

Estudio de muestras óseas descalcificadas mediante factor de disipación dieléctrica

F. Ireta-Moreno^{*,**}
R. A. Martínez-Celorio^{*,**}
B. González-Rolón^{*}
E. Morales-Sánchez^{**}
R. Castro-Sánchez^{*}
D. Hernández-Fusillier^{*}
R. González-Peña^{***}
R. Salvador-Palmer^{***}

* Grupo de Bioingeniería, Dirección de Ingeniería Campus Irapuato-Salamanca, U. de Gto., Salamanca, Gto., México.

** CICATA Querétaro.

*** Grupo de Biofísica, Universidad de Valencia, España.

Correspondencia:

F. Ireta Moreno
Cerro Blanco Núm. 141, Col. Colinas del Cimatario, 76090 Stgo. de Querétaro, Qro. México.

Artículo recibido: 15/diciembre/2009

Artículo aceptado: 30/marzo/2010

Este artículo también puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medigraphic.com/ingenieriabiomedica/>

RESUMEN

En este trabajo se propone un método para determinar la descalcificación ósea mediante el Factor de Disipación Dieléctrica (FDD). El estudio se realizó sobre un conjunto de ocho muestras preparadas en forma de pastilla a partir de hueso de cerdo. Las pastillas fueron preparadas siguiendo un protocolo para inducir de forma controlada un grado de descalcificación. Éstas se probaron en una celda de prueba tipo capacitiva, la cual se conectó a un analizador de impedancia eléctrica que permite medir el FDD en función de la frecuencia. Los resultados obtenidos en el intervalo de frecuencia de 70 MHz a 90 MHz sugieren que el método propuesto permite evaluar cuantitativamente la descalcificación ósea. La importancia de este estudio radica en la posibilidad de desarrollar una técnica no invasiva para medir la descalcificación de los huesos y el diseño de equipos que permitan evaluar la osteoporosis, dado que actualmente esta patología se determina mediante técnicas de rayos X con capacidad ionizante.

Palabras clave: Factor de disipación dieléctrica, tejidos óseos, descalcificación.

ABSTRACT

In this paper, it is introduced a method to determine the bone decalcification using the so called dielectric dissipation factor (DDF). This study was developed using a set of eight samples taken from hog bone. These samples were arranged in a tablet shape. These tablets were prepared following a protocol that provokes a controlled decalcification degree. The samples were tested in a capacitive cell that was interconnected with an electric impedance analyzer. This equipment is able to measure the DDF as a function of frequency. The aforementioned tests were run in the interval of 70 MHz to 90 MHz. These results suggested that the proposed technique is a good choice to evaluate the bone decalcification quantitatively. The importance of this study is the possibility of develop a non invasive technique to measure the decalcification degree. Indeed, this method may be used to design a new generation of equipments that can be used to measure the osteoporosis. A non invasive method offers a less dangerous procedure to determine the effect of this illness, especially because the available schemes use ionizing radiation.

Key words: Dielectric dissipation factor, bone tissue, decalcification.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis se define según la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un trastorno esquelético que se caracteriza por una disminución de la resistencia de los huesos que predispone a éstos a un mayor riesgo de fracturas¹. La resistencia del hueso refleja principalmente la integración de la densidad ósea² (gramos de mineral por área de volumen) y la calidad del hueso (arquitectura, remodelación, daño acumulado y mineralización). Existen varios métodos disponibles para la medición de la masa ósea, los cuales usan técnicas de Rayos-X y para evaluar las radiografías implementan desde la interpretación subjetiva a las más sofisticadas técnicas cuantitativas de imágenes. Sin embargo, independiente del método usado todos persiguen el propósito de medir la cantidad de depósito mineral óseo partiendo de la base que los tejidos mantienen una composición química constante. El criterio estandarizado por la OMS para el diagnóstico de la osteoporosis está basado en hacer una comparación entre la densidad de masa ósea (DMO) del individuo bajo estudio, con el pico de la DMO del joven adulto³. Se conoce que este pico sigue una distribución normal según la edad y que alcanza su pico máximo entre los 25 a 35 años. Basado en este criterio, se estableció que un individuo tiene osteoporosis cuando el estudio de su DMO es de 2.5 veces menor al pico de DMO del joven adulto. Cuando los individuos cumplen con este criterio tienen un alto riesgo de sufrir una fractura ósea. Por consiguiente, el objetivo clínico consiste en identificar aquellos pacientes con bajos valores de DMO, para decidir un tratamiento adecuado antes de producirse una fractura. Sin embargo, existen factores que limitan hacer un estudio masivo como: la cantidad de centros de salud con dispositivos para realizar la prueba es limitada; alto costo de las pruebas; por otro lado, la prueba es invasiva aun usando los dispositivos de última generación de Rayos-X existentes en el mercado.

Las técnicas de impedancia eléctrica (IE) han sido ampliamente utilizadas para la medición de los sistemas biológicos^{4,5}. Estas técnicas se basan en obtener una relación entre la impedancia eléctrica y las propiedades físicas a medir del sistema biológico. Entre las ventajas que presenta la misma está su versatilidad y que son no invasivas. Uno de los métodos de la IE es la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE), la cual consiste en

analizar el comportamiento de la impedancia eléctrica del sistema a medir en función de la frecuencia^{6,7}. Entre las aplicaciones de la EIE, al estudio de sistemas biológicos, podemos encontrar el trabajo realizado por Llamosa et al.⁸, quienes caracterizaron cultivos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* spp de donde obtuvieron información acerca de las condiciones fitosanitarias de la membrana celular.

En humanos, la EIE ha sido usada para estudiar diferentes tipos de tejidos, por ejemplo: Hernández-Cabrera et al.⁹ determinaron los espectros de los componentes en muestras del tejido sanguíneo. Scharfetter et al.¹⁰, implementaron estas técnicas para analizar el comportamiento de la conductividad del cerebro humano en el intervalo de frecuencias 50 kHz a 5 MHz. Usando variaciones de las técnicas de IE, por ejemplo, tomografía de inducción magnética, Merwa R. et al.¹¹, reconstruyeron los cambios de la conductividad en el cerebro humano cuando son aplicados campos magnéticos alternativos. Fariñas et al.¹², estudiaron el comportamiento del tejido mamario en condiciones sanas y patológicas usando el parámetro conocido como factor de disipación dieléctrica (FDD). Combinando IE con otras técnicas, tal como elementos finitos, Martinsen O. et al.¹³, midieron el espesor de la córnea en un estrecho intervalo de bajas frecuencias. En el tejido óseo, esta combinación ha sido usada por F. Buroni et al.¹⁴, para determinar las constantes elásticas de los huesos. Por su parte, Xue-Qi Ma et al.¹⁵, midieron la densidad ósea trabecular implementando un método automatizado de análisis de imágenes que fueron obtenidas usando las técnicas de tomografía computarizada.

El objetivo de este trabajo es estudiar la variación del FDD *versus* frecuencia en muestras con diferentes grados de descalcificación. La importancia del estudio radica en la posibilidad de desarrollar una técnica para medir la descalcificación de los huesos y que permita la construcción de dispositivos para diagnosticar osteoporosis. El trabajo está dividido en cinco secciones. En la sección 2, se realiza una descripción de los principios teóricos del mismo. Seguidamente, la sección 3 explica el proceso de experimentación desarrollado para la preparación de las muestras; así como el arreglo experimental usado. Luego, en la sección 4, se presentan y discuten los resultados. Finalmente, las conclusiones del trabajo son presentadas en la sección 5.

DETALLES TEÓRICOS

Los dieléctricos o aislantes son sustancias que no conducen la electricidad. Estas sustancias tienen la propiedad de polarizarse bajo la influencia de un campo eléctrico externo. La polarización dieléctrica consiste en el alineamiento de momentos dipolares atómicos o moleculares permanentes o inducidos, en la dirección del campo eléctrico externo aplicado. La propiedad física fundamental de un dieléctrico es su permitividad dieléctrica, ϵ , la cual es una medida de cuánto es capaz de polarizarse el material. La permitividad dieléctrica es una magnitud macroscópica que manifiesta las propiedades microscópicas del material y depende de la frecuencia, pudiendo tomar valores reales o complejos.

Cuando aplicamos una corriente alterna a un dieléctrico perfecto, ésta adelanta al voltaje en $\pi/2$; sin embargo en dieléctricos reales, con pérdidas, la corriente adelanta el voltaje en sólo $\pi/2 - \delta$, siendo δ el ángulo de pérdida dieléctrica. Estas pérdidas pueden ser medidas mediante el factor de disipación dieléctrica, el cual se expresa por¹⁶:

$$FDD = \tan[\delta(\omega)] = \frac{\epsilon''(\omega)}{\epsilon'(\omega)} \quad (1)$$

donde: $\epsilon'(\omega)$ representa la permitividad relativa, $\epsilon''(\omega)$ representa la pérdida dieléctrica relativa.

DETALLES EXPERIMENTALES

Para comprobar el método propuesto, se desarrolló un procedimiento experimental que consta de dos etapas. En la primera etapa se realiza la preparación de las muestras para su estudio, obteniendo un conjunto de ocho pastillas de hueso con diferente grado de descalcificación. En la segunda etapa, se explica el arreglo experimental usado para medir el factor de disipación dieléctrica. A continuación son detalladas cada una de éstas.

Preparación de muestras

Los huesos están constituidos de diferentes sustancias, tales como: 25% de H_2O , 45% de minerales fosfatos y carbonatos de calcio y un 30% de materia orgánica principalmente colágeno y otras proteínas. Para hacer un estudio de la relación existente entre la pérdida de calcio (Ca^{+2}) y las variaciones de FDD en función de la frecuencia es necesario aislar del hueso los diferentes elementos dejando

sólo al Ca^{+2} . Este procedimiento es mostrado en el diagrama en bloques de la Figura 1 y está basado en un protocolo patológico, el cual ha sido modificado en orden de profundizar la limpieza.

Primeramente se hace una selección de hueso de cerdo, el cual es cortado con un espesor aproximado de 2 mm para facilitar el ataque químico y la limpieza del mismo. En el segundo paso, cada pieza de hueso se lava con agua destilada y es analizada en el microscopio para ver la profundidad de la limpieza. Este paso se repite hasta tanto las muestras de hueso estén libres de elementos externos, tales como: grasas, virutas y sangre; seguidamente, las muestras son secadas uniformemente en un horno de secado controlado

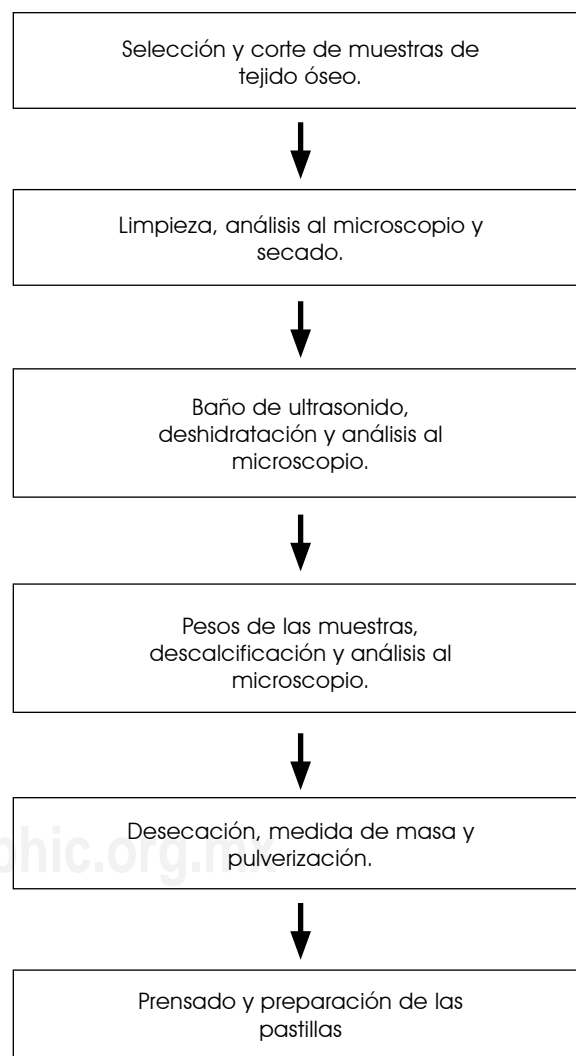


Figura 1. Diagrama en bloques del procedimiento para la preparación de muestras.

a la temperatura de 22 °C. En el tercer paso, las muestras se someten en un baño de ultrasonido usando una cubeta tipo marca BRANSON, modelo 1510R-DTH. Este baño produce ondas que por efecto de cavitación forman burbujas microscópicas que permiten hacer una limpieza molecular. Luego, las muestras vuelven a ser secadas hasta lograr el peso constante y nuevamente se observan al microscopio para comprobar su limpieza. En el cuarto paso, se mide la masa de cada pieza antes de ser descalcificada y se le aplica un ataque químico. Este ataque químico permite descalcificar la muestra controlando el tiempo de aplicación y consiste de una solución compuesta de HCl (ácido clorhídrico) concentrado al 0.001% en peso usándose la cantidad de 0.002 ml y de 10 ml de $H_2C = O$ (formol). Una vez descalcificadas las muestras, éstas son lavadas con agua destilada y vuelven a ser observadas en el microscopio para ver cómo han sido descalcificadas. En el quinto paso, las muestras son secadas a 22 °C hasta lograr un peso constante, el cual es medido para compararlo con el peso de la pieza sin descalcificar y así conocer el porcentaje de pérdida de Ca^{+2} . Después de esto, las muestras son pulverizadas usando un mortero de ágata. Finalmente, en el sexto paso, se preparan un conjunto de pastillas con una prensa hidráulica tipo Carver No. 3851-0, la cual permite controlar la presión aplicada. Para esto se usaron moldes de acero inoxidable y la presión aplicada para formar la pastilla fue de 4,000 psi sobre una cantidad de polvo de alrededor de 300 g. Previo a la preparación de cada pastilla los moldes de acero son limpiados con una solución de alcohol para evitar contaminación.

Arreglo experimental

En la Figura 2 se muestra el arreglo experimental utilizado para medir propiedades eléctricas de los huesos. El arreglo está compuesto de una celda de prueba, un analizador de impedancia y una computadora. La celda de prueba consiste en una celda capacitiva de dos electrodos de bronce circulares marca Hipotronics modelo: VPC-234, uno de los cuales puede moverse mediante un tornillo que permite variar la distancia entre las placas del capacitor. Entre estas placas se colocan las muestras (pastillas de hueso anteriormente descritas), las cuales tienen un conocido grado de descalcificación. La placa móvil de la celda permite cerrarse ejerciendo una presión constante, la cual es controlada por medio de un instrumento para medir presión de la firma MECMESIN con intervalo de 0-400

PSI, también mediante un pie de rey se mide la distancia entre las placas. Con estas lecturas se garantiza que se aplique una presión constante sobre cada pastilla durante el estudio y que la distancia entre placas permanezca constante. La celda está blindada ante interferencias de alta frecuencia.

Para evitar contaminación entre muestras, antes de cada medición se realiza un procedimiento de limpieza de los electrodos con etanol q.p. Igualmente, se calibra el equipo de medición, la celda y los valores de presión y distancia entre electrodos.

El analizador de impedancia es un instrumento modelo HP4191A, el cual permite medir los parámetros eléctricos primarios como: resistencia, conductancia, inductancia y capacitancia y además permite medir otros parámetros, tales como: factor de disipación dieléctrica y factor de calidad. El analizador tiene internamente una fuente de alimentación sinusoidal de amplitud constante y que se puede seleccionar a 0.25 v ó 1 v en el intervalo de frecuencia de 1 MHz a 1 GHz y con un paso mínimo de frecuencia de 1 MHz. Este instrumento puede ser controlado de forma remota vía puerto GPIB. La sonda de salida del analizador es de tipo BNC con una impedancia de 50 Ω permitiendo la conexión de un cable coaxial. El cable usado fue un coaxial RG58 que tiene un ancho de banda de hasta 1 GHz, mismo que cubre el intervalo de frecuencia usado de 1 MHz a 500 MHz evitando mediciones parásitas debidas a onda estacionaria y modos normales que aparecen en el mismo. El analizador se encuentra calibrado por el fabricante con una garantía de calibración hasta el diciembre de 2009; adicionalmente, el analizador permite una calibración para compensar las pérdidas parásitas debidas al cable.

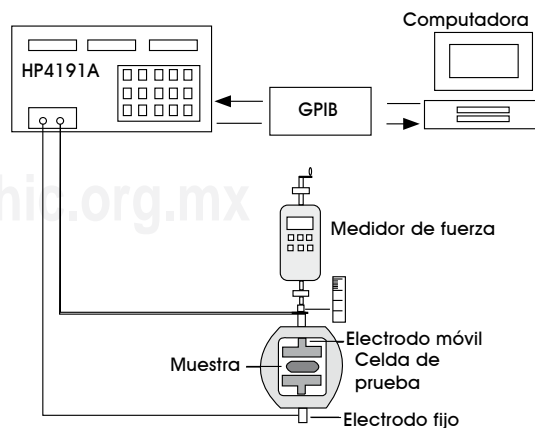


Figura 2. Arreglo experimental para la determinación del factor de disipación dieléctrica.

Para controlar el analizador se desarrolló un instrumento virtual mediante programación gráfica en Labview versión 8.1 bajo plataforma Windows XP. El programa consta de tres etapas fundamentales; la primera etapa es de control, donde se le indica al instrumento los parámetros a medir, intervalo de frecuencia de trabajo, etc. En la segunda etapa, se realiza la adquisición de las mediciones, donde se han usado los instrumentos virtuales propuestos por el fabricante para el equipo. Finalmente, la tercera etapa es de presentación de los resultados, donde en tiempo real el instrumento muestra el resultado de la medición del parámetro deseado en función de la frecuencia. El programa desarrollado permite también guardar los resultados de las adquisiciones en archivos de tipo texto para ser usados por otros programas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 3 se observan las imágenes de seis de las muestras que fueron usadas para hacer el es-

tudio. Las imágenes en la columna de la izquierda se corresponden con la pieza de hueso cortada. En la columna central aparece la imagen vista al microscopio con un aumento de 10X sin descalcificar; mientras en la columna de la derecha aparecen las muestras después del proceso de descalcificación.

En estas imágenes se puede observar cómo la solución para lograr la descalcificación actúa sobre cada muestra al transcurrir el tiempo. La primera muestra no estuvo inmersa en el proceso de descalcificación, mientras las siguientes muestras duraron un día más que su predecesora en el proceso de descalcificación. Después de este proceso, se calculó la pérdida de calcio (Ca^{+2}) para cada muestra, los cuales están representados en el Cuadro 1.

Estos valores han sido referenciados al porcentaje de pérdida de peso de cada una de las muestras.

Una vez construida cada pastilla, las mismas son colocadas en la celda de prueba del arreglo experimental descrito. En la Figura 4, se muestran

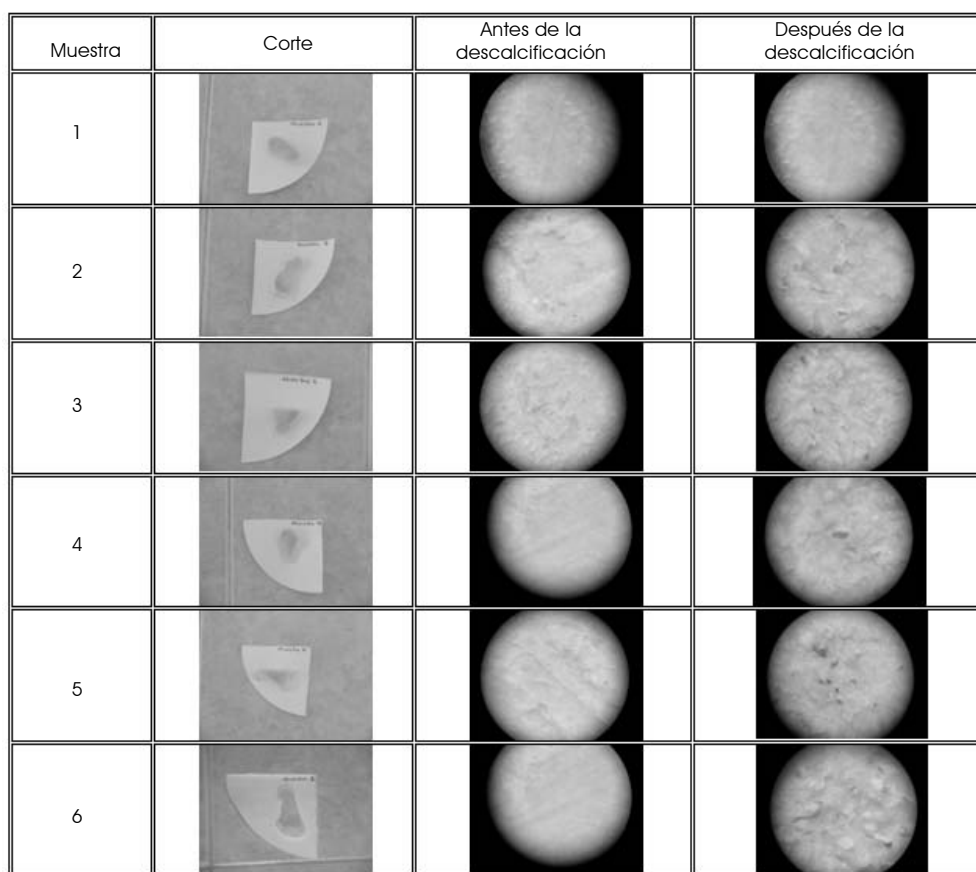


Figura 3. Imágenes de seis muestras estudiadas. En la columna de la izquierda se encuentran las muestras de hueso cortada; mientras que en las siguientes columnas se hallan las muestras sin descalcificar y descalcificadas, respectivamente.

los resultados obtenidos del comportamiento del FDD *versus* frecuencia para el conjunto de las seis muestras seleccionadas. El estudio se realizó bajo las siguientes condiciones: el analizador de impedancia se mantuvo a un voltaje de 1 v y la frecuencia fue variada en el intervalo de 1 MHz hasta 500 MHz en pasos de 1 MHz; además, la presión entre las placas del capacitor de la celda de prueba se mantuvo al valor de 1 kgf.

Como se puede observar en esta figura existe variación en el valor del FDD en función de la frecuencia para los diferentes grados de descalcificación de las muestras. Se destacan varios intervalos de frecuencia que se corresponden a los mecanismos de polarización predominantes en dichos intervalos de frecuencia. Un análisis detallado del primer intervalo de frecuencia, 70 MHz a 90 MHz, es mostrado en la Figura 5.

En esta figura se destacan los picos en el valor del FDD que ocurren para diferentes frecuencias en dependencia del grado de descalcificación. Se observa una correspondencia en cuanto a que la posición del pico en el valor del FDD ocurre a menor valor de frecuencia a medida que es mayor porcentaje de descalcificación de la muestra. Por ejemplo, para la muestra con 0% de descalcificación, el valor pico ocurre a la frecuencia de 86 MHz; mientras que para 1.43% de descalcificación el pico ocurrió a 83 MHz. Por el intervalo de frecuencia analizado y considerando a las pastillas de hueso como un material cerámico, los mecanismos de polarización predominantes en este estudio son debidos a carga espacial e iónica.¹⁷ Esto quiere decir que los iones calcio son los responsables de la variación en el FDD, por lo que a mayores concentraciones de Ca⁺² los picos se recorren a menores frecuencias, indicando una mayor pérdida dieléctrica por una mayor concentración de iones.

Cuadro 1. Datos de la masa de cada muestra antes y después del proceso de descalcificación.

Muestra	Masa antes de la descalcificación (gramos)	Masa después de la descalcificación (gramos)	Porcentaje de descalcificación
Muestra 1	(0.6691)	(0.6691)	0
Muestra 2	(1.0063)	(1.0045)	0.178
Muestra 3	(0.6699)	(0.6603)	1.43
Muestra 4	(1.3726)	(1.3122)	4.4
Muestra 5	(0.9369)	(0.8377)	10.59
Muestra 6	(0.9775)	(0.8411)	13.95

Una evaluación de los errores cometidos en el procedimiento propuesto indica que los mismos están dados principalmente en el proceso de construcción de las pastillas. Estos errores fueron: lavado, secado y control de la presión, los cuales permiten dejar residuos de materia orgánica, humedad y una diferencia de grosor en las pastillas de hueso, respectivamente. Por estas razones, el proceso de construcción de las pastillas fue muy controlado usando varios tipos de limpieza, control de humedad al 30% y la aplicación de una presión constante. También una posible fuente de error fue el control de la distancia entre las placas de la celda de prueba y la presión a la que fue sometida la pastilla por dichas placas. Para analizar esta influencia, se usaron dos valores de presión, 1.5 kgf y 2.0 kgf, entre las placas y manteniendo las mismas condiciones en el experimento. Los resultados obtenidos no indican variación en los valores de la frecuencia obtenida por los picos, pero sí en el valor de la amplitud de los mismos.

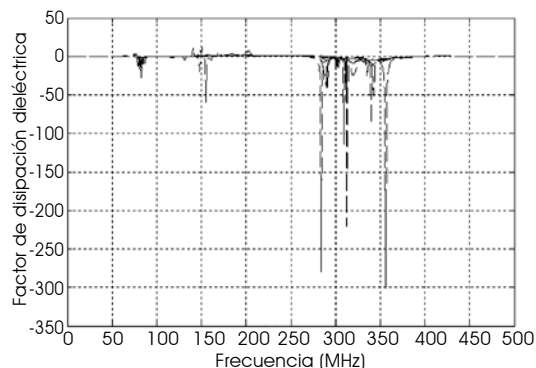


Figura 4. Gráfica del FFD *versus* frecuencia para las seis muestras presentadas con 1kgf de presión.

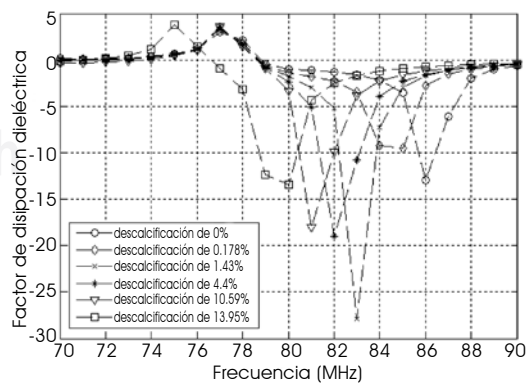


Figura 5. Gráfica del FFD *versus* frecuencia en el intervalo de 70 a 90 MHz.

Por otro lado, es necesario comentar que, la regularidad obtenida en la posición de los picos del FDD no es observable en los restantes intervalos de frecuencia del espectro para cada muestra, nosotros consideramos que en estas zonas influyeron los valores correspondientes al espectro de frecuencia del cable RG58.

CONCLUSIONES

Se realizó un estudio del Factor de Disipación Dieléctrica en función de la frecuencia en muestras con diferentes grados de descalcificación. Los resultados obtenidos indican que en el intervalo de frecuencia de 70-90 MHz, existen variaciones medibles del valor del FDD en función de la frecuencia. La posición de los valores picos del FDD depende de la variación de la concentración de iones Ca^{+2} en hueso descalcificado permitiendo obtener sus curvas de relajación. Los resultados sugieren que el método propuesto puede ser una alternativa para la medición de descalcificación ósea. Para realizar dichos estudios se deben tener en cuenta los demás componentes del hueso, primero por separado y después en su conjunto, con el objetivo de analizar la difusión de la corriente eléctrica en el material. Este estudio fue realizado controlando variables secundarias que podrían afectar las mediciones como: limpieza de residuos orgánicos en las muestras, presión, control de voltaje y frecuencia y humedad relativa. La importancia del estudio es que el mismo puede ser aplicado en el desarrollo de equipos para diagnosticar osteoporosis para sustituir los actuales equipos que usan radiaciones ionizantes de Rayos-X.

RECONOCIMIENTOS

El primer autor agradece el apoyo de COSUPERA y a CICATA, IPN Unidad Querétaro por las facilidades otorgadas para realizar sus estudios doctorales. RAMC quiere agradecer a las siguientes instituciones: CONCyTEG, por el apoyo de proyecto No. 07-16-K662-061, CONAcYT por el proyecto SNI tutorías 2008. Los autores agradecen la colaboración del Dr. René Juárez Suárez, especialista en Patología quien asesoró el procedimiento de preparación de las muestras y a los estudiantes Ana Laura López Orocio y Juan Pablo Córdova Barbosa, quienes ayudaron en el desarrollo del procedimiento de preparación de las muestras y por sus valiosos comentarios.

REFERENCIAS

1. Mudgal JC, Hernández-Ávila M, Salmerón J. Reference values for areal bone mineral density among a healthy Mexican population. *Salud Pública Mex* 2009; Vol. 51, suppl 1, S56-S83.
2. Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, Cauley J, Ensrud K, Genant HK, Palermo L, Scott J, Vogt TM. Bones density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet* 2000; 341(8837): 72-75.
3. Tamayo J, Díaz R, Lazcano-Ponce E, Muñoz M, Huitrón G, Halley E, Díaz-Montiel. *Salud pública de México*, 2009; Vol. 51, Suplemento 1, S56-S83.
4. Grimnes S, Martinsen ØG. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. San Diego, CA: Academic Press, 2000.
5. Geddes LA, Baker LE. *Principles of Applied Biomedical Instrumentation*. New York: John Wiley, 1989.
6. Ollmar S. Methods for information extraction from impedance spectra of biological tissue, in particular skin and oral mucosa—a critical review and suggestions for the future. *Bioelectrochem. Bioenerg* 1998; 45: 157-160.
7. Pethig R. *Dielectric and electronic properties of biological materials*. New York: John Wiley, 1979.
8. Llamasa DP, Muñoz AE, Cárdenas MP, Segura GB, Rosales RA. Caracterización de sistemas biológicos a través de la técnica de espectroscopia de impedancia bioeléctrica (EIB). *Revista Colombiana de Física* 2006; 38(1): 321-324.
9. Hernández Cabrera F, Guerrero Salazar CA, Bernal Alvarado JJ. Determinación de las propiedades eléctricas en tejido sanguíneo. *Ingenierías* 2005; VIII(29): 7-13.
10. Scharfetter H, Brunner P, Mayer M, Brandstätter B, Hinghofer-Szalkay H. Fat and hydration monitoring by abdominal bioimpedance analysis: Data interpretation by hierarchical electrical modeling. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 2005; 52(6): 975-982.
11. Merwa R, Hollaus K, Brandstätter B, Scharfetter HE. Numerical solution of the general 3D eddy current problem for magnetic induction tomography (spectroscopy). *Physiol Meas* 2003; (24): 545-554.
12. Fariñas-Coronado W, Paz Z, J. Orta GJ, Rodríguez-Denis E. Estudio del factor de disipación dieléctrica como herramienta diagnóstica. *Rev Biomed* 2002; 13(4): 249-255.
13. Martinsen ØG, Grimnes S, Haug E. Measuring depth depends on frequency in electrical skin impedance measurements. *Skin Research and Technology* 1999; (5): 179-181.
14. Buroni FC, Comisso PE, Cisilino AP, Sammartino M. Determinación de las constantes elásticas anisótropas del tejido óseo utilizando tomografías computadas. Aplicación a la construcción de modelos de elementos finitos. *Mecánica Computacional Vol. XXIII*, pp. 3009-3032, Eds. G. Buscaglia, E. Dari, O. Zamonsky, Bariloche, Argentina, November 2004.
15. Xue-Qi Ma, Overton TR. Automated image analysis for bone density measurements using computed tomography. *IEEE Transactions on medical imaging* 1991; 10(4): 611-615.
16. von Hippel AR. *Dielectrics and Waves*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1954.
17. Volkov AA, Prokhorov AS. Broadband Dielectric Spectroscopy of Solids. *Radiophysics and Quantum Electronics* 2003; 46(8): 657-665.