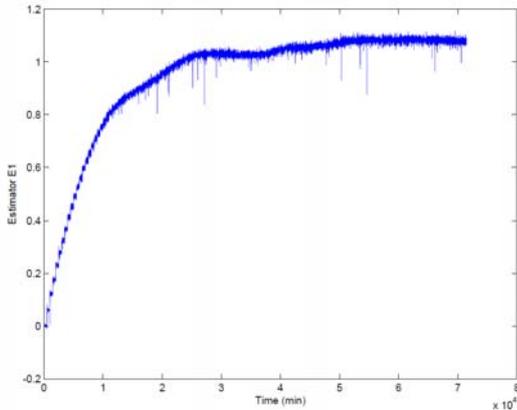


Figura 4. Evolución temporal del estimador de concentración de biomasa a partir del módulo de impedancia.

Representando la medida de impedancia como parte Real y parte Imaginaria tal y como muestra la figura 5 y ajustando las medidas al modelo de impedancia descrito por la expresión de Cole-Cole (2):

$$Z(f) = R_{\infty} + \frac{R_0 - R_{\infty}}{1 + (j\frac{f}{f_c})^{1-\alpha}} \quad (2)$$

se obtiene un nuevo estimador de crecimiento celular a partir de la relación entre los parámetros  $R_0$  y  $R_{\infty}$  (3) (Fig.6).

$$E_2 = \frac{R_0 - R_{\infty}}{R_0} \quad (3)$$

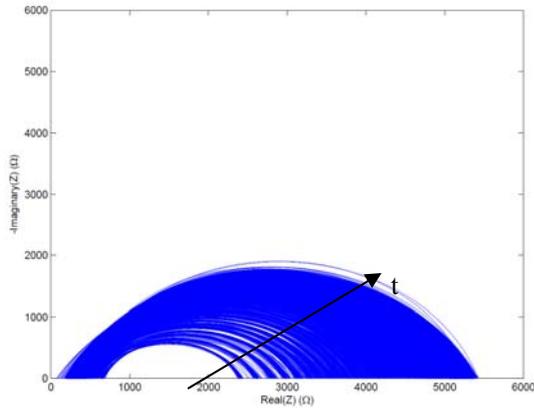


Figura 5. Arco de Cole-Cole de las series de impedancia medida a 4 hilos en intervalos de 5 minutos.

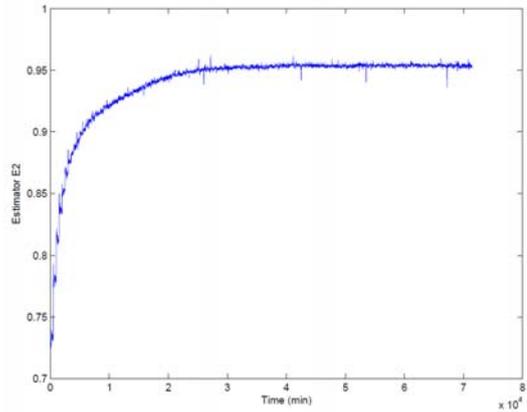


Figura 6. Evolución temporal del estimador de crecimiento celular a partir de los parámetros del arco de Cole-Cole.

## 6. Conclusiones

Se ha construido y validado un sistema rápido de medida de biomasa in vitro mediante señales multiseno. Por simplicidad, se ha caracterizado un proceso de sedimentación de levadura en suspensión sobre electrodos interdigitados dispuestos en el fondo de un mini biorreactor. Los resultados obtenidos demuestran que tanto el equipo como el método de medida son válidos para detectar y caracterizar crecimiento celular ya sea a través del módulo de impedancia como a partir del ajuste a modelo. Su aplicación final es el seguimiento de cultivos de precursores de miocitos que pueden presentar un comportamiento dinámico.

## 7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos SAF2008-05144-C02-02 del MICINN y 080331 de la Fundació La Marató de TV3.

## Referencias

- [1] M. Min, U. Pliquet, T. Nacke, A. Barthel, P. Annus, and R. Land, 'Signals in bioimpedance measurement: different waveforms for different tasks,' 13th International Conference on Electrical Bioimpedance and the 8th Conference on Electrical Impedance Tomography, IFMBE Proceedings., vol. 17, pp. 181-184, 2007.
- [2] Sánchez, B., Riu, P.J., Rosell, J., & Bragós, R. 'Espectroscopia de Impedancia Eléctrica para la caracterización de tejidos biológicos. Aplicación específica a medidas dinámicas.' XXVI Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica (CASEIB). Valladolid, Octubre 2008.
- [3] Kauppinen, J., Partanen, J., 'Fourier Transforms in Spectroscopy'.
- [4] R. Bragós, E. Sarro, A. Fontova, A. Soley, J. Cairo, A. Bayes-Genis, and J. Rosell, 'Four versus two-electrode measurement strategies for cell growing and differentiation monitoring using electrical impedance spectroscopy,' in Proc. 28th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society EMBS, 2006, pp. 2106-2109.
- [5] R. Bragós X. Gàmez, J. Cairó, P. Riu, F. Gòdia, 'Biomass monitoring using impedance spectroscopy'. Annals of the New York Academy of Sciences', 873, pp 299-305. 1999..