

## INTRODUCCION AL MANEJO DEL NICOLET-520 FTIR

### ENCENDIDO TRAS UN CORTE DE CORRIENTE:

1. El estabilizador de corriente está apagado:
  - Antes de ponerlo de nuevo en funcionamiento, debemos asegurarnos de poner el interruptor de la unidad de refrigeración de la lámpara de IR en posición **OFF (O)**.
  - Igualmente, pondremos el interruptor del haz de laser en posición **OFF** (este se localiza en la parte trasera del espectrofotometro).
2. Una vez desconectados la lámpara IR y el haz laser, oprimiremos el botón de **RESET** (botón Rojo) del estabilizador de corriente para reestablecerla.
3. A continuación, debemos averiguar cuanto tiempo ha transcurrido desde que se produjo el *corte*: Esto es especialmente importante, ya que la lámpara IR debe dejarse **enfriar** al menos durante **4 horas** antes de poder encenderse.
 

**ATENCION:** si la lámpara se conecta **caliente**, podría romperse.
4. Transcurridas al menos 4 horas, procederemos a poner los interruptores del haz laser y de la lámpara IR en **ON ( I )**.

### MANTENIMIENTO DEL APARATO Y REVISIÓN GENERAL TRAS EL CORTE:

#### 1. Revisión del COMPRESOR:

Si el compresor no funciona correctamente el *interferometro* tampoco funcionará. Esto es debido a que el Interferometro se mueve mediante un *colchón de aire*.

La regulación del compresor deben ser la siguiente:

**Manómetro de Presión:** comprendido entre Min= 5 y Max= 7 Kg/m<sup>2</sup>.

**Manómetro de Flujo:** máximo de 14 l/min.

#### Indicadores de pared:

**Válvula de aire seco:** Controla el aire que entra en el espectrofotometro para eliminar el vapor de agua, tanto de la cámara de muestra como de la óptica interna.

**Interferometro:** Manómetros de alta y de baja. Controla el aire que mueve al *interferometro*. El de la izquierda debe estar siempre **cercano a los 60 psi**, y el de la derecha debe indicar justamente **30 psi**.

#### 2. Mantenimiento: Los parámetros descritos anteriormente deben revisarse a diario.

**Eliminación del agua de condensación:** Desde el calderín. Purgar a diario.

**Cambio de aceite:** cada 500 h.

**Filtros de aire:** revisión anual.

### INTERCAMBIO D2O-H2O:

Los intercambios de H<sub>2</sub>O por D<sub>2</sub>O se pueden llevar a cabo de distinta forma dependiendo del tipo de muestra del que disponemos. Los tampones se pueden preparar en H<sub>2</sub>O a la concentración y pH deseados y liofilizarlos en pequeñas alícuotas, para posteriormente rehidratarlos en D<sub>2</sub>O. Tener siempre en cuenta que el pD (lectura de un electrodo de H sumergido en D<sub>2</sub>O) guarda la siguiente relación:

$$pD = pH + 0.4$$

**Proteínas liofilizadas:** es el caso más sencillo. Bastará con pesar la proteína y añadir el tampón preparado en D<sub>2</sub>O.

**Proteínas en disolución:** Lo más sencillo es liofilizarlas. Si no se pudiese, deberán intercambiarse por centrifugación utilizando CENTRICON o similar del corte adecuado para nuestra proteína. La velocidad y los tiempos de centrifugación vendrán determinados por las especificaciones de los concentradores.

**Proteínas de membrana:** Si no se pudiesen liofilizar ni siquiera en presencia de agentes crioprotectores (azúcares), se intercambiarán por ultracentrifugación. El protocolo siguiente es el empleado para el intercambio isotópico del AcChR

- Coger un volumen adecuado de muestra que contenga 1 mg de proteína.
- Concentrar la muestra mediante centrifugación utilizando Tubos de centrífuga modelo *Kontron*, con tapones de aluminio verde 7/16" con sus correspondientes adaptadores. Rotor TFT-70: 4°C, 15 minutos y 45000 rpm (100.000xg).
- Extraer el sobrenadante (H<sub>2</sub>O) de la muestra centrifugada, así como las "gotitas" de agua que queden pegadas a las paredes (usar una micropipeta *Hamilton* si fuese necesario). Es importante eliminar el máximo de agua.
- Lavar la muestra con D<sub>2</sub>O o (tampón en D<sub>2</sub>O) con la mayor rapidez posible. Volumen= 1 ml de tampón D<sub>2</sub>O de lavado. Una vez resuspendida, añadiremos 1 ml más del mismo tampón y agitaremos suavemente (debe evitarse la formación de espuma, ya que se asocia con dicha espuma con proteína desnaturalizada).
- Concentrar de nuevo la muestra mediante centrifugación: rotor TFT-70, 4°C, 40 min., 55000 rpm. Las condiciones de centrifugación son más duras ya que la muestra tiende a flotar en D<sub>2</sub>O.
- Extraer el todo el D<sub>2</sub>O y resuspender el *pellet* con la ayuda de una micropipeta en tampón D<sub>2</sub>O para obtener una concentración final de **20 mg/ml** (aproximadamente 50 µl de tampón por cada mg de proteína).
- Guardar la muestra en nevera y usarla en pocas horas.

NOTA: El D<sub>2</sub>O se guarda preferentemente en un desecador con CaCl<sub>2</sub>, porque es muy *higroscópico*. Por ello es imprescindible actuar con rapidez tanto en la apertura-cierre del desecador, como en la toma del tampón. Los tubos y viales con D<sub>2</sub>O deben permanecer cerrados siempre.

## INTRODUCCION AL MANEJO DEL PROGRAMA NICOLET PCIR

### ARRANQUE DEL PROGRAMA PCIR:

- Cuando se arranca por primera vez (ordenador recién encendido), tecleamos :

**C:\>CD PCIR ↵ (Enter)** Esto nos introduce en el directorio PCIR.

A continuación, tecleamos: **PC**

**C:\>PCIR>PC ↵**

Esta secuencia carga el programa *DRIVERS* para toda la sesión de ordenador.

- Cuando se arranca a lo largo de la misma sesión diaria, el *DRIVERS* queda residente en memoria, y basta con utilizar la secuencia de acceso:

**C:\>PCIR>PCIR ↵**

- Si el ordenador se apaga durante la sesión, el *DRIVERS* se pierde. En este caso, debemos iniciar de nuevo usando: **PC**.

**C:\>PCIR>PC ↵**

### ALINEAMIENTO DEL HAZ DEL ESPECTROFOTOMETRO:

Resulta imprescindible para una correcta utilización del aparato, que el haz de infrarrojo este adecuadamente alineado y que proporcione un máximo de señal. Un alineamiento incorrecto implicaría que no llegase la máxima intensidad de luz al detector, con la consiguiente pérdida de señal.

#### Procedimiento de alineado:

- Acceder al programa *Nicolet PCIR*, tal y como se indica en el apartado anterior.
- Apartar el shuttle con Sh=in
- Seleccionar **ALIGN** (la tecla de función **F7**).
- En la pantalla aparecera un interferograma (gráfico), y una serie de parámetros. Dentro de los parametros, debemos fijarnos en los siguientes:

**Peak Location:** debe ser un número centrado en  $1000 \pm 1$ .

**Resol in  $\text{cm}^{-1}$ :** la resolución más adecuada es **16**, si bien, puede modificarse en caso necesario por medio de las teclas de función **F3** (aumentarla) y **F4** (reducirla).

**Velocity:** la más adecuada es la **MIDIUM** ya que estamos trabajando con un detector DTGS. La velocidad puede variarse (para otros detectores) usando la tecla de función **F8**.

**Gain:** El valor utilizado debe ser **1**, ya que de este modo conseguimos que la señal eléctrica que envía el detector sea *la real* y no *la amplificada electrónicamente*. Puede modificarse mediante **F9**.

- El valor del parámetro **Peak Maximum**, es el más importante en el alineamiento, ya que dicho valor debe situarse entre un máximo de **25000** y un mínimo de **19000**, aunque estos valores dependen del estado del aparato, edad de la lámpara, etc. Los valores indican la intensidad máxima de luz infrarroja que llega al detector *DTGS*.

**ATENCIÓN:** La modificación de este parámetro debe realizarse por medio de los dos tornillos a los que se puede acceder por medio de dos ventanas situadas en la parte trasera del espectrofotómetro.

Se deben tomar las siguientes *precauciones*:

- 1.-Solamente es necesario ajustar el tornillo superior y no tocar el inferior, excepto en casos de desajuste muy fuerte.
- 2.-Se debe acceder a los tornillos con el destornillador en *Angulo oblicuo*, nunca en *angulo recto*.
- 3.-El movimiento de los tornillos nunca debe exceder los 360° (hacia un lado u otro), y deben ajustarse hasta conseguir un parámetro de **Peak Maximun** entre **25000** y **22000**.

**Condiciones iniciales del programa: AUTO.OPT.**

-El programa recién iniciado, carga de forma automática las Condiciones iniciales programadas en el fichero AUTO.OPT:

1). *Collect parameters:*

**Resolution: 2 cm<sup>-1</sup> Shuttle.: IN (situac. Muestra) Scans: 10  
msmode: Transmittance Detector: 0 (detector tipo DTGS)  
Velocity: Auto ó Midium (velocidad del espejo móvil para detector DTGS)  
Gain: 1 (significa que la señal del detector es la real (x1))  
Correlation: ON (elimina los scans defectuosos)  
Aperture: Large (siempre).**

2). *FFT parameters :*

**Apodization: Happ-Genzel  
Phasetype: MERTZ (procedimiento corrección de fase)  
Phasepoints: 1024 (nº puntos máximo para interferograma) Autofilter: ON  
Zerofillfactor: 1  
Highcompute freq: 4100 cm<sup>-1</sup> (xmax)  
Lowcompute freq: 900 cm<sup>-1</sup> (xmin).**

3). *DATA manipulation:*

**Passes: 1 Points: 5  
Fraction: 1 (valor "inicial" de F para la resta interactiva ).**

4). *File I/O (input/output):*

**Path: C:\PCIR>DATA> Qdatapath: C:\PCIR>QUANT>  
Fullpath: (se usa para cuantificar)  
Autofilename: SDAA ( nombre por defecto)  
Seed: 1 (numero inicial de una serie de espectros con mismo nombre genérico (autofile)).**

5). *Display parameters:*

**Autoescape: ON Xmode: ON Ymax: 4 Ymin: 0.05 Xmax: 4100 Xmin : 900  
Tmax: 79.755 Tmin: -0.176 (T: Transmittance).**

6). *Hard copy*:

**pport: 1** (conexión salida a **COM 1**)

**pbaudrate: 9600** (velocidad Baudios) **pparity: NONE** (sin paridad) **pstopbits: 1** (bytes de parada)

**wordlength: 8** (paquetes de información bytes).

-Todas las condiciones iniciales pueden ser modificadas en función de las necesidades. El cambio de dichas condiciones iniciales, puede llevarse a cabo de dos formas:

a).-Escribiendo su *abreviatura* (indicada en negrita), seguida del signo = y del nuevo valor: (p.ej.: **XMA=3000**: la nueva X maxima sería 3000 y no 4100). La escritura se debe realizar en la *línea de Mandatos*: >....

b).-Usando *menus desplegables* a los que se accede mediante **F2**. Estas condiciones modificadas, permanecen en un *buffer OPT* durante la ejecución del programa. Si deseamos preservarlas, debemos *grabarlas* con un *FILENAME.OPT* (p.ej. *USUARIO.OPT*), la limitación del *Filename* son 8 digitos como máximo: por ejemplo :

**SAVE OPT USUARIO (Enter)**: esto grabaría las nuevas condiciones con el nombre *USUARIO.OPT*.

-En posteriores accesos al programa *PCIR*, lo primero en cargarse es el *AUTO.OPT*, si deseamos cargar el *USUARIO.OPT* tendremos que hacerlo del siguiente modo:

**LOAD OPT USUARIO (Enter)**: esto cargaría las condiciones iniciales almacenadas en el fichero *USUARIO.OPT*.

### Buffers de memoria volatil:

-Existen unos *Buffers* de *memoria volatil* en los que quedan almacenados los registros recién tomados (si hay más de un registro del mismo tipo, solo guardan el último):

- 1.- Buffer **BAC**: almacena el último background.(Ext. \*.**BKG**)
- 2.- Buffer **SAM**: almacena el último registro de la muestra (Ext. \*.**IRD**)
- 3.- Buffer **REF**: almacena el registro de la referencia (Ext. \*.**IRD**).
- 4.- Buffer **RES**: almacena el registro de Absorbancia de la muestra a la que se le hace cualquier tipo de modificación (p.ej. Resta de D2O, deconvolucion,etc) (Ext. \*.**IRD**).
- 5.- Buffer **IFG**: almacena el registro del interferograma.(Ext. \*.**IFG**).
- 6.- Buffer **Baseline**: almacena el registro de la línea base.
- 7.- **Method** Buffer: almacena cualquier método que se desee para análisis cuantitativo.
- 8.- Buffer **OPT**: almacena cualquier serie de parámetros de ejecución del programa que deseemos utilizar .

-Existen también 7 *buffers* especiales para cuando pretendemos comparar muchos espectros sobrepresionándolos entre sí:

-Desde **HIT 1** a **HIT 7**: Resultan especialmente útiles para superponer muchos espectros en pantalla y son igualmente volátiles.

### Grabación de registros de absorbancia: SAVE

-Si deseamos Grabar un único registro de absorbancia de muestra, existen dos posibilidades:

1.- Si queremos grabar el espectro entero en un formato binario-IRD:

**SAVE SAM FILENAME** (Filename: nombre muestra max. 8 digitos).

p.ej.: **SAVE SAM SDAA (enter)** : se grabaría en C:\PCIR\DATA como SDAA.IRD

2.- Si deseamos grabarlo en formato ASCII Truncado entre dos números de onda :

**SAVE SAM FILENAME.XY Xmin. Xmax.** (Filename: nombre muestra max. 8 digitos con extensión .XY; **Xmin.** y **Xmax.** : acotamiento entre los que será grabado el fichero en ASCII. La ausencia de Xmin y Xmax implica grabar espectro completo)

p.ej.: **SAVE SAM SDAA.XY 1300 1900 (enter)**: se grabaría en DATA como SDAA.XY truncado entre 1300 y 1900  $\text{cm}^{-1}$

-Si deseamos Grabar una serie de espectros de denaturalización térmica, existen dos posibilidades que implican el uso del **AUTOFILENAME**:

1.- Grabar los espectros enteros en formato Binario-IRD: el **AUTOFILENAME** se halla definido por defecto en el AUTO.OPT como SDAA. La limitación del Autofilename es de 4 dígitos máximo. Si deseamos poner otro nombre debemos definirlo:

**AUTOFILENAME= File** (nombre genérico 4 dígitos p.ej.: SDAB)

La *semilla* (número que pondra al primer registro de la serie, también está definida por defecto: **SEED=1** ; si bien, es conveniente volverlo a definir: **SEED=1**).

El *Autofilename* está diseñado para dar a cada espectro de la serie el mismo nombre genérico, y aumentar la *semilla* (numero acompañante) en una unidad cada vez que aparezca el signo @ (cada nuevo espectro):



**SAVE SAM @ (Enter):** graba el primer registro con el nombre genérico contenido en el Autofilename y le añade el nº contenido en SEED (p.ej.:SDAB0001.IRD), automáticamente el valor de SEED se incrementa en una unidad..

**SAVE SAM @ (Enter):** graba el 2º fichero con el nombre genérico y le añade el nuevo valor de SEED (p.ej.:SDAB0002), sumando otra unidad al valor de SEED .

-Así sucesivamente hasta completar la serie.

**2.- Grabar los espectros en forma de ficheros de pares X/Y en ASCII truncados o no entre dos números de onda:**

-Ficheros no truncados: añadiremos la extensión **.XY** al nombre del fichero.

**SAVE SAM Filename.XY (Enter):**

-Ficheros truncados: añadiremos además los valores Xmax. y Xmin. entre los que truncaremos :

**SAVE SAM Filename.XY Xmin Xmax (Enter):** p.ej: Xmin =**1300** ; Xmax.=**1900**.

-Estos ficheros en ASCII (truncados o no), deberán sufrir una serie de transformaciones para poder ser utilizados en otros programas. Estas se explicarán en un apartado posterior dedicado a la conversión de datos.

-Finalmente, existe un MACRO, que permite hacer la grabación de series de desnaturalización térmica en formato ASCII (X/Y) truncadas: MACRO **TRUNCATE**. O bien restar series y grabarlas en formato ASCII (X/Y) truncadas: MACRO **RESTRUN**. Estos macros serán explicados en apartados posteriores: "Operaciones del programa PCIR" y "Otras Funciones" respectivamente.

-Por último, resulta muy importante realizar *Copias de seguridad* de los registros originales en *diskettes* disponibles a ese efecto (dentro de sus correspondientes subdirectorios).

Al mismo tiempo, debe llevarse una *contabilidad escrita* de los registros almacenados en estos *diskettes*.

### **Recuperar espectros únicos o series de espectros: LOAD**

-Si deseamos recuperar *espectros únicos* que se hallen grabados dentro del subdirectorio *DATA* e introducirlos dentro de los *buffers* de memoria volátil que operan en el programa *PCIR*, procederemos de la siguiente manera:

1).- Para recuperar registros de D2O y usarlos como *referencia*:

**LOAD REF Filename (Enter):** esto recupera el espectro de D2O especificado con dicho *filename*, y lo introduce en el *buffer REF*.

2).-Para recuperar espectros de absorbancia de muestra:

**LOAD SAM Filename (Enter):** esto recupera el espectro de la muestra especificado con dicho *filename*, y lo introduce en el *buffer SAM*.

3).-En general, para cualquier espectro que queramos recuperar:

**LOAD + (Buffer en el que introducirlo) +Filename (Enter)**

-Si deseamos recuperar *series de espectros* que se hallen grabados en el subdirectorio *DATA*, debemos tener en cuenta *dos consideraciones importantes*:

1.- Podemos proceder *recuperándolos como espectros únicos* utilizando el método anterior y reclamándolos de uno en uno .

2.- Utilizar la recuperación por **AUTOFILENAME manual**:

.Debemos definir el Autofilename, ya que de no hacerlo, este sería definido por defecto como SDAA. De igual modo resulta conveniente definir la semilla:

**AUTOFILENAME**=nombre genérico.

**SEED= 1** ( normalmente )

.A continuación, comenzaríamos recuperando el espectro nº 1:

**LOAD SAM @:** esto recupera el 1º y lo guarda en el buffer SAM. La semilla se incrementa en 1.

.Cada vez que repitamos la anterior orden, se recuperará el siguiente espectro y así sucesivamente.

3.- Utilizar los MACROS **AUTOFILE** y **AUTOLOAD**: estos macros se Definiran al final en un Apartado posterior:"Otras Funciones".

.**NOTA:** cada vez que hacemos un nuevo **LOAD S @** este espectro se sobrescribe en el buffer SAM, con lo cual si deseamos operar con ellos existen *dos posibilidades*:

a).Hacer las operaciones con cada espectro antes de hacer el *LOAD* siguiente .

b).Copiarlos hacia otros buffers:(Los más adecuados son **HIT 1 a HIT 7**). Para ello se utilizará la orden **COPY** que ampliaremos en un apartado posterior a este.

### Toma de espectros con el espectrofotometro :

- **OPCION MANUAL:** Permite la toma directa de espectros.

-Es necesario definir el número de scans (**SC**). Al aumentar el nº de scans mejora la relación S/R (señal/ruido) del registro (p.ej.: > **SC=1000 (Enter)**).

-Hay que colocar la *lanzadera* (**SH**) en la posición correcta por medio de las órdenes del *software*:

- Para tomar el espectro de *Background* debe retirarse la muestra de la línea de paso del haz, para ello anotaremos en la línea de mandatos (>...) el parámetro y su valor, o bien utilizar la opción **Ctrl+F9**:

> **SH=IN (Enter)**.

-A continuación debe pedirse la toma del Background:

-El background será tomado como *interferograma*, se transformará a *espectro de intensidad* y como tal se almacenará automáticamente en el *buffer BAC*. Para pedirlo, debemos apuntar en la línea de mandatos:

> **BAC (Enter)**

-Volveremos a colocar la *lanzadera* (**SH**) en la posición correcta para poder tomar el espectro de muestra:

- Para tomar el espectro de la *muestra*, debe interponerse la misma en la línea de paso del haz, se puede usar la opción **Ctrl+F10**, o escribir:

> **SH=OUT (Enter)**

-A continuación debe pedirse la toma de muestra:

-El registro será tomado como *interferograma*, y será transformado a *espectro de intensidad* quedando almacenado transitoriamente en el *buffer SAM*. A continuación el programa racionalizará automáticamente este registro con el del contenido del *buffer BAC* (SAM/BAC), transformándolo en espectro de *transmitancia* y almacenándolo en el *buffer SAM* (sobrescrito al anterior). Para pedirlo, escribiremos en la línea de mandatos:

> **SAM (Enter)**

-Debemos transformar el espectro de *transmitancia* en uno de *Absorbancia*:

- Para transformarlo a *Absorbancia*, la orden sería:

> **ABS SAM (Enter)**

El espectro de absorbancia resultante se almacena automáticamente en el *buffer SAM* sustituyendo el de *Transmitancia*.

-La secuencia de órdenes puede ponerse en una sola línea, dando las órdenes separadas por espacios, como sigue:

**SC= N° Scans SH=IN BAC SH=OUT SAM ABS SAM.**

Seguidamente, se grabaría **SAVE SAM FILE**

## **- OPCIONES PROGRAMADAS: MACROS.**

### **(1).- Toma RAPIDA de espectros con N° Scans Bajo:**

-El macro **RAPIDO**, presenta el siguiente *Listado*:

```
XMIN=900 XMAX=4100 RES=2 SC=10 GAIN=1 AUTOSCALE=ON
SH=IN WAIT 10 BACK SH=OUT WAIT 10 SAM ABS SAM
SAVE SAM RAPIDO beep 2
```

-La opción se inicia pidiendo:> **RUN RAPIDO**. Como segunda opción de arranque se puede accionar **Shift+F1**.

-El valor de N° de scans es automático e igual a **10**.

-Toma rápidamente un Background **de 10 Scans**, y lo almacena en el *buffer BAC*. Tras 10 segundos de espera adquiere un espectro de Transmitancia **de 10 Scans** para la muestra que rápidamente se transforma en un espectro de *Absorbancia* almacenándose este en el *buffer SAM*.

-La grabación del espectro de Absorbancia es *Automática*, grabándose con el nombre **Rapido.IRD**.

-Concluido esto suena un *pitido* de 2 segundos.

### **(2).- Toma de espectro UNICO: macro UNICO:**

-Listado del **Macro UNICO**:

```
MESSAGE Número de barridos= $ INPUT N
MESSAGE Ganancia= $ INPUT G
MESSAGE Nombre de la muestra= $ INPUT NOM
MESSAGE Tiempo de espera en segundos= $ INPUT T
XMIN=900 XMAX=4100 RES=2 AUTOSCALE=ON
SC=N GAIN=G SH=IN WAIT T BACK SH=OUT
WAIT 10 SAM ABS SAM SAVE SAM NOM Beep2
```

-Este macro se *arranca* como:> **RUN UNICO**. O bien usando la opción **Shift+F2**.

-El programa solicita:

- a.- ¿Número de barridos?=N. (Enter)
- b.- ¿Ganancia?=G. (Enter) (normalmente 1)
- c.- ¿Nombre de la muestra?=NOM. (Enter) (8 dígitos máximo)
- d.- ¿Tiempo de espera segundos?= T. (Enter)

-Tras esperar T segundos toma un *Background* de N Scans y lo almacena en el *buffer BAC*. A continuación espera 10 segundos y realiza una toma de espectro de *muestra* de N scans, dando el resultado en *Transmitancia* y almacenandolo transitoriamente en el *buffer SAM*. Posteriormente se transforma en espectro de *Absorbancia*, y se almacena en el *buffer SAM*. Finalmente, se *graba Automáticamente* con el nombre que hayamos introducido. Al acabar suena un pitido de 2 segundos.

\***NOTA:** la ganancia requerida es 1, ya que pretendemos que la señal eléctrica del detector sea la real y no amplificada (señal x1).

### (3).- Toma de Registros de DESNATURALIZACION TERMICA:TEMPER.

-Esta aplicación, pone en juego **DOS ORDENADORES:**

- a).- El que está ejecutando el programa PCIR: portador del **Macro TEMPER.**
- b).- El que controla el PROGRAMADOR DE TEMPERATURA: programa **TEMPERAT.BAS**

#### (3.1).- **Macro TEMPER:**

-El listado del macro **TEMPER** es:

```
XMAX=4100 XMIN=900 RES=2 AUTOSCALE=ON GAIN=1 SC=200 SH=OUT
MESSAGE Repeticiones del proceso= $ INPUT R
MESSAGE Nombre genérico del espectro= $ INPUT NOMBRE
MESSAGE Primera extensión= $ INPUT E
MESSAGE Tiempo de espera inicial= $ INPUT TI
AUTOFILENAME=NOMBRE SEED= E
WAIT TI Beep1
R(SH=IN WAIT 177 BACK SH=OUT WAIT 10 SAM ABS SAM
SAVE SAM @ WAIT 30 Beep2).
```

- La opción se inicia pidiendo en el programa PCIR:> **RUN TEMPER**. O bien con la opción **Shift+F10**
- El valor de N° de Scans es automatico e igual a **200**.
- El *MACRO* tiene definidos una serie de **Tiempos de Retardo (WAIT)**:

**WAIT 177, WAIT 10 , WAIT 30**: son valores de espera en segundos, que sirven para *ajustar* los ciclos de adquisición de cada espectro a un tiempo total determinado. Estos valores han sido **optimizados**, y deberemos introducir en función de ellos los parámetros del *Programador de T<sup>a</sup>* (situado en el ordenador auxiliar).

- Antes de arrancar el registro, el programa PCIR solicita una serie de datos:

a).-**¿N° de repeticiones del proceso?**: cuantos registros de T<sup>a</sup> se van a producir en el proceso. Nosotros utilizaremos **15**, incluyendo la T<sup>a</sup> basal.

b).-**¿Nombre genérico de la muestra?**: el programa está diseñado para utilizar un mismo nombre genérico para la serie de 15 registros (*Autofilename*). En cada paso añadirá a continuación un número aumentandolo de 1 en 1 en cada nuevo registro.

El nombre añadido, por exigencias del programa, solo puede tener 4 dígitos; el programa añadirá *ceros a la izquierda* del número que lleve el espectro.

Solo debe ponerse el nombre sin los números:

Nombre= **File. (sin extension)**.

En estas condiciones, si añadimos por ejemplo el nombre *COCO*, el primer fichero generado será: *coco0001.IRD*.

c).-**¿Primera extensión?**:

Normalmente será el **1 (SEED)**, de este modo el primer registro se grabará como: **FILE 0001.IRD**.

La numeración se incrementará en 1 a cada nuevo registro.

d).-**¿Tiempo de espera inicial en segundos?**: este tiempo de espera está pensado para que el usuario pueda prepararse para sincronizar el inicio del Macro TEMPER con el del PROGRAMADOR DE TEMPERATURA.

- El macro, graba en cada ciclo el espectro con el mismo nombre genérico (*AUTOFILENAME*), seguido del valor de la semilla (*SEED*) que se incrementa en una unidad en cada ciclo. La grabación se realiza en **C:\PCIR > DATA** con la extensión (**\*.IRD**).

**(3.2.)- PROGRAMADOR DE TEMPERATURA:**

-Es un programa en Basic, se accede a él en la Unidad C, dentro del subdirectorio **CONTROL**, y en el programa **QBASIC**. Su nombre es **TEMPERAT.BAS**. **Para arrancarlo, solo debemos encender el Ordenador Auxiliar:** El programa arranca automáticamente, gracias a que se ha introducido en el **AUTOEXEC.BAT**, el Programa **CONTROL.BAT**, que inicia la secuencia:

**CD \ CONTROL.**

**QBASIC/ RUN TEMPERAT.**

**NOTA:** este diseño del arranque existe en prevision de cortes de corriente durante la ejecucion del programa. Permitiendo leer al mismo la última temperatura mandada al baño (la cual se graba en el fichero **START.txt**), y de este modo hacer que se mande al baño a una temperatura proxima a 20°C evitando de este modo que La Celula de muestra permanezca a Altas temperaturas durante largo tiempo (Esto sería negativo para los cristales).

**ATENCION:** El programa de arranque **CONTROL.BAT** puede fallar, es preciso asegurarse de que el arranque ha sido correcto.

-Nada más arrancar el programa, debe aparecer en pantalla la siguiente informacion:

**CONECTAR SENSORES A PANTALLA Y ENCENDER EL CONTROLADOR.**

-Tras encender el controlador, pulsaremos cualquier tecla del Ordenador auxiliar, y deberá aparecer:

**PULSAR BOTON - MAX - DEL CONTROLADOR.**

-En el Controlador debe poner **110**, si no es así debemos volver a reiniciar el Ordenador auxiliar, si lo es, oprimiremos el **Botón MAX**, debiendo aparecer **max 110**.

-Una vez hecho esto, pulsaremos cualquier tecla y tras sonar un **Beep** debera aparecer en pantalla: **CONECTAR EL BAÑO Y PONER EL REGULADOR A T<sup>a</sup>>90°C.**

-Deberemos entonces conectar los dos interruptores del baño (situado bajo el espectrofotometro). Despues de esto pulsaremos cualquier tecla del ordenador auxiliar.

-El ordenador preguntará:

-**¿Número de escalones?(14)**= oprimiremos **enter**, pues deben ser 14 escalones (un escalón menos que temperaturas de registro existan).

-**¿Incremento T<sup>a</sup> por escalón?(5)**= oprimiremos **enter**, pues son 5 grados.

-**¿Tiempo de espera (min) por escalón?(13)**= oprimiremos **enter**, pues son 13 minutos.

-El programa queda en situación de **Espera:** Pulsar una tecla para empezar.

**(3.3).- Arranque sincronizado de ambos programas:**

-El PCIR, tras un tiempo de espera inicial (**TI**), emitirá un BEEP, este debe coincidir con el **INICIO del PROGRAMADOR DE TEMPERATURA**. Es decir, el Programador de T<sup>a</sup> está en situación de **Espera** (Pulse cualquier tecla), y lo arrancaremos cuando suene la señal del PCIR que indique el inicio del ciclo de denaturalización.

**(4).- Obtención automática de un espectro BACKGROUND de 25 Scans:****Macro BACK25:**

-Listado del macro **BACK25**:

**SH=IN SC=25 BAC BEEP2**

-El macro se arranca como: > **RUN BACK25**, o bien con la opción **Shift+F6**.

**(5).- Obtención de las intensidades maximas y mínimas de la banda Amida I (1700-1600), del espectro con D2O restado: Macro INTENS:**

-Listado del macro **INTENS**:

**XMAX=1700 XMIN=1600**

**AUTOSCALE=OFF**

**DISPLAY RES**

-El macro se inicia pidiendo: > **RUN INTENS**, o bien con la opción **Shift+F5**.

-Como puede verse en el listado, solo es capaz de mostrar espectros localizados en el Buffer **RES** y no en otros.



**-OPERACIONES DEL PROGRAMA PCIR:****Grabar series de desnaturalización térmica en forma de ficheros en ASCII (pares X/Y), truncados: "MACRO" TRUNCATE:**

-Listado del macro:

```

MESSAGE Nombre genérico de la serie = $ INPUT NOM1
MESSAGE Primer número de la serie = $ INPUT N1
AUTOFILENAME=NOM1 SEED=N1
LOAD SAM @ SAVE SAM PEPE1.XY 1300 1900
LOAD SAM @ SAVE SAM PEPE2.XY 1300 1900
  "      "      "      "      "      "
LOAD SAM @ SAVE SAM PEPE16.XY 1300 1900

```

-El macro se arranca escribiendo en la línea de mandatos: > **RUN TRUNCATE**. O bien con la opción **Shift+F4**.

-El programa solicita:

**1.- ¿Nombre genérico de la muestra?:** sería el nombre genérico (máx. 4 dígitos), de la serie de desnaturalización grabada en C:\PCIR\DATA en formato Binario-IRD, que pretendemos Truncar entre 1300 y 1900 y grabar en formato **ASCII** (pares X/Y). p.ej.: SDAA

**2.- ¿Primer número de la serie?:** sería la semilla. Si por ejemplo, el primer registro de la serie es SDAA0001.IRD, pondremos un **1**.

-El macro es capaz de importar uno a uno cada espectro de la serie y grabarlo truncado entre 1300 y 1900 con el nombre genérico PEPE en formato **ASCII** (pares X/Y), y numerándolos del 1 al 16 (la extensión de estos ficheros sería **.XY**).

**NOTA:** Estos ficheros no pueden utilizarse tal cual, dado que para poder ser leídos por los programas GPLOTG ó RAMOPN precisan estar en *Binario-DT*. Esta conversión se llevará a cabo con el programa **CX.BAT**, que incluye 2 programas **COMAS.EXE** cuya función será convertir los ficheros PEPE\*.XY en ficheros FILE\*. (Ficheros ASCII (X/Y) a los que se ha eliminado la coma de separación entre valores X e Y, y la extensión XY: que no son reconocidos por el convertidor **XFORMATN.EXE**) y el Convertidor **XFORMAT.EXE** que convertirá los ficheros FILE\*. en FILE\*.DT (Binario-DT), este programa será explicado en un apartado posterior: "Conversión de ficheros".

## Recuperar y superponer registros :LOAD y OVERLAY

-Recuperar registros: **LOAD** .

**LOAD REF FILENAME:** recupera el espectro D2O específico (filename), de DATA y lo almacena en el *buffer volátil REF*.

**LOAD SAM FILENAME:** recupera el espectro de muestra especificado en el filename y lo almacena en el *buffer volátil SAM*.

.En general: **LOAD (Buffer ) Filename:** recupera cualquier fichero con dicho nombre y lo almacena en el *buffer* especificado.

-Ver registros ya recuperados y localizados en *buffer*:**DISPLAY**.

**DIS SAM Filename; DIS REF Filename; etc.**

-Sobreimpresionar registros en pantalla: **OVERLAY**.

**DIS SAM OVERLAY REF:** sobreimpresiona muestra y Referencia.

-Esta orden puede ejecutarse de modo automático por medio de las teclas de control:  
**Ctrl F1**.

-Si deseamos sobreimpresionar muestra, referencia, y resultado, utilizaremos la sobreimpresión automática por medio de: **Ctrl F2**.

-Si deseamos sobreimpresionar los espectros contenidos en los Buffers **Hit1 a Hit7**, tenemos la opción de utilizar las teclas de control:

**Ctrl+F3:** Display Hit1 + Hit2; **Ctrl+F4:** Display Hit1+Hit2+Hit3; **Ctrl+F5:** Display desde Hit1 a Hit4; Así sucesivamente hasta **Ctrl+F6:** Display desde Hit1 a Hit7.

### **Resta interactiva de dos espectros: ISUB:**

-La resta consiste en sustraer a un determinado espectro de muestra *SAM* el espectro del *D2O* multiplicado por un factor de resta *F* tal que el espectro restado presente una línea de base plana entre 1800.5 y 1550 cm<sup>-1</sup>. El valor de **F** es función de:

-La concentración de la muestra.

-El paso óptico (separación entre las ventanas que contienen la muestra).

-El cálculo del valor de **F** puede realizarse mediante sustracción interactiva en donde podemos variar el valor de **F** hasta obtener el resultado que nos dé una línea de base plana entre **1800.5 y 1550 cm<sup>-1</sup>**.

### **-Procedimiento de resta Interactiva:**

-Resulta conveniente sobrepresionar previamente **SAM** y **REF** para observar si son espectros que se puedan restar sin problemas.

-En caso positivo, la orden de sustracción interactiva es: > **ISUB**

-El resultado RES se obtiene buscando el factor de sustracción que deje la zona **plana** entre **1800.5 y 1550**, del siguiente modo:

1/.-Inicialmente aparecerán en pantalla los registros de muestra y referencia (parte superior), y el registro restado para un valor de **F** estimado por el propio programa (parte inferior).

El espectro restado cubre todo el rango de n° de onda (900 a 4100). Por este motivo, resulta necesario ampliar la zona entre 1550 y 1800.5 a fin de verla mejor. Para ello, procederemos así: - **Oprimir Alt+Z** y con el *Ratón*, marcar los límites del *Zoom*(1800.5-1550): situandose cerca de 1900 y oprimiendo la tecla izquierda fijamos un limite, moviendo el raton hacia la derecha hasta situarlo cerca de 1500 y oprimiendo de nuevo fijamos el otro límite una vez hecho esto situaremos el raton dentro del cuadrado y oprimiremos la tecla izquierda del mismo, esto acota un poco el espectro. Procederemos de igual modo hasta acotar entre **1800.5 y 1550**. Si fallamos en el acotamiento (más pequeño de el rango que pretendemos), podemos volver a ampliar el eje X con la tecla **Alt-X** y volver a intentarlo de nuevo. Una vez hecho esto continuaremos.

2/.-Comenzar a **variar el valor de F** usando las teclas de función:

**F1:** Aumentar el valor de F. **F2:** Disminuirlo.

-El valor de **F** adecuado será el que cumpla las condiciones citadas al principio .

-Se apunta el valor de **F** y se termina oprimiendo **F10**.

-El resultado, queda almacenado automáticamente en el *buffer RES*.

-Para grabarlo, procederemos así:

**SAVE RES (FileN°):** el resultado queda grabado con el nombre y el número que pongamos.

**Resta No interactiva de una serie de espectros: Macro RESTA.**

-El listado del macro **RESTA** es el siguiente:

```

XMAX=1900 XMIN=1300 RES=2 GAIN=1 AUTOSCALE=ON
MESSAGE Nombre de la muestra= $ INPUT NOM1
MESSAGE Nombre de la referencia= $ INPUT REF1
MESSAGE Nombre del resultado= $ INPUT NOM2
MESSAGE Factor de corrección = $ INPUT F
FRACTION=F
AUTOFILENAME=NOM1 SEED=1 LOAD SAM @
AUTOFILENAME=REF1 SEED=1 LOAD REF @
SUBTRACT DISPLAY RES PAUSE
AUTOFILENAME=NOM2 SEED=1 SAVE RES @

AUTOFILENAME=NOM1 SEED=2 LOAD SAM @
AUTOFILENAME=REF1 SEED=2 LOAD REF @
SUBTRACT DISPLAY RES PAUSE
AUTOFILENAME=NOM2 SEED=2 SAVE RES @.
" " "

AUTOFILENAME=NOM1 SEED=17 LOAD SAM @
AUTOFILENAME=REF1 SEED=17 LOAD REF @.
SUBTRACT DISPLAY RES PAUSE
AUTOFILENAME=NOM2 SEED=17 SAVE RES @.

```

-**NOTA:** La grabación de los *espectros restados* se hace en C:\PCIR>DATA, con el nombre genérico que deseemos.

-Para arrancar el macro se pide:> **RUN RESTA**, O bien usando la opción **Shift+F3**.

-El ordenador solicita:

- ¿**Nombre genérico de la muestra?**(sin numeración): File (para un autofilename), la numeración se añade automáticamente a partir de 1.
- ¿**Nombre genérico de la referencia?**(sin numeración): al igual que el anterior la numeración se añade automáticamente a partir de 1. (Espectros D2O de referencia).
- ¿**Nombre genérico para el resultado?** (sin numeración): igual que los anteriores .(espectros a los que se les ha restado el del D2O de referencia).
- ¿**Factor de resta?**: **F** . Obtenido a partir de la *sustracción interactiva* del primer espectro (a Tª base). El valor de **F** será el mismo para toda la serie de desnaturalización dado que la concentración y el paso óptico será el mismo.

-A partir del nº1, el macro lee la muestra localizada en el *buffer SAM*, a continuación lee la referencia en el *buffer REF* y, acto seguido procede a restarlos con el factor de sustracción **F**: (SAM - REF\*F). Finalmente, graba de forma automática el resultado, que se halla en el *buffer RES*, con el nombre genérico introducido al principio y con el mismo número que el espectro de muestra. Este proceso se repite un total de 17 veces (una para cada espectro).

**-NOTA:** será conveniente hacer copias de seguridad de los espectros originales en otros subdirectorios o discos. Procediendo a continuación a una "*Limpieza de subdirectorios*" para dejar libre DATA. Si conocemos el valor del factor **F** y la referencia utilizada (p.ej. D2OD0001.IRD), siempre podremos volver a generar los espectros restados.

### **Comparar registros localizados en el subdirectorio C:\PCIR>DATA: COPY y OVERLAY**

-Para trabajar con ellos se pueden introducir en los buffers volatiles que hemos citado en el apartado del mismo nombre al principio de esta memoria:

#### **HIT1 a HIT7.**

-El proceso sería:

1.-Hacer un **LOAD** de la muestra almacenandola en el *buffer SAM*.

2.-Copiar la muestra del **SAM** a un *buffer HIT(n)*:

**COPY S TO HIT(n) (n= 1,2,3,4,etc).**

3.-Repetir los pasos 1 y 2 para cada nueva muestra que queramos comparar. El maximo de registros que se pueden comparar son **7** (tantos como **HIT(n)**).

**-NOTA:** la carga de los espectros con la orden **LOAD**, puede realizarse mediante un **Autofilename** tal y como indicamos en el apartado de "Manejo del PCIR".

Como ya citamos en apartados anteriores, existe la posibilidad de superponer registros en pantalla. Esto puede realizarse de modo manual o usando las teclas de función:

a).Para superponer los registros localizados en los buffers SAM y REF podemos usar **Ctrl F1** o bien la secuencia: **DIS SAM OVER REF**.

b).Para superponer los registros de los buffers SAM, REF y RES, podemos usar **Ctrl F2** o bien la secuencia: **DIS SAM OVER REF OVER RES**.

c).Para superponer multiples registros (hasta un máximo de 7), que se localicen en los buffers HIT1 a HIT7, debemos poner la secuencia:

**DIS HIT1 OV HIT2 OV HIT3 OV HIT4** etc. O bien usar las opciones de **Ctrl+Función**, Descritas anteriormente en el apartado LOAD y OVERLAY

## OTRAS FUNCIONES:

-**Alt+F1**: Resetear eje X. -**Alt+F2**: Resetear eje Y.

-El resto de funciones **Alt** vienen indicadas en la plantilla del teclado.

-**MACROS AUTOFILE y AUTOLOAD**: el **AUTOFILE** es un macro que puede arrancarse como **RUN AUTOFILE** o simplemente **Shift+F7**: Sirve para definir un **AUTOFILENAME** y la Semilla **SEED**. Una vez definido, se pueden importar secuencialmente series de Desnaturalización térmica que respondan a ese nombre usando **RUN AUTOLOAD** o simplemente **Shift+F8**. Cada vez que oprimamos este último macro, se importará el siguiente espectro de la serie.

-**MACRO RESTRUN**: se arranca como **RUN RESTRUN** o simplemente **Shift+F9**. Permite poner en funcionamiento a la vez a los macros **RESTA** y **TRUNCATE**, de modo que puede restar una serie de desnaturalización térmica y grabarla como ficheros **PEPE\*.XY** 1300 1900, con el consiguiente ahorro de tiempo.

-Programa **CX.BAT**: para acceder a él hay que salir del programa **PCIR**, pero basta con hacer una salida parcial escribiendo **> DOS** en la línea de comandos y oprimiendo (Enter).

Una vez estemos en **DOS**, escribiremos: **CX** y oprimiremos (**enter**).

Arranca el programa **COMAS.EXE**: que convertirá los ficheros **PEPE\*.XY** en ficheros **FILE\***.

Una vez realizado, arrancará **XFORMAT.EXE** que convertirá los **FILE\***. (**ASCII (X/Y)**) en ficheros **FILE\*.DT** (**BINARIO-DT**). Al terminar, podremos volver al programa **PCIR** escribiendo **PCIR** y oprimiendo (**enter**).

## GLOSARIO DE ORDENES MENOS UTILIZADAS:

### Operaciones especiales con ficheros:

- **REMOVE SAMPLE**: esta orden, cuando se escribe en la línea de mandatos (>...) borra todos los datos de los *buffers volátiles*.
- **ANNOTATE SAMPLE**: sirve para poner alguna *anotación* dentro de un *buffer*.
- **EXAMINE PEAKTABLE REFERENCE**: permite examinar cálculos previos.
- **REROUTE PRINTER TO PEAK.TXT**: reorientar la impresión de printers a diskfile.
- **REROUTE OFF**: anular la reorientación.
- **DIRECTORY \*.IRD**: escrita en la línea de mandatos (>...), nos daría un listado de los ficheros en formato *Binario-IRD* localizados en C:\PCIR>DATA.
- **PATH=A: DIRECTORY \*.IRD** nos daría un listado de los ficheros en formato *Binario-IRD* localizados en la unidad A: (Floppy).
- **LOOKAT REFERENCE (enter)**: nos da la información contenida en un fichero localizado en REF.

## **Operaciones especiales de manipulación de datos:**

### **A).-Establecimiento de una línea de base:**

-Podemos crear una línea de base de orden "n" de modo interactivo:

**-BASELINE SAMPLE 1700 1600 (enter):** al escribir esta orden en la línea de mandatos (>...), el programa establece una línea de base para el espectro localizado en el buffer SAM (acotada entre 1600 y 1700), para un orden de base aleatorio.

-Para cambiar el orden de base, oprimiremos **F2**: el valor del orden de base varía cada vez que le damos a F2 (el valor aparece en la parte superior derecha de la pantalla).

-A continuación, usando el ratón seleccionaremos el extremo izquierdo de la línea de base (situándose sobre él y haciendo un Click con el cursor), acto seguido, desplazaremos el cursor hacia el extremo derecho del espectro y seleccionaremos (del mismo modo) el extremo derecho de la línea de base.

-Al concluir oprimiremos **F3** para calcular la línea de base: en pantalla aparecerá el espectro y la línea de base.

-Si es satisfactorio oprimiremos **enter**, si no oprimiremos **ESC**.

-El espectro corregido con línea de base se localiza en el buffer **RES**.

### **B).-Derivada del espectro:**

-Se utilizapoco, ya que el programa RAMOPN (que se explicará más adelante), lo realiza más correctamente. La secuencia de órdenes sería:

**-DERivative=3 (enter):** indica el orden de la derivada, en este caso **3**.

**-TAKE DERIV SAMPLE 1700 1600 (enter):** realiza la derivada tercera de la muestra localizada en el buffer SAM, acotándola entre 1700 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  y la almacena en el buffer RES.

### **C).-Deconvolución:**

- La secuencia de órdenes sería:

**-FSDWIDTH=16 (enter):** indica la anchura de pico, para el AcChR sería **16**.

**-FSDFACTOR=2 (enter):** la constante de deconvolución, para el AcChR sería **2**.

**-FSDAPOD=HAPP-GENZEL (enter):** apodización de Happ-Genzel.

**-FSD SAMPLE 1700 1600 (enter):** realiza la deconvolución de la muestra localizada en SAM, acotándola entre 1700 y 1600 y almacenándola en RES.

### **D).-Peak Picking:**

-Permite localizar los picos más significativos del espectro, escribiendo en la línea de mandatos (>...):

**-# PEAKS=8 (enter):** debe buscar los 8 picos más significativos del espectro.

**-SENSITIVITY=NORMAL (enter):** indica una sensibilidad de búsqueda normal.

**-PEAKPICK SAMPLE (enter):** localiza los picos más significativos del espectro hasta un máximo indicado por #PEAKS y los muestra en una tabla.

-A continuación, el programa da la opción de imprimir esta tabla.

## CONVERSION DE DATOS GENERADOS POR PCIR EN DATOS PROCESABLES POR OTROS PROGRAMAS

- Los datos obtenidos en el programa *PCIR* pueden ser de dos tipos:

- Datos en formato *Binario-IRD*: dichos espectros pueden ser **Originales** (que no han sido sometidos a un proceso de *Resta* en el *PCIR* ); o **Restados** (a los que se les ha restado el espectro de D<sub>2</sub>O multiplicado por un factor de sustracción **F** en el programa *PCIR*). Los restados son espectros completos, que precisaran una **serie compleja de conversores** para poder ser usados en el *RAMOPN*, *GPLOT*, *LAB-CALC* o en el *GRAMS*

- Datos en ASCII: son ficheros en formato de pares X/Y que pueden estar truncados o no, y que precisaran un procesamiento antes de poder convertirlos al formato para *RAMOPN* o *GPLOT* usando un **único conversor** (pueden igualmente ser **Originales** (muy poco habitual); o **Restados** (lo más habitual)).

- Los ficheros restados en formato *Binario-IRD* deberán ser **convertidos** para poder ser utilizados en otros programas. Según su destino, la conversión que precisará será la que sigue:

a).-Datos destinados a tratamiento por *LAB-CAL* o *GRAMS*: estos programas precisan que los datos tengan formato *Binario-SPC*. Esto puede realizarse mediante el programa *CONVERTER* (Filtro conversor ***PLPSIR40*** ).

b).-Datos destinados a tratamiento por *RAMOPN* o *GPLOT*: los datos deben tener formato *Binario-DT*. Para ello tendremos dos posibilidades:

1/ Utilizar como intermediario el programa *CONVERTER* para transformar los datos en formato *Binario-IRD* a formato *Binario-SPC* ( Filtro ***PLPSIR40*** ), y a continuación utilizar el mismo programa para pasarlos de formato *Binario-SPC* a *J-CAMP-DX* ( Filtro conversor ***J-CAMP-DX*** ). Posteriormente utilizaremos el convertidor *XFORMATN* para transformarlos de formato *J-CAMP-DX* a *Binario-DT*.

2/ Transformar directamente el formato *Binario-IRD* a *J-CAMP-JDX* por medio del convertidor *BIN2J*, y posteriormente utilizar el convertidor *XFORMATN* para transformarlos de formato *J-CAMP-JDX* a formato *Binario-DT*.

- Los ficheros en formato ASCII, tras un procesamiento previo (ya indicado en el apartado de "operaciones del *PCIR*"), podrá convertirse a formato *Binario-DT*, utilizando el convertidor *XFORMATN*.



## **PROGRAMA CONVERTER:**

### **1.-FILTRO CONVERTOR PLPSIR40:**

-El proceso para *convertir* los datos PCIR.**IRD**, sería el siguiente:

1.-Si nos hallamos en el programa PCIR, debemos abandonarlo y salir a sistema operativo, de modo que en pantalla aparezca: **C:\>PCIR>**

2.-A continuación debemos entrar en WINDOWS, para lo cual teclearemos WIN/3 (Enter). De este modo entramos en Windows.(#)

3.-Seleccionar el *icono denominado CONVERTER* y hacer el *doble click* (de este modo entramos en el programa Converter).

4.-Seleccionar el *Filtro conversor PLPSIR40*.

5.-Debemos seleccionar el subdirectorio donde tengamos los ficheros a convertir. Acto seguido, modificaremos la indicación **\*.IRS** en el recuadro superior de la ventana de windows, pondremos en su lugar **\*.IRD** y pulsaremos **OK**. A continuación seleccionaremos los ficheros con extensión **.IRD** que queramos convertir pulsando el botón izquierdo del ratón.

6.-Oprimir **IMPORT** y **OK**. El resultado es que se originan ficheros con el mismo nombre pero con formato Binario-SPC y extensión **.SPC**.

-De este modo, los ficheros se encuentran preparados para utilizarse en los programas LAB-CALC o GRAMS.

(#) **NOTA:** Para mayor seguridad, es conveniente desplazar los ficheros a convertir a un subdirectorio en el que trabajar sin interferir con los ficheros de DATA. Esto puede realizarse mediante el **PCSHELL**, al cual puede accederse desde el administrador de programas de Windows:(seleccionar el *icono* con el ratón y hacer un *doble click* en boton izquierdo del ratón).

## **2.-FILTRO CONVERSION J-CAMP-DX:**

-Si queremos procesar los datos en los programas RAMOPN o GPLOTG debemos utilizar el programa *CONVERTER* para transformar los datos de extensión **.SPC** a formato *J-CAMP-DX*. Posteriormente, debemos transformar los datos de formato *J-CAMP-DX* a *Binario-DT* usando el convertidor *XFORMATN*.

-Los ficheros **\*.SPC** , se transformarían del siguiente modo:

- 1.-Seleccionar en Windows el *icono* denominado **CONVERTER**.
- 2.-Seleccionar el *Filtro conversor J-CAMP-DX* .
- 3.-Seleccionar subdirectorio donde se hallen los ficheros a convertir.
- 4.-Seleccionar los ficheros a convertir.
- 5.-Oprimir **EXPORT** y **OK**. Los ficheros presentan ahora extensión **.DX**.

-Estos ficheros **\*.DX**, no son aún utilizables por el RAMOPN o GPLOTG y precisarán una nueva conversión fuera del programa *CONVERTER*.

## **CONVERTIDOR XFORMATN:**

-El programa *XFORMATN.EXE* opera desde DOS, y debe localizarse en el mismo subdirectorio personal en el que se encuentren los ficheros *J-CAMP-DX* a transformar.

-El *XFORMATN* no trabaja adecuadamente cuando los ficheros presentan alguna extensión (la que sea). Del mismo modo, tampoco trabaja adecuadamente si la numeración de los ficheros presenta *ceros a la izquierda* (p.ej. File0001.DX). Por estos motivos, debemos eliminar la extensión y recomponer la numeración del siguiente modo en MS-DOS):

### **A).-Si partimos de espectros *Truncados en formato ASCII* (del PCIR):**

-Estos ficheros no presentan una *numeración con ceros a la izquierda* (p.ej.: **File1.XY**), por ello, tan solo será necesario eliminar la extensión XY:

-Debemos hallarnos en el subdirectorio adecuado:p.ej. *USUARIO*

-Debemos teclear la orden **REN** seguida de el nombre del fichero sin su número (con **.\***) y extensión **XY**, y seguida del mismo nombre sin su número (con **.\***) sin extensión. En pantalla aparecería:

**C:\USUARIO\REN File\*.XY File\*.**

-Haremos un **dir** para ver si se ha realizado correctamente:

**C:\USUARIO\DIR \*.**

**B).-Espectros no truncados procedentes del Filtro J-CAMP-DX:**

-Estos ficheros si presentan numeración con ceros a la izquierda (p.ej.: **File0001.DX**). Para eliminar la numeración debemos **renombrar** uno a uno cada espectro ( usando la orden **REN** ): p.ej.: **REN File0001.DX File1**. De este modo eliminamos en cada fichero los ceros y la extensión.

-Ahora es cuando arrancamos el **XFORMATN**:

**C:\USUARIO\XFORMATN (enter)**

-El programa solicita:

- a.-¿**Nombre Fichero de Input?**: si es una serie de desnaturalización pondremos el nombre del fichero con el nº 1: p.ej. **File1**
- b.-¿**Nombre Fichero de Output?**: igual que el de input.
- c.-¿**Formato de Input?**: es J-CAMP-DX =**7** si procede del J-CAMP-DX  
es ASCII=**2** si procede del PCIR.
- d.-¿**Formato de Output?**: es Binario-DT =**0**
- e.-¿**Nº de Ficheros?**: N

-Ya tenemos los ficheros transformados a **\*.DT** y utilizables para RAMOP y GPLOTG.

**CONVERTIDOR BIN2J:**

-Transforma ficheros en formato Binario-IRD en ficheros con formato JCAMP-JDX.

-Si partimos de ficheros **\*.IRD**, debemos introducirlos en un subdirectorio que tenga el programa BIN2J.EXE.

-El programa se utiliza tecleando BIN2J seguido de un espacio y a continuación el nombre del fichero con su extensión **IRD**. Si queremos transformar todos los ficheros **IRD** de dicho subdirectorio pondremos tras el espacio **\*.IRD**. En pantalla aparecería:

**C:\USUARIO\BIN2j \*.IRD**

-Finalmente, procederemos con estos ficheros a través del conversor XFORMATN tal y como se indicó en el apartado anterior.

## GPLOT: PROGRAMA DE CANADA

### I.- Pasos previos a la impresión con Plotter:

-El "*Plotter*" se halla conectado al **COM 1**, la configuración del plotter debe ser: Velocidad= 9600 Baudios; Paridad= n; Paquetes infor.: 8 Bytes y 1 byte de parada.

-Antes de entrar en GPLOT, debemos configurar la **COM 1** introduciendo: **MODE COM1: 9600,n,8,1,p (enter)**.

-A continuación arrancamos el programa en MS-DOS tecleando **GPLOT** .

### II.- Programa GPLOT:

**Fil**: nombre del fichero a dibujar con su Path.

**Ttl**: texto que queremos incluir junto con el dibujo del espectro.

**Xlb**: Eje X con su leyenda: (NULL) significa que el plotter no dibujara eje.

**Ylb**: Eje Y con su leyenda: (NULL) significa que el plotter no dibujará eje.

**Xor**: **Yor**: Coordenadas en la pantalla para el origen de ordenadas: los valores mas adecuados son **Xor=1.5** y **Yor=1.5**

**Dat**: Indica si los datos del espectro estan en **ASCII ó en BINARIO**. En nuestro caso el valor oportuno es **Dat=1** (binario). **Dat=0** es para ASCII.

**Xnc**: **Ync**: permite cambiar las coordenadas del origen de ordenadas para cada nuevo plot. Lo normal es que esta posibilidad no sea necesaria y permanezca inactiva : **Xnc=0** y **Ync=0**

**Spd**: Velocidad de dibujo del Plotter (de 5-35). Normalmente cuanto menor sea, mayor será la calidad del trazado: Aconsejable **Spd=5**

**Tms** = **1** : imprime el nombre del fichero, fecha y hora.

**0** : no los imprime.

**Xta**: **Yta**: division en los ejes.

**Fnt**: fuente de caracteres para el plot: **Fnt=1 (simple)** la más aconsejable.

**Plf**: solo valido para datos en ASCII (Dat=0).

**Bas**: Ajustar espectro a linea de base : **Bas=1** ; No hacerlo **Bas=0**

-En Espectro *Deconvuelto* y *Original*: **Bas=1**

-En Espectro *Derivado*: **Bas=0**

**Fnc**: valor **1**

**Itf** : Interpolar espectros: **Itf=0 (inactivo)**.

**Xsp; Xep; Ysp; Yep:** Establece límites de X e Y :

**Xsp=0; Xep=0:** todo el espectro

**Xsp=1600 ; Xep=1700:** Amida I

**Ysp=0 ; Yep= 0 :** Autoescalado de las Y.

**Lht:** tamaño de caracteres: aconsejable **Lht=0.15**

**Xsl; Ysl:** longitudes de los ejes X e Y en la pantalla: **Xsl=7 ; Ysl=5.5**

**Xxp; Yxp:** (0,0)

**Tkf ; Cur :** su valor suele ser **0**.

**Pen:** color para dibujar en pantalla o plotter y número de rotulador en el plotter: Para sacar en *Plotter* se usa **Pen=1**.

**1:** BLANCO. **2:** VERDE. **3:** AZUL. **4:** ROJO. **5:** VIOLETA. **6:** NARANJA.

**Lin=0**

**Lab:** activa la aparición o dibujo de ejes : **Lab=1** .

**Frm:** activa aparición de un recuadro en la grafica: **Frm=1**. Inactiva **Frm=0**

**Log:** graba pantalla en disco **Log=1**. No graba **Log=0**.

**Rot:** Rotación de la grafica 90°: Activa: **1**. Inactiva : **0**.

**Ntd:** N° de espectros sucesivos a dibujar.

**Con=0**

**Ang:** Dirección del texto impreso por el plotter: **0: horizontal. 1: vertical**

### **III.-Ejecución del programa:**

Para visionar en pantalla el espectro a dibujar: **F1**.

Para borrar el espectro dibujado en pantalla: **F7**.

Para hacer un Peak Picking:

-De baja sensibilidad: **F8**

-De alta sensibilidad : **Alt + F8**

Para imprimir en el Plotter: **F6**

### **RAMOPN: PROGRAMA DE CANADA**

-Para acceder a este programa en MS-DOS, debemos teclear **RAMOPN** (preferiblemente desde el subdirectorio personal).

-Este programa trabaja sólo con ficheros en formato *Binario-DT*.

**Pth:** Directorio donde se encuentran los DATOS: **C:\CC\**

**In 1**: INPUT 1: nombre del fichero del espectro o del primero de una serie de ficheros de espectros a procesar.

**In 2**: INPUT 2: necesario únicamente para aquellas funciones del programa en las que sea necesario operar con dos espectros. Aquí podría ir el nombre del primero de una serie de espectros de Referencia.

**Ou 1**: OUTPUT: nombre del espectro o del primero de una serie de espectros Procesados.

**NOTA:** por *convenio*, a los espectros modificados por medio de las funciones de este programa los denominaremos así:

-*Espectros Deconvuelto*s: usaremos el mismo nombre del espectro original y le añadiremos una **C**.(p.ej. el original SDAA1 podría denominarse SDAAC1 una vez deconvuelto).

-*Espectros Derivados*: usaremos el mismo nombre del espectro original y le añadiremos una **R**.(respetando el ejemplo anterior, sería SDAAR1).

-*Espectros de Diferencia*: serán aquellos espectros que se sometan a *resta interactiva* con el espectro del D2O de referencia. Para nombrarlos, usaremos el mismo nombre y le añadiremos una **F**.(p.ej. según el mismo ejemplo visto sería SDAAF1).

### **RESTA INTERACTIVA:**

-Esta función es aconsejable hacerla mediante el programa PCIR, si bien, es posible que en alguna ocasión sea necesario utilizar este programa:

**In 1**: primer espectro de la serie que vamos a restar.

**In 2**: primer espectro de la serie de D2O de referencia.

**Ou 1**: nombre del primero de la serie de espectros resultantes de diferencia.

**Fnc** (función): esta es la función **18** :Resta interactiva de **In 1 + Scb \* In 2**.

**Scb**: es el valor de **F** o factor de sustracción. Su valor suele ser inferior a **1** y la forma de establecerlo será mediante el mismo criterio que vimos para el *PCIR*: obtener en el espectro de diferencia, una línea plana entre **1800-2000 cm<sup>-1</sup>**. La forma de modificar F será manipulando el *cursor* hasta observar en el espectro resultante la línea plana antes indicada.

**Stp** y **Enp**: nº de onda inicial y final primarios: Acotan espectro que vamos a restar. Los valores (0,0) significan que se toma el espectro completo .

**Ntd**: Nº de ficheros de la serie indicada en **In 1** que vamos a restar. Se usa para las series de desnaturalización.

**Sca**: irrelevante .

**Con:** irrelevante.

**Lvl:** irrelevante.

**DI 1:** Incremento de la numeración de los ficheros contenidos en **In1**, siempre debe ser **1**.

**Npk:** irrelevante.

**Ads: 1 :** permite visualizar los espectros modificados de forma automática. También **F4**.

**0 :** no los muestra gráficamente.

**St 2** y **En 2:** nº onda inicial y final secundarios: sirve para acotar y visualizar gráficamente la región de interés, independientemente de que se haya restado el espectro en todo el rango. Se aconsejan los valores (1950-1550).

**Ymn** e **Ymx:** valores de escala de **Absorbancia**. El valor (0,0) es **Autoescalado**.

**Ftf:** con valor **0**.

**Bs 1** y **Bs 2:** activa y desactiva las líneas de base. Su valor es **0** para ambas en esta función.

**-Para ejecutar la resta interactiva:**

Una vez fijados los parámetros, oprimiremos **F1(go)**. En pantalla aparecerá el espectro de diferencia para un valor **Scb** (factor de sustracción **F**) arbitrario. Nosotros, utilizando los cursores modificaremos dicho factor **F** hasta cumplir el criterio indicado en el apartado referente al parámetro **Scb**. Al terminar pulsaremos **Esc**.

**-Para ver las graficas resultantes:** debemos pasar a la función **Fnc: -1** poniendo en **In 1** el nombre del espectro resultante de diferencia.

### **DECONVOLUCION:**

-Una vez cargado el programa RAMOPN:

-En **In 1** debemos poner el nombre del primer espectro de una serie que previamente halla sido restada.

-En **Ou 1** pondremos el nombre del primer espectro de la nueva serie, resultado de la deconvolución.

**Fnc:** función nº **31** para deconvolución.

**Scs:** es el valor de *Anchura de banda (hw)*. Su valor suele ser **16** para el caso del **AcChR**.

**Scb:** es el valor de la constante (**K**). Su valor suele ser **2.25** para el **AcChR**.

**Con:** es el porcentaje de *Lorentziana vs Gaussiana*. En esta función usaremos un 100% de Lorentziana, por tanto, el valor será **1**. (0 indicaría 100% Gaussiana).

**Stp** y **Enp:** Acotan el espectro que se va a someter a deconvolución. En esta función, es conveniente acotar entre **1300-1900** respectivamente.

**Ntd:** número de ficheros de la serie indicada en **In 1**.

**Lvl:** valor **0**.

**DI 1:** Su valor será **1**.

**Npk:** valor **1**.

**Ads:** en este caso, si deseamos ver los parametros de deconvolución y no los gráficos conforme van saliendo usaremos el valor **0**. Si queremos ver los gráficos usaremos el valor **1**.

**St 2** y **En 2:** acotamiento visual en pantalla (no afecta a la deconvolución), en este caso se aconsejan los valores (0,0).

**Ymn** e **Ymx:** escalado del eje Y. Se aconseja (0,0) Autoescalado.

**Ftf:** valor **0** .

**Bs 1** y **Bs 2:** valor **(0,0)**, no precisa líneas de base.

**Ils:** su valor es **6** en esta función.

**-Para ejecutar la Deconvolución:**

Pulsaremos **F1** (go ) cuando tengamos todos los parámetros, y se realizará la deconvolución.

**-Para visualizar los espectros *Deconvueltos***, usaremos **Fnc= -1** y pondremos en **In 1** el nombre del espectro deconvuelto.

**DERIVADA:**

-En **In 1** pondremos el nombre del espectro a procesar.

-En **Ou 1** pondremos el nombre del espectro o del primero de la nueva serie de espectros que hayan sido Derivados.

**Fnc:** nº **32** para la derivada.

**Sca:** sería la *potencia de la derivada* (**pw**). Su valor es normalmente **3**

**Scb:** sería el *punto de corte* (**brk**). Su valor es normalmente **0.3** (aproximadamente el 30% del interferograma).

**Con:** irrelevante .

**Stp** y **Enp:** mismo rango que en la deconvolución.

**Ntd:** nº de ficheros a derivar.

**Lvl:** valor **0**.

**DI 1:** valor **1**.

**Npk:** valor **1**.

**Ads:** valor **1**.

**St 2** y **En 2:** Valor **(0,0)**.

**Ymn** e **Ymx:** se aconseja Autoescalado **(0,0)**.

**Ftf:** valor **0** .

**Bs1** y **Bs2:** igual consideración que para deconvolución: **(0,0)**.

**Ils:** valor **6**.

**-Para ejecutar la derivada:** pulsar **F1**(go)



-**Para visionar:** usar **Fnc= -1**, y poner en **In 1:** nombre del espectro derivado.

### CALCULAR ANCHURA DE PICO:

**Fnc:** el número de la función es el **19**. Antes de usarla deben incorporarse las temperaturas a los espectros.

### **INCORPORACION DE TEMPERATURAS A LOS ESPECTROS**

-Acceder al **PCTools** y generar un *Fichero* ASCII que se denomine con el mismo nombre genérico de la serie de *Desnaturalización* a la que pretendemos incorporar las **Temperaturas**, pero con extensión **.TEM**.

En dicho fichero introducimos una tabla de temperaturas (las de los escalones de desnaturalización) que presente **2 columnas:**

-**Primera columna:** numeros de la serie del **1 al 16**.

-**Segunda columna:** las 16 temperaturas correspondientes.

p.ej.:

**1 20.1**

**2 25.3**

**3 30.2**

**" "**

**16 80.6**

-Grabar dicho fichero.

-Salir a MS-DOS, y entrar en el directorio FTIR si no estamos en él: **C:\>FTIR>**.

-Solicitar el programa TMPGEN.EXE, y oprimir **Enter.:**

-Este programa es capaz de incorporar cada una de las *Temperaturas* localizadas en el fichero **\*.TEM** a su correspondiente espectro (ficheros **\*.DT**).

-El programa solicita:

**a).-¿Primer fichero de la serie?:** debe teclearse el Path y el nombre del primer fichero. P. ej.:

**C:\CC\SDAA1** si la serie de ficheros SDAA\*.DT se halla en el subdirectorio CC.

- b).**-¿Que tipo de fichero de origen (de input) tenemos?: dado que son ficheros tipo (x/y), pondremos un **1**. Si no tenemos el fichero \*.TEM, podemos introducir las temperaturas manualmente a través de la consola
- c).**-¿Nº ficheros de input?: los de una serie son **16**.
- d).**-¿Nombre del fichero de Temperaturas?: debe indicarse el Path y el nombre: p.ej. C:\CC\\*.TEM.

-Los ficheros conservan el mismo nombre y la extensión **.DT**, solo que ahora tienen incorporadas las temperaturas a las que fueron tomados.

-Cambiar al directorio donde estén los ficheros y penetrar en el RAMOPN:

El programa se arrancaría escribiendo RAMOPN (preferiblemente desde el subdirectorio en el que tengamos los ficheros).

-Apuntar los parametros:

**Pth:** C:\cc\ (por ejemplo)

**Fnc:** **19** : para estimar la anchura de banda .

**In 1:** nombre del primer espectro con la T<sup>a</sup> incorporada. (p.ej.: **SDAA1**).

**Ou 1:** nombre del primer espectro de salida, con T<sup>a</sup> y Anchura incorporada pero con extensión **.HW** o **.PRN**. (P.ej.:**SDAA1.HW** o **SDAA1.PRN**).

**Con:** **0.5** mide anchura a media altura.

**Ntd:** **16** espectros.

**Stp:** **1600** y **Enp:** **1700** establece acotamiento de la Amida I.

**Bs1=1** : establece la línea de base para **In 1**. Esto es muy importante.

-El programa se ejecutaría oprimiendo **F1**. Los ficheros de salida son tipo (x/y), donde **X=T<sup>a</sup>** e **Y=Anchura de banda**.

-La extensión **.PRN** permite importarlos al programa GPAD. Si tuviera otra extensión debemos modificarla usando PcShell o bien operando en MS-DOS con la orden **REN** (renombrar).

-El programa GPAD puede utilizar los ficheros para representar gráficamente una curva de T<sup>a</sup> vs Anchura de banda al 50% de la altura. Esta grafica resulta ajustarse a una *Sigmoide* cuyo *Punto de Inflexión* nos indicaría (aproximadamente) la T<sup>a</sup> media de *Desnaturalización*.

### **OBTENER ESPECTROS CON LINEA DE BASE RESTADA Y LLEVADA A CERO**

-Pondremos en **In1** el nombre del espectro al que queremos restar la línea de base y llevarla a cero.

-En **Ou1** ponemos el nombre que queremos que lleve el espectro con línea de base en cero.

-**Fnc= 0:** no llevamos a cabo ninguna función.

-**Bs1= 1; Bs2=0:** establecemos una línea de base.

-**Oprimimos F1:** el espectro en **Ou1** ya tiene la línea de base=0.

## MANEJO DEL PROGRAMA DE AJUSTE DE ESPECTROS LAB-CALC

### I.- GENERALIDADES, ARRANQUE y CONDICIONES INICIALES DEL LAB-CALC

\*Los espectros procedentes del programa PCIR presentan un formato *Binario-IRD*, que no es reconocido por el programa LAB-CALC. Para poder ajustarlos con el LAB-CALC tienen que tener el formato *Binario-SPC*. Esto se realiza tal y como se indicó en el apartado "Conversión de datos del PCIR a datos procesables en otros programas" :

- El fichero con formato *Binario-IRD* se convierte en fichero con extensión *.SPC* con el programa CONVERTER, utilizando el filtro **PLPSIR40**.

\*El programa LAB-CALC precisa para funcionar de un "**Plug**" conectado a la salida en paralelo **LPT1**. Para cargarse, puede hacerse seleccionando el "Icono" en el administrador de programas WINDOWS, o bien desde DOS tecleando en C:\ el subdirectorio **LC**, y seleccionando LC. La secuencia en DOS sería:

**C:\> CD\LC (enter):** entramos en el subdirectorio LB.  
**C:\ LC > LC (enter):** arrancamos el LAB-CALC.

\*Al cargarse el programa aparece el menú :

- 1.-Seleccionamos **F2**: nos muestra los menus despleables.
- 2.-Seleccionamos **Environment** y a continuación **Directory**: una vez hecho esto debemos escribir el "Path" y el directorio en el que tenemos los ficheros:p.ej.: **C:\ USUARIO \ (enter)** : hemos seleccionado el directorio USUARIO en C:.
- 3.- Seleccionar de nuevo **F2**, a continuación **File**, y dentro de él **Retrieve**. Aparece el listado de ficheros *\*.SPC* localizados en el subdirectorio seleccionado, seleccionamos aquel que queramos ajustar y oprimimos (Enter). Esto carga el fichero (p.ej.: **RFB1 (enter)**), en el Slot #1.
- 4.- **F2: Environment** una vez dentro de Enviroment, seleccionamos **Limits** (nos aparecen varias opciones), a nosotros nos interesa establecer los límites para la banda amida I. A partir de aquí hay dos posibilidades:

#### **A). Espectros grabados de mayor a menor número de onda (1700-1600):**

- Seleccionamos **LeftX (enter)**: sobre la pantalla y utilizando el cursor nos situamos sobre el valor de número de onda = **1700 cm<sup>-1</sup>** y oprimimos (Enter).
- Seleccionamos **RigthX (enter)**: repetimos la operación anterior para **1600 cm<sup>-1</sup>** (Enter).
- Al terminar el acotamiento, seleccionamos **Quit**.
- Alt + F4**: sirve para autoescalar

#### **B).Espectros grabados de menor a mayor número de onda (los de Bilbao 1600-1700):**

- Seleccionamos **X-Flip (enter)**, esto invierte el eje x mostrando el espectro de mayor a menor número de onda.
- Realizamos la selección de ejes tal y como se indicó en el apartado anterior (LeftX , RigthX, etc).

## II.- CURVEFIT: AJUSTE DE LAS CURVAS A LOS PICOS

- Concluidos los pasos anteriores, procederemos del siguiente modo:

1.- Seleccionar **Arithmetic; Other; Curvefit** el programa solicita:

a).- **Nº de picos a ajustar:** normalmente son 8 ó 9 picos, que serían los obtenidos en el RAMOPN a partir de la deconvolución y derivada de la curva que pretendemos ajustar.

b).- **¿Quiere fijar algún parametro?:** contestaremos que sí.

c).- **¿Quiere fijar la línea de base?:** sí.

2.- En pantalla aparece la curva y dos ejes que pueden moverse con el cursor rápidamente o más finamente si mantenemos presionada la tecla **Alt** mientras movemos los cursores. Con ellos debemos establecer la **altura** y el **centro de cada pico** procediendo del siguiente modo:

a).- Con los cursores  $\Leftarrow$  y  $\Rightarrow$  buscaremos el **centro** del primer pico (estimado por **Peak picking** a partir del espectro deconvuelto en el RAMOPN), con los cursores  $\Uparrow$  y  $\Downarrow$  calcularemos la **Altura** estimada de forma visual (para los picos de los extremos (1605 y 1690  $\text{cm}^{-1}$ ) y para el  $\alpha$  (1656  $\text{cm}^{-1}$ ) es el 90% de la altura de la curva en ese centro, para el resto es el 75%). Una vez seleccionados, oprimiremos (**Enter**).

Otra posibilidad es fijarnos en la escala del eje Y y situar el cursor, en los valores de los mejores estimados iniciales de altura para las diferentes bandas: mostrados en la **Tabla.1**.

b).- Para cada pico, tras seleccionar Altura y Centro, el programa solicita además:

- **¿anchura del pico?** para  $\alpha$  suele ser 18, para el primer pico suele ser 8 y para el resto intermedio entre 8 y 16

- **¿tipo de pico?:** Mixto entre Lorentziana y Gaussiana.

- **¿ % Lorentziana?:** 50%

c).- A continuación aparecen la lista de parametros que podemos fijar **en este primer ajuste fijaremos el centro del pico y el % de >Lorentziana**, para lo cual \*Nos colocamos encima de **Centered fixed** y oprimimos (**enter**).

\*Nos colocamos encima de **% Lorent. fixed** y oprimimos (**enter**).

\*Una vez fijados los parámetros seleccionamos **Nothing else** (**enter**).

d).- Repetiremos el proceso para cada pico que deseemos ajustar.

**Tabla.1:** mejores parametros estimados iniciales:

centro	altura	Ancho	% lorentziana
1690.7	0.0009	8	50
1680.3	.0075	10	50
1670.5	.0022	12	50
1656.8	0.07	18	50
1643.8	.049	16	50
1635.1	.043	16	50
1627.5	.035	14	50
1614.9	.0075	10	50
1605.2	.001	8	50

3.- Al finalizar la entrada de **estimados iniciales**, el programa da la posibilidad de corregir errores en alguno de los parametros de los picos introducidos, preguntando:

-¿**Redo any peaks?**: si no ha habido equivocaciones, contestaremos que No; si las ha habido responderemos que sí para poder corregirlas..

4.- Seguidamente el programa solicita grabar o no los estimados iniciales de los picos:

-¿**save ?**: si deseamos grabar los estimados iniciales: contestaremos yes.

-**Peak table filename**: debemos poner el nombre con el que queremos que queden grabados los estimados iniciales de los parametros por ejemplo los de la **Tabla.1**:

p.ej : **RFB1 (enter)**: el fichero queda grabado como RFB1 pero con extensión **.PKS**, es decir, **RFB1.PKS**.

-¿**maximun number of passes?**: podemos darle 100 iteraciones, escribiremos 100.

5.- Cuando concluyen las iteraciones, debemos grabar los estimados secundarios. Para ello seleccionaremos **Params; File parameters**, e introduciremos el nombre con el que deseamos grabar los estimados secundarios: p.ej. **RFB2** (estos se grabarían con extensión **.PKS**). Hecho esto oprimimos **END**.

6.- Ahora debemos iniciar un nuevo ciclo de iteraciones, utilizando como parametros iniciales los obtenidos como estimados secundarios de las primeras iteraciones, pero esta vez debemos liberar el **% de Lorentziana**. Para hacerlo procederemos así:

**F2: Text: Peaks.PKS**: aparecen los ficheros de los estimados iniciales y secundarios (p.ej. **RFB1.PKS** y **RFB2.PKS** respectivamente). Debemos seleccionar el de los estimados secundarios (**RFB2.PKS**).

Aparecen los parametros. Aquellos que presenten un signo "-" son los fijados, nosotros borraremos los signos "-" de delante de los valores de **% Lorentziana**.

Concluido esto oprimimos **Esc** y seleccionamos **Save and Exit (enter)**

7.- En la pantalla aparecen dos espectros: el original, en el Slot #2, aparece con el nombre que le hemos dado, y el artificial, en el Slot #1, que aparece con el nombre curvefit. Para eliminar el artificial de la pantalla, nos situaremos en el Slot #1 utilizando las teclas **Pgup** y **Pgdown** y seleccionaremos: **F2: File : No Show (enter)**: en pantalla solo quedará el espectro original, que ahora estará situado en el Slot #1.

8.- repetir iteración:

**F2: Arithmetics: other: Curvefit (enter)**

\*El programa solicita:

-¿**Nº peaks?**: dado que ahora disponemos de un fichero con los parametros pondremos un **0 (enter)**.

-¿**Parameter name?**: para este ejemplo sería **RFB2**.

-¿**Redo any peak?**: contestaremos que No.

-¿**Save?**: dado que ya esta grabado diremos que No

-¿**Maximun number of passes?**: haremos **100 iteraciones**.

9.- Al finalizar el ajuste hay que grabar los estimados terciarios con el mismo nombre que los iniciales y secundarios añadiendo el número **3**: p.ej. **RFB3** (tendrá extensión **.PKS**). Esto se hará seleccionando:

**Parameters; file parameters**: siguiendo el ejemplo pondríamos el nombre **RFB3**.

Al finalizar se oprime **END**.

10.- Se hace un nuevo ajuste liberando los **Centros de picos**. Para lo cual se selecciona:

**F2; Text; Peaks.PKS** : se coje el fichero de estimados terciarios: **RFB3**, se quita el signo "-" a los **Centros**, y finalmente **ESC: Save and exit**.

11.- Aparece de nuevo el espectro artificial en el Slot #1 y hay que quitarlo tal y como se explica en el apartado 7.

12.- Para hacer el tercer ajuste seleccionamos **F2: arithmetic: other: curvefit** :

-¿**Nº de picos?**: marcamos **0**.

-¿**Parameter name?**: siguiendo el ejemplo : **RFB3**.

- ¿redo any peak?: No
- ¿Save?: No
- ¿Maximun number of passes?: esta vez unos **20**

13.- Al finalizar el ajuste hay que grabar los estimados finales con el mismo nombre que los demás estimados añadiendo el número **4**, para ello se selecciona:

**parameters; file parameters** siguiendo el ejemplo lo nombraremos **RFB4.PKS**.

14.- Dentro de este menu aparecen varias opciones como es ver los picos, grabar picos, etc. A nosotros nos interesa :

\*Ver picos: Seleccionaremos **Peaks (enter)**.

\*Grabar los picos obtenidos: **Save peaks (enter)**: el programa pregunta:

-¿Se graba en MEMORIA ó en DISCO?: **Memory or Disk**: debemos

grabarlo en **DISK**: quedarán grabados con el nombre genérico **Peak** seguido de un número ( asignado por orden) y extensión **.PKS**.

Al finalizar se selecciona **END**.

### III.-REPRESENTACION e IMPRESION

\*Para representar e imprimir la **curva original** con los **picos, el ajuste** y la **linea de base**, es necesario hacer un **multifichero**:

#### III.1.- Creación de un Multifichero:

a) Tras obtener los picos con el **Curfit**, debemos seleccionar la siguiente secuencia:

**F2: arithmetic: doprogram: makmult**, el programa solicita:

-¿Name of Multifile?: por ejemplo **mfRFB**.

-¿Que ficheros lo integrarán?: elegimos **Selected: even**

-Debemos seleccionar los ficheros:

-Seleccionamos **Peak1 (enter)**: el 1º es el pico nº 1 y valor de **Z=1**

-**Peak2 (enter)**: el 2º es el pico nº 2 y **Z=2**

" "

" "

-**Peak9 (enter)**: el 9º es el pico nº 9

-**Curfit (enter)**: seleccionamos el ajuste.

-**Curva original**: por ejemplo **RFB1**

-**Baseline (enter)**: seleccionamos linea de base.(esta siempre la última)

\* Al dar al **ESC** se genera un multifichero.

#### III.2.-Imprimir el Multifichero:

a) Para cargar el multifichero procederemos así:

**F2: File: retrieve**: seleccionamos el multifichero: por ejemplo **mfRFB**

\*Debemos autoescalarlo **Alt + F4** .

b) Debemos seleccionar el **Template** actuando según la secuencia:

**F2: environment: template+parms: retrieve: ajustes2** (es el nombre del template) **(enter)**

c) Debemos entrar en modo Draw:

**F2: draw**

Ahora están superpuestas todas las trazas (original, artificiales y la línea de base), debemos situar el cursor en aquel punto del gráfico en el que deseemos escribir alguna anotación, como el nombre del multifichero.

d) Introducir una anotación en el gráfico que se va a imprimir:

-En primer lugar debemos seleccionar la Orientación del texto que vamos a escribir, para ello seleccionaremos (dentro del modo Draw): **Environment: Direction:** podemos elegir entre **Horizontal** o **Upside Down (enter)**

-A continuación escribiremos seleccionaremos **F9 (texto):** e introduciremos la anotación.

e) Salimos del modo Draw:

**F2: quit.** De esta forma se sale del modo drawing y se va a los menús normales.

f) Para visualizar el plot (como en un Preview):

**F2: Plot: Screen:** para regresar a los menús oprimir **ESC.**

g) Para seleccionar el puerto, tenemos varias opciones:

1).- Sacar el gráfico por impresora:

**F2; Plot; change settings; graphics printer: printer port: Parallel (Lpt1): (enter)**

2).- Sacar el gráfico por plotter:

**F2; Plot; change settings; plotter; plotter port; Serial (COM 1); 9600; none; 8 bit; 1 bit**

h) Para sacarlo por impresora o plotter:

1).- Impresora:

**F2; graphics printer; printer (enter).**

2).- Plotter:

**F2; plotter (enter)**

\*\*\*\*\*

\*\*\*\*\*

\*\*\*\*\*

## **PREPARACION DE MUESTRAS PARA FT-IR**

### **I.-PREPARACION DE LIPIDOS PARA RECONSTITUCION: CHAPS DIALISIS**

**A)** Debemos pesar en un tubo de rotavapor *tarado* la cantidad de lípidos secos que tenemos. A continuación los **lípidos secos** (Asolectina completa, Fosfolípidos de asolectina, Fosfatidil colina de huevo, etc), se **resuspenden** con un volumen de **cloroformo** tal que conozcamos la concentración de lípidos que poseemos:

p.ej.: 200 mg de PL por cada 3 ml de Cloroformo.

En el caso de tener que *suplementarlos artificialmente* con distintos porcentajes de colesterol, este debe añadirse suspendido en cloroformo en este momento. El porcentaje de colesterol añadido

debe hacerse en % molar ( x moles de colesterol por cada 100 moles de fosfolípidos): p.ej: gr. de PL / Mr. de PL = moles de PL

$$(\text{moles de PL} \times 10) / 100 = 10\% \text{ molar de PL}$$

$$10\% \text{ molar de PL} = 10\% \text{ molar de Colest.}$$

$$10\% \text{ molar de Colest.} \times \text{Mr. Colest.} = \text{gr de Colest. para } 10\% \text{ molar}$$

$$\text{El } 20\% = 2 \times \text{gr. de Colest. para } 10\% \text{ molar.}$$

$$\text{El } 40\% = 4 \times \text{gr. de Colest. para } 10\% \text{ molar.}$$

**B)** A continuación se **secan al rotavapor**, y se someten a **vacío** durante 15 minutos.

**C)** Se soplan con Argón durante 10 minutos (cada tubo).

**D)** Los lípidos secos (*con o sin un determinado % de colesterol*), se someten a **Vacío** durante unas **3 horas** a fin de eliminar solventes orgánicos: esto se lleva a cabo en el Liofilizador. A continuación realizamos un soplado con Argón durante 10 minutos/tubo.

**E)** Una vez liofilizados, **resuspenderemos** los lípidos en el **tampón deseado** (Normalmente *Tris 10 mM NaCl 100 mM pH 7.4*). Para ello procederemos según casos del siguiente modo:

1.-Dado que conocemos la cantidad de fosfolípidos que tenemos (considerando un peso molecular medio de 750 gr/mol), debemos calcular el volumen final de tampón en que debemos resuspender para que nos de una concentración final conocida: por ejemplo **30 mg de PL/ml**.

2.- **Fosfolípidos de Asolectina, Asolectina total o Fosfatidil colina de huevo (con o sin colesterol)**: Agitamos fuertemente la muestra en el Vortex, dejar rehidratarse la muestra en **Nevera durante una noche**, volvemos a agitar. A continuación **Sonicamos en baño 15 minutos**, hasta claridad. Si no se consigue claridad, **Sonicaremos con Sonda grande (Artek 300)**, en **3 series de 3 minutos** alternadas con periodos de enfriamiento en hielo. Posteriormente centrifugamos ( 1500 rpm / 3 min.) para precipitar el Titanio que se hubiese desprendido de la sonda. Finalmente extraemos el sobrenadante y enrrasamos al volumen final.



F) las vesículas multilamelares procedentes de la diálisis separan en alicuotas de 1 a 1.5 ml y se congelan a -40°C. Ya son útiles para reconstitución.

## II.-RECONSTITUCION DEL AcChR

A) Partimos de AcChR purificado en columna y por tanto solubilizado en colato. Resulta especialmente importante hacer un LOWRY normal para estimar la concentración de proteína que poseemos. También es aconsejable hacer un perfil electroforético y un Binding con ###-Bungarotoxina para comprobar la presencia de las 4 subunidades y la actividad de unión de agonistas.

B) Tomar una muestra de lípidos para reconstituir. Calcular el volumen de lípidos que debemos añadir (conociendo su concentración) para conseguir una proporción (en peso Lípido:Proteína) de **5:1** y mezclarlos: p.ej.: la relación molar Lípidos:Proteína debe ser entre 2000 y 3000.: ejemplo:

Supongamos que tenemos AcChR a una concentración de **1 mg/ml**, y disponemos de PL a una concentración de **30 mg/ml**:

Deberemos adicionar por cada **1 ml de AcChR, 0.166 ml de PL**.

Antes de mezclarlos, debemos solubilizar los PL en Colato durante 5 minutos hasta conseguir un 4% final. Dado que partimos de un Stock de Colato al 20%:

$$(0.166 \text{ ml} + V_a) \cdot 4\% = V_a \cdot 20\%$$

Añadiríamos 0.0415 ml de Colato 20%, a los 0.166 ml de PL.

C) Sometemos la suspensión de receptor purificado y lípidos a **Dialisis exhaustiva** del siguiente modo:

-Dializar con un total de 8-10 litros de Tris 10 mM NaCl 100 mM, en tandas de 2 litros cada una, renovando el tampón por la mañana y por la noche (no debe olvidarse hacer las diálisis a 4°C y en agitación).

-Concluido lo anterior, sutituir los 2 últimos litros del anterior tampón por 2 litros de Hepes 10 mM NaNO<sub>3</sub> 100 mM, dejarlo unas 12 a 14 horas dializando. Transcurrido este tiempo, renovar el tampón de diálisis, y dializar esta vez con 1 litro del mismo durante 4-6 horas.

D) Finalmente extraer el dializado, medir el volumen para saber aproximadamente la concentración de proteína (basada en la cantidad establecida al principio). Resulta más fiable realizar también un LOWRY de proteína precipitada.

E) Dividir en alicuotas y repartir en **Criotubos**, a fin de congelar el Nitrogeno líquido.

