ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA ELÉCTRICA

SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS PARA UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS POR TIEMPO DE VUELO

ROBERT LENIN ACOSTA GUEVARA

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN LA ESPECIALIZACIÓN DE ELECTRÓNICA Y CONTROL

Quito, junio del 2000

Certifico que la presente tesis ha sido realizada en su totalidad por el Sr. Robert Lenin Acosta Guevara.

Dr. Luis Corrales
DIRECTOR DE TESIS

Dr. César Costa
CO-DIRECTOR DE TESIS

DEDICATORIA

A mis padres quienes con su sacrificio hicieron posible la culminación de mis estudios.

A mis hermanos por la comprensión brindada durante esta etapa de mi vida.

A mi familia materna que de una u otra forma ha contribuido con sus consejos y apoyo desinteresado para la culminación de mis estudios.

Y en fin, a todas las personas que de una u otra forma han contribuido en mi desarrollo tanto intelectual como personal.

AGRADECIMIENTO

Mi más profundo agradecimiento a todos los profesores que me brindaron sus conocimientos, en especial al Dr. Luis Corrales y al Dr. César Costa, por sus valiosos aportes humanos y científicos en el desarrollo de la presente tesis.

Además, mi profunda gratitud para quienes conforman el Laboratorio MALDI del Departamento de Física de la Escuela Politécnica Nacional, particularmente al Dr. Edy Ayala por su valiosa colaboración.

ÍNDICE

		Página
INTRODUCCIÓN		1
CAPÍTULO 1.		
GENERALIDADES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS		2
1.1.	ANTESCEDENTES	2
1.2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	2
1.3.	CONCEPTOS FUNDAMENTALES DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	3
1.3.1.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR TIEMPO DE VUELO	5
1.3.2.	MALDI	6
1.3.3.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ESPECTROS DE MASAS MALDI TOF MS	7
1.3.4.	PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DE LOS ESPECTRÓMETROS DE MASAS TOF	9
1.3.4.1.	TIEMPO EMPLEADO POR UN ION EN RECORRER UNA REGIÓN CON UN CAMPO ELÉCTRICO HOMOGÉNEO	10
1.3.4.2.	TIEMPO EMPLEADO POR UN ION EN RECORRER UNA REGIÓN LIBRE DE CAMPO ELÉCTRICO	11
1.3.4.3.	ECUACIÓN DE TIEMPO DE VUELO	11
1.3.4.4.	APROXIMACIONES DE LA ECUACIÓN DE TIEMPO DE VUELO	12
1.3.4.4.1.	PRIMERA APROXIMACIÓN	13
1.3.4.4.2.	SEGUNDA APROXIMACIÓN	14
1.3.4.4.3.	TERCERA APROXIMACIÓN	14
1.3.4.5.	CALIBRACIÓN EXTERNA E INTERNA	15
1.3.4.6.	RESOLUCIÓN Y PRECISIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE LA MASA	16
1.3.4.6.1.	ESPEJO ELECTROSTÁTICO O REFLECTRÓN	17
1.3.4.6.2.	EXTRACCIÓN RETARDADA	18

1.3.5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS TOF MALDI 19

CAPÍTULO 2.

DETECCIÓN DE IONES Y ADQUISICIÓN DE DATOS 20
2.1. LÁSER ULTRAVIOLETA 20
2.2. CIRCUITO DE DISPARO DE INICIO DE COLECCIÓN DE ESPECTROS 21
2.3. DETECTOR DE PLACAS DE MICROCANALES (MCP) 21
2.4. OSCILOSCOPIO 23
2.4.1. OSCILOSCOPIOS DIGITALES 24
2.4.1.1. PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE UN OSCILOSCOPIO DIGITAL 25
2.4.1.2. CONTROL REMOTO DEL OSCILOSCOPIO DIGITAL 27
2.5. TARJETA DE ADQUISICIÓN DE DATOS (GPIB) 28
2.5.1. OPERACIÓN DEL GPIB 28
2.5.1.1. TIPOS DE MENSAJES 28
2.5.1.2. TALKERS, LISTENERS Y CONTROLLERS 29
2.5.1.3. DIRECCIONAMIENTO GPIB 29
2.5.1.4. SEÑALES Y LÍNEAS DEL GPIB 30
2.5.1.4.1. LÍNEAS DE DATOS 30
2.5.1.4.2. LÍNEAS DE HANDSHAKE 30
2.5.1.4.3. LÍNEAS DE MANEJO DE LA INTERFAZ 31
2.5.1.5. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y ELÉCTRICAS 32
2.5.1.6. REQUERIMIENTOS DE CONFIGURACIÓN 33
2.5.1.7. SOFTWARE DE MANEJO DEL GPIB 33
2.6. TARJETA DE INTERFAZ NUBUS 34
2.6.1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LA TARJETA NB-GPIN/TNT 34

2.7.	PLATAFORMA DE PROGRAMACIÓN	35
2.7.1.	LOS INSTRUMENTOS VIRTUALES EN LABVIEW	35
2.7.2.	CONTROL DE INSTRUMENTOS	36
2.7.2.1.	INSTRUMENT DRIVER (CONTROLADORES)	36
2.7.2.1.1.	ESTRUCTURA DE LOS INSTRUMENT DRIVERS	37
2.7.2.1.1.1.	INSTRUMENT DRIVER APPLICATION VIs	37
2.7.2.1.1.2.	INSTRUMENT DRIVER COMPONENT VIs	37
2.7.2.1.1.3.	ELEMENTOS BÁSICOS DE LOS INSTRUMENT DRIVER COMPONENT VIs	39

CAPÍTULO 3.

DESARROLLO DEL SOFTWARE		41
3.1.	CONTROL DEL OSCILOSCOPIO	46
3.1.1.	CONSIDERACIONES	46
3.1.2.	CARACTERÍSTICAS	47
3.2.	ADQUISICIÓN Y TRANSFERENCIA DE LOS ESPECTROS DEL OSCILOSCOPIO AL COMPUTADOR	51
3.2.1.	CONSIDERACIONES	51
3.2.2.	CARACTERÍSTICAS	52
3.2.2.1.	FUENTE	52
3.2.2.2.	ANCHO	52
3.2.2.3.	FORMATO	53
3.2.2.4.	LONGITUD	53
3.3.	ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS	55
3.3.1.	PRESENTACIÓN VISUAL DEL ESPECTRO	55
3.3.2.	MANIPULACIÓN DEL ESPECTRO	56
3.3.2.1.	SUMA DE ESPECTROS	56
3.3.2.2.	FUNCIONES DE ZOOM	57
3.3.2.3.	DEFINICIÓN DE UN PICO	59
3.3.2.3.1.	REDEFINICIÓN DEL PICO	62

3.3.2.3.2.	ALMACENAMIENTO TEMPORAL DE LOS PICOS	63
3.3.2.3.3.	LECTURA DE LOS PICOS ALMACENADOS	63
3.3.2.3.3.	CÁLCULO DEL VALOR DE BACKGROUND	64
3.3.2.3.4.	CÁLCULO DEL CENTROIDE DE UN PICO	65
3.3.2.3.5.	CÁLCULO DE LA RESOLUCIÓN DE UN PICO	66
3.3.2.4.	ALMACENAMIENTO DE UNA REGIÓN	67
3.3.3.	SOLUCIÓN MATEMÁTICA DE LA ECUACIÓN DE CALIBRACIÓN	67
3.3.3.1.	CALIBRACIÓN DESDE ARCHIVO	68
3.3.3.2.	CALIBRACIÓN BÁSICA DE UN COEFICIENTE	71
3.3.3.3.	CALIBRACIÓN BÁSICA DE DOS COEFICIENTES (UN CALIBRANTE)	72
3.3.3.4.	CALIBRACIÓN DE DOS PUNTOS (DOS O MÁS CALIBRANTES)	74
3.3.3.5.	CALIBRACIÓN DE TRES PUNTOS (TRES O MÁS CALIBRANTES)	75
3.3.3.6.	CALIBRACIÓN DE TRES PUNTOS (TRES O MENOS CALIBRANTES)	77
3.3.3.7.	ALMACENAMIENTO DE LA CALIBRACIÓN	80
3.3.4.	CONVERSIÓN DE ESCALA DE TIEMPO A MASA	81
3.4.	ADMINISTRACIÓN DE LA INFORMACIÓN ADQUIRIDA	86
3.4.1.	ALMACENAMIENTO	86
3.4.2.	LECTURA	88
3.4.3.	REPORTES	90
3.5.	CAJAS DE AYUDA	93
3.6	CARACTERÍSTICAS ADICIONALES DEL SOFTWARE	93

CAPÍTULO 4.

PRUEBAS Y RESULTADOS		95
4.1.	CONTROL DEL OSCILOSCOPIO	95

4.2.	ADQUISICIÓN Y TRANSFERENCIA DE LOS ESPECTROS	98
4.2.1.	PRUEBA 1	98
4.2.2.	PRUEBA 2	101
4.2.3.	PRUEBA 3	103
4.2.4.	PRUEBA 4	105
4.3.	MANIPULACIÓN DE LOS ESPECTROS	106
4.3.1.	PRUEBA 1	106
4.3.2.	PRUEBA 2	107
4.3.3.	PRUEBA 3	108
4.4.	CALIBRACIÓN DE LOS ESPECTROS	110
4.4.1.	PRUEBA 1	110
4.4.2.	PRUEBA 2	117
4.5.	ALMACENAMIENTO, LECTURA E IMPRESIÓN DE LA INFORMACIÓN ADQUIRIDA	118
4.5.1.	PRUEBA 1 (ALMACENAMIENTO)	118
4.5.2.	PRUEBA 2 (LECTURA)	120
4.5.3.	PRUEBA 3 (GENERACIÓN DE REPORTES)	121

CAPÍTULO 5.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 127

BIBLIOGRAFÍA. 131

ANEXOS

ANEXO A 133

ANEXO B 143

ANEXO C 144

INTRODUCCIÓN

El trabajo que aquí se reporta se refiere a un sistema que permite realizar el control de un osciloscopio digital y la adquisición y la transferencia de los espectros provenientes de un Espectrómetro de Masas por Tiempo de Vuelo hacia el computador para su respectiva manipulación. Con tal propósito se ha diseñado el programa Aldebarán, el cual satisface todos estos requerimientos.

Una de las características importantes del sistema desarrollado es el empleo de la interfaz GPIB como medio de comunicación entre el osciloscopio digital y el computador.

El sistema completo de adquisición, análisis y administración de la información de los espectros, se lo ha realizado por medio del lenguaje de programación LabVIEW que es especializado para este tipo de tareas.

El sistema desarrollado se encuentra actualmente en uso en el Laboratorio MALDI del Departamento de Física de la Facultad de Ciencias.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

1.1. ANTESCEDENTES

En el departamento MALDI, de la Facultad de Ciencias, se cuenta con un Espectrómetro de Masas por Tiempo de Vuelo con técnica MALDI, en el que la señal del detector es enviada a uno de dos osciloscopios digitales de que se dispone: Tektronix TDS 360 y LeCroy 9450A. En el caso del osciloscopio Tektronix, el espectro capturado se lo exporta a través de una diskettera de 3½ hacia un computador para manipularlo, ya sea a través de una hoja electrónica o por medio de un programa de manipulación de espectros. Para el caso del osciloscopio LeCroy, el espectro se manipula manualmente a través de la capacidad que posee este osciloscopio de realizar zooms sobre detalles de la forma de onda.

1.2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La necesidad de que exista un sistema de comunicación directa entre el osciloscopio y el computador, ha involucrado el desarrollo de un software que permita satisfacer los siguientes objetivos:

- Definir desde el computador los parámetros de operación del osciloscopio
- Adquirir y transferir las formas de onda del osciloscopio al computador
- Analizar y manejar versátilmente el espectro que se tiene en pantalla
- Administrar la información adquirida

Con el fin de cumplir las condiciones requeridas, se ha desarrollado el programa Aldebarán, el cual está íntegramente desarrollado en el lenguaje gráfico LabVIEW y compuesto por 118 instrumentos virtuales (VIs).

A continuación, se hace una breve reseña de como se ha estructurado y desarrollado el presente trabajo:

En el primer capítulo, se da un conocimiento adecuado de lo que es la Espectrometría de Masas y particularmente sobre el principio de funcionamiento de los Espectrómetros de Masas por Tiempo de Vuelo MALDI y las características de los espectros que producen.

En el segundo capítulo, se describe los elementos de hardware y software empleados en la detección de iones y adquisición de los datos.

En el tercero se procede a explicar los pormenores del desarrollo del programa encargado de controlar el osciloscopio, transmitir los espectros al computador, realizar el manejo versátil del espectro en pantalla y administrar la información procesada.

En el cuarto capítulo se describen las pruebas a las que se sometió al sistema con el fin de verificar su correcto funcionamiento, así como los resultados que se obtuvieron.

Finalmente, en el quinto capítulo, se exponen las conclusiones, comentarios y recomendaciones, extraídas de la experiencia que se obtuvo durante el desarrollo del sistema, los cuales permiten evaluar el trabajo desarrollado y orientar, de así hacerlo, cualquier trabajo posterior que se realice en este campo.

1.3. CONCEPTOS FUNDAMENTALES DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La Espectrometría de Masas (MS, por sus siglas en inglés) es un conjunto de técnicas analíticas que permiten determinar la masa de una gran variedad de compuestos y biomoléculas en una amplio rango de tamaños.

La Espectrometría de Masas se puede usar para identificar compuestos desconocidos, cuantificar sustancias conocidas y elucidar las propiedades estructurales de las moléculas, de esta manera, provee una valiosa información en diferentes ramas de la ciencia, tales como Química Analítica, Biología Molecular, Química Orgánica, entre otras; así como, en diferentes procesos tales como el control de calidad de productos farmacéuticos, petroquímica, etc.

ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Un espectrómetro de masas es un instrumento que mide la masa de moléculas individuales que han sido convertidas a iones, es decir, moléculas que han sido cargadas eléctricamente. Puesto que las moléculas son muy pequeñas, la unidad de masa es referida con frecuencia como el Dalton (Da), el cual es definido como: 1 Da = 1/12 de la masa de un átomo de isótopo de carbono-12 e igual a 1.67E-27 Kg.

Pero un espectrómetro de masas realmente no mide la masa molecular directamente sino la relación masa a carga de los iones formados de las moléculas. La carga de un ion es denotada por z y representa el número entero de unidades fundamentales de carga (carga del electrón) que posee dicho ion.

Por consiguiente, la relación masa a carga m/z representa la masa en Daltons por unidad fundamental de carga. En muchos casos, los iones tienen solo una carga (z =1) así que el valor de m/z es numéricamente igual a la masa molecular en Da.

En el diagrama de bloques de la Figura 1-1 se representa los componentes fundamentales que conforman un espectrómetro de masas.

Un espectrómetro consta básicamente de tres regiones fundamentales:

1. **Fuente:** es la región donde se produce la ionización de las moléculas.

2. **Discriminante o Analizador:** es la región donde se separan las moléculas en función de su relación masa a carga, lo que se hace generalmente en función de otro parámetro físico.

3. **Detector:** en esta región el flujo de iones es convertido a una corriente eléctrica proporcional.

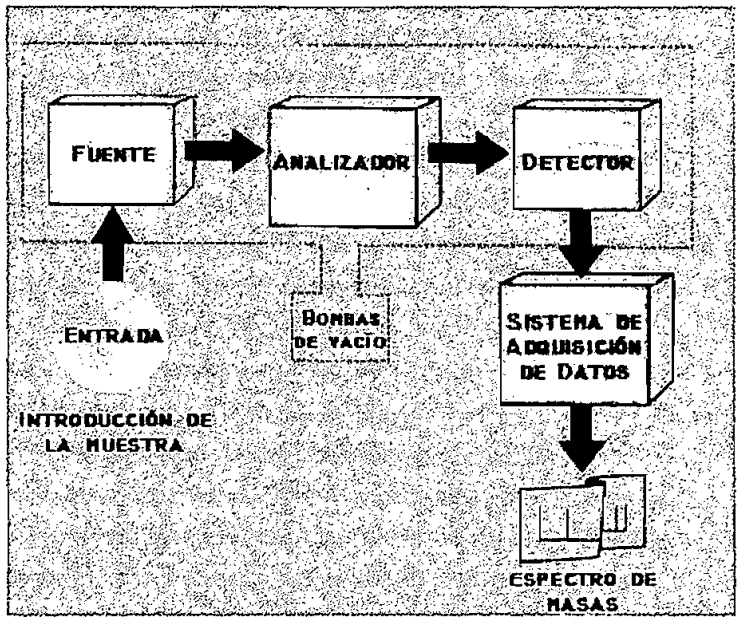


Figura 1-1 Componentes de un espectrómetro de masas

Un componente muy importante del espectrómetro es el Sistema de adquisición de datos, el cual permite registrar la magnitud de la señal eléctrica proveniente del detector como una función de m/z y convertir esta información en un *espectro de masa*.

Adicionalmente, un sistema de vacío es necesario para garantizar que los iones moleculares puedan ser manipulados sin interferencia de gases residuales.

ESPECTRO DE MASAS

Un espectro de masa consiste en un diagrama de la intensidad (abundancia) del ion en función de la razón masa a carga. Los espectros de masa son con frecuencia graficados como simples histogramas como en la Figura 1-2. Este registro de los iones y sus intensidades sirve para establecer la masa molecular y la estructura de la sustancia que está siendo analizada. Por ejemplo, la Figura 1-2 muestra un espectro de masa de una simple molécula de dióxido de carbono, CO_2.

En este ejemplo, todos los iones están positivamente cargados (también es posible generar y detectar iones negativos). La molécula ionizada CO_2 aparece en m/z = 44 Da

(C = 12 Da y O = 16 Da). Debido a que el proceso de ionización produce rompimientos o fragmentos de algunas moléculas de CO_2, algunos de estos iones aparecen en el espectro con valores de m/z menores al valor de m/z que corresponde a la masa molecular de CO_2. La ruptura de los enlaces produce iones de monóxido de carbono m/z = 28, de átomos de oxígeno m/z = 16 y de átomos de carbono m/z = 12. El ion molecular es designado como M^+ or CO_2^+ y los fragmentos son designados como CO^+, O^+ y C^+.

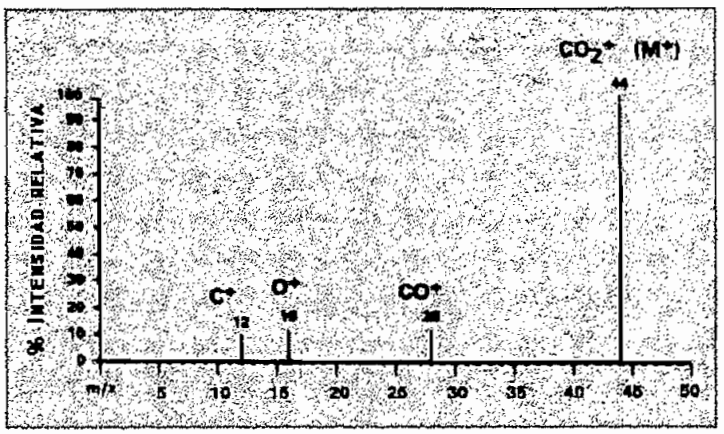


Figura 1-2 Espectro de masa de una molécula de dióxido de carbono, CO_2. El ion molecular se aprecia en m/z = 44

Existen algunos espectrómetros de masas que difieren de acuerdo a la forma en que se escogen la región de fuente y de discriminación. En función de esto, varían los rangos de masa y la precisión con que esta puede ser determinada.

1.3.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR TIEMPO DE VUELO

La Espectrometría de Masas por tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) es una técnica usada comúnmente en Física para resolver las diferencias en masa y las distribuciones en energía cinética de iones.

Un espectrómetro de masas por tiempo de vuelo en su forma más simple, consiste típicamente de las mismas tres regiones principales antes ya señaladas: la fuente de iones, un discriminante conocido en este caso como región de vuelo libre y el detector, como se muestra en la Figura 1-3.

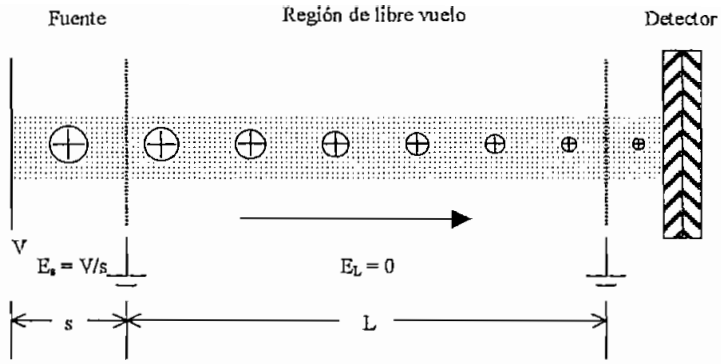


Figura 1-3 Esquema simplificado de las regiones básicas de un espectrómetro de masas por tiempo de vuelo

En la *fuente de iones* se ionizan las especies moleculares de interés. Para esto es necesario primero aislarlas unas de otras en un ambiente vacío. Los iones moleculares se aceleran mediante un campo eléctrico homogéneo presente en la fuente, de tal suerte que todos alcanzan la misma energía cinética cuando dejan la fuente de iones.

En segundo lugar viene la llamada *región de vuelo libre*, que es un tubo en el que no existe campo eléctrico y en el que los iones se mueven con la energía cinética adquirida en la región anterior. Por esta razón, los iones con distinta masa molecular se separan, ya que sus velocidades son diferentes.

Así pues, los iones de diferentes masas se separarán en paquetes y llegarán, en una secuencia de masas crecientes, en tiempos diferentes a la tercera región, esto es, el detector.

La *región de detección* usualmente involucra una post-aceleración de los iones previa al encuentro de estos con la superficie de los elementos del detector.

El tiempo de vuelo de un ion particular, t, depende de las condiciones iniciales de su formación, de la geometría del instrumento y de los campos eléctricos usados; sin embargo, se demuestra con facilidad que hay una relación lineal simple entre t y $\sqrt{m/z}$ (ver Capítulo 1.3.4.4). Con esto la calibración e interpretación de los espectros de masa se simplifican considerablemente.

1.3.2. MALDI

A finales de la década de los años 80 un grupo de científicos alemanes introdujo una novedosa técnica para la generación de iones moleculares llamada Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation: MALDI. Con esta técnica fue posible por primera vez registrar masas de más de 300 kDa. [1]

[1] R. Cotter, Analytical Chemistry, vol. 64, 1029A (1992)

MALDI es una técnica que permite "desorber", esto es poner en fase gaseosa, y ionizar a moléculas de muchos tipos. La muestra que se analiza se produce mezclando sobre un sustrato metálico cantidades convenientes de soluciones de la sustancia de interés (por ejemplo, proteínas) y de una *matriz*. La solución resultante se deja secar, formándose al final una fina película compuesta de pequeños cristales de la matriz en las que las moléculas de interés se han empotrado, a manera de impurezas. Cuando se tiene la muestra ya preparada se la introduce en la región de fuente del espectrómetro. Allí, mediante la incidencia de un pulso láser de longitud de onda adecuada, se produce la vaporización de las moléculas. El material es eyectado en forma de un jet gaseoso y durante su expansión se produce la ionización de las moléculas. Un esquema del proceso MALDI se muestra en la Figura 1-4.

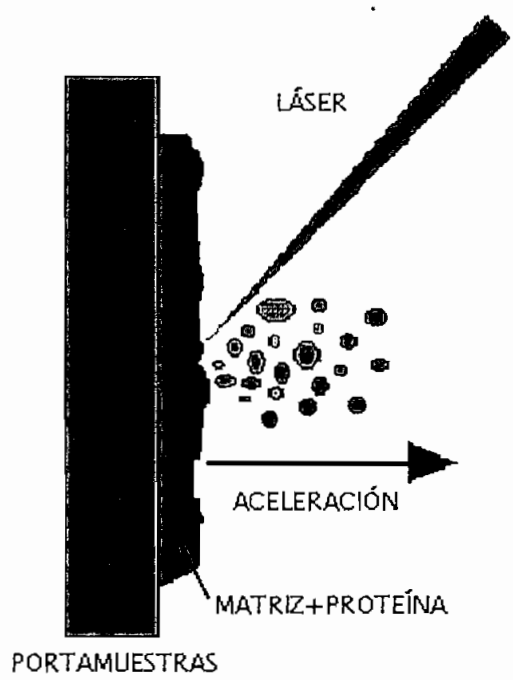


Figura 1-4 Esquema del proceso MALDI

Las matrices son compuestos aromáticos que absorben prácticamente toda la energía del láser, esto protege a las moléculas de interés de daños producidos por el impacto directo del láser. Además, las moléculas de la sustancia matriz son las encargadas de producir la ionización de las moléculas de interés durante la expansión del material desorbido.

La versión más popular de MALDI usa pulsos de láser ultravioleta en conjunción con espectrómetros de tiempo de vuelo para el análisis de masas de los productos.

1.3.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ESPECTROS DE MASAS MALDI TOF MS

La señal eléctrica proveniente del detector se la analiza en un osciloscopio, el cual permite registrar los tiempos de vuelo de los diferentes iones involucrados en el proceso. En MALDI TOF MS la relación masa/carga se mide a través de la

determinación del tiempo de vuelo que los iones demoran en volar desde su origen hasta el detector.

Los espectros de masa MALDI usualmente presentan dos zonas claramente diferenciables. La primera, formada por una serie de picos de gran valor de intensidad a tiempos de vuelos pequeños que corresponden a las moléculas de la matriz, sus fragmentos y agregados; y, una segunda zona con picos de menor intensidad, más separados y a tiempos de vuelos mayores, los cuales corresponden a los picos de la molécula en estudio, picos de los calibrantes (cuando se incluyen) y picos de las especies formadas por aducción (por ejemplo: $M+Na^+$ y $M+K^+$) o fragmentación. Además, en todo el espectro se encuentra presente una señal de ruido, generalmente bajo, conocido como "background" el cual se debe al ruido térmico presente en el detector. Por ejemplo, la Figura 1-5 muestra un espectro de masa MALDI correspondiente a un anticuerpo monoclonal de masa molecular ≈ 150000 Da.

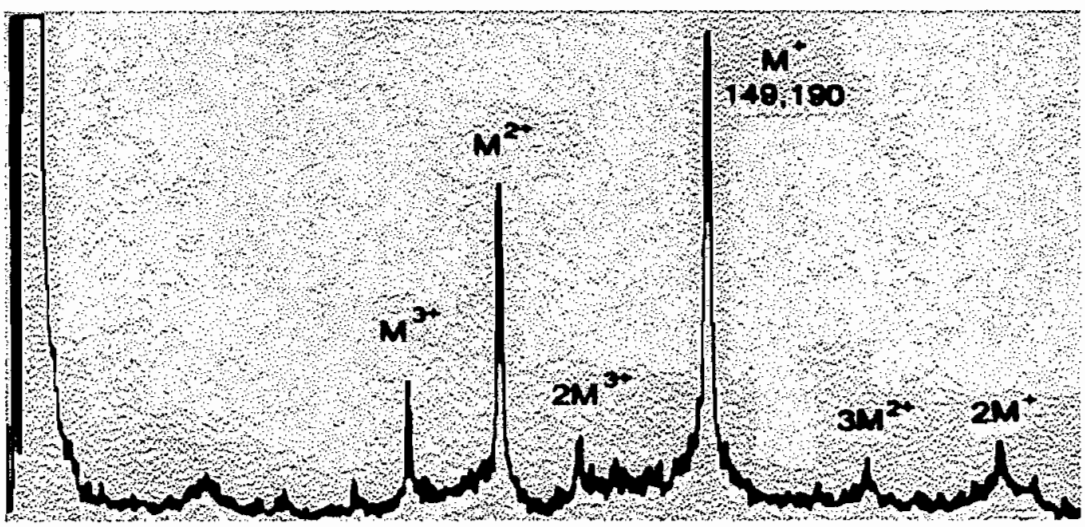


Figura 1-5 Espectro de masas MALDI de un anticuerpo monoclonal de un ratón

En este ejemplo, el espectro producido como adición de 30 eventos de adquisiciones, aparece como fue obtenido. Es decir, sin realizar algún procesamiento de datos y se caracteriza por un nivel muy bajo de background y por la aparente no-fragmentación de la muestra. La molécula en estudio aparece protonada hasta con tres cargas: M^+, M^{2+} y M^{3+} y además se produce la formación de un dímero (2M) protonado con una y tres cargas: $2M^+$ y $2M^{3+}$. Los picos de matriz aparecen en esta vista del espectro en la región de masas bajas como un solo pico de alta intensidad y los picos de aductos se han unido a los picos de los iones moleculares debido a la baja resolución del espectro.

Un hecho importante es que no todos los iones se forman con las mismas condiciones iniciales, es decir, tienen una distribución inicial de velocidad y de posición. De modo que, los iones al salir de la fuente tienen una cierta distribución de energía cinética, a pesar de tener la misma relación masa/carga. Esto se refleja en un ensanchamiento de los picos del espectro que condiciona una pérdida de la resolución (ver Figura 1-5). En el caso de MALDI la distribución inicial de posiciones no es importante.

Las muestras en MALDI son usualmente heterogéneas y sufren de una repetibilidad mas bien pobre. Es por esta razón que es necesario acumular varios espectros para mejorar la calidad y la estadística del resultado.

1.3.4. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DE LOS ESPECTRÓMETROS DE MASAS TOF

Una vez que se obtiene el espectro o la suma de espectros deseados, se procede a la tarea de asignar masas a los diferentes picos del espectro en función de sus tiempos de vuelo, tarea comúnmente llamada como *calibración*.

Con el objeto de realizar la calibración es necesario encontrar una ecuación que relacione el tiempo de vuelo con la razón masa a carga del ion. Dicha expresión se la conoce como *ecuación de calibración* o *ecuación de tiempo de vuelo*.

La ecuación de tiempo de vuelo depende también de parámetros tales como: las diferentes distancias geométricas de cada región, los voltajes aplicados para la aceleración de los iones y las condiciones iniciales bajo las cuales los iones son producidos. Esto es, posición y velocidad.

El tiempo de vuelo de un ion particular t se determina sumando los tiempos empleados por el ion en recorrer las diferentes regiones que conforman el espectrómetro. Así por ejemplo, para un espectrómetro como el mostrado en la Figura 1-3, la ecuación de tiempo de vuelo se expresa como:

$$t = T_s + T_L + T_{pa} \tag{1}$$

donde

T_s	es el tiempo empleado por el ion en recorrer la región de fuente.
T_L	es el tiempo empleado por el ion en recorrer la región de vuelo libre.
T_{pa}	es el tiempo empleado por el ion en recorrer la región de detección.

Generalmente, $T_{pa} << T_s + T_L$ por lo que se lo puede despreciar, quedando la ecuación

$$t = T_s + T_L \tag{2}$$

Con el objeto de obtener las expresiones correspondientes del tiempo de vuelo en la región de fuente y en la región de vuelo libre, no se necesita incluir mucho más que las ideas del movimiento uniformemente acelerado y del movimiento uniforme como se muestra a continuación.

1.3.4.1. TIEMPO EMPLEADO POR UN ION EN RECORRER UNA REGIÓN CON UN CAMPO ELÉCTRICO HOMOGÉNEO

Esta ecuación se aplica por ejemplo a la región de fuente del espectrómetro de la Figura 1-3. Aplicando las fórmulas del MRUV para la región de fuente, se tiene que:

$$T_s = \frac{s}{\frac{v_f + v_o}{2}} \tag{3}$$

donde

v_o	es la velocidad inicial del ion.
v_f	es la velocidad final alcanzada al final de la fuente de iones.
s	es la longitud de la región de fuente

La fuerza que acelera al ion a través de esta región está dada por

$$m * a = q * E \tag{4}$$

donde

m	es la masa del ion.
q	es la carga del ion.
E	es el campo eléctrico.
a	es la aceleración.

Integrando la ecuación anterior, la velocidad del ion para el tiempo t es:

$$v = v_o + \frac{q * E}{m} t \tag{5}$$

Por lo que al llegar al final de la región de fuente, al tiempo $t = T_s$, la velocidad final v_f del ion es

$$v_f = v_o + \frac{q * E}{m} T_s \tag{6}$$

Como el campo eléctrico es homogéneo, este se relaciona con la diferencia de potencial aplicada entre las placas como:

$$E = \frac{V}{s} \tag{7}$$

donde

V	es la diferencia de potencial.

Por lo tanto,

$$v_f = v_o + \frac{q * V}{m * s} T_s \tag{8}$$

Reemplazando la ecuación (3) en esta última se tiene

$$v_f = \sqrt{v_o^2 + \frac{2*q*V}{m}} \tag{9}$$

Así, el tiempo empleado en una *región aceleradora* como la región de fuente está dada por:

$$T_s = \frac{2*s}{\sqrt{v_o^2 + \frac{2*q*V}{m}} + v_o} \tag{10}$$

1.3.4.2. TIEMPO EMPLEADO POR UN ION EN RECORRER UNA REGIÓN LIBRE DE CAMPO ELÉCTRICO

En una región de este tipo, el campo eléctrico es nulo, por lo que la velocidad es constante y el tiempo para atravesar la longitud del tubo de vuelo, L, es simplemente

$$T_l = \frac{L}{v} \tag{11}$$

Para el caso de la región de vuelo libre del espectrómetro de la Figura 1-3, conociendo que la velocidad con la que el ion llega a esta región es la velocidad final con la que sale de la región de fuente, se deduce que

$$T_l = \frac{L}{\sqrt{v_o^2 + \frac{2*q*V}{m}}} \tag{12}$$

1.3.4.3. ECUACIÓN DE TIEMPO DE VUELO

La expresión final de la ecuación de tiempo de vuelo para un espectrómetro lineal sencillo como el que se indica en la Figura 1-3, el cual consta de una sola región aceleradora, se la obtiene reemplazando las ecuaciones (10) y (12) en (2):

$$t = \frac{2*s}{\sqrt{v_o^2 + \frac{2*q*V}{m}} + v_o} + \frac{L}{\sqrt{v_o^2 + \frac{2*q*V}{m}}} \tag{13}$$

Ahora bien, debido a que los iones no tienen la misma distribución inicial de posiciones y de velocidades en MALDI, la resolución en espectrómetros de este tipo disminuye notablemente. Con el fin de minimizar los efectos de estas distribuciones en la resolución, los espectrómetros de masa por tiempo de vuelo más generales pueden tener varias etapas: aceleradoras, de vuelo libre e incluso retardadoras.

Lo que conlleva a que de la ecuación anterior se generalice en base a la misma teoría y se añadan nuevos términos, correspondientes a las nuevas etapas. Así por ejemplo, para

un espectrómetro con dos etapas aceleradoras y con reflectrón (espejo electrostático), como el que se indica en la Figura 1-6, la ecuación de tiempo de vuelo está dada por:

$$t = \frac{2d_1}{\sqrt{v_o^2 + \frac{2qV_p}{m}} + v_o} + \frac{2d_2}{\sqrt{v_o^2 + \frac{2qV_p}{m}} + \frac{2qV_a}{m} + \sqrt{v_o^2 + \frac{2qV_p}{m}}} + \frac{L}{\sqrt{v_o^2 + \frac{2qV_p}{m} + \frac{2qV_a}{m}}}$$
$$+ \frac{2d_r m}{qV_r}\sqrt{v_o^2 + \frac{2qV_p}{m} + \frac{2qV_a}{m}} \qquad (14)$$

donde

d_1	es la distancia entre el portamuestras y la grilla 1.
d_2	es la distancia entre la grilla 1 y la grilla 2
L	es la longitud de vuelo libre total ($L_1 + L_2$), donde L_1 y L_2 son las longitudes de la región de vuelo libre 1 y 2, respectivamente.
d_r	es la longitud del espejo electrostático
V_p	es el voltaje en la primera etapa aceleradora
V_a	es el voltaje en la segunda etapa aceleradora
V_r	es el voltaje en el espejo electrostático

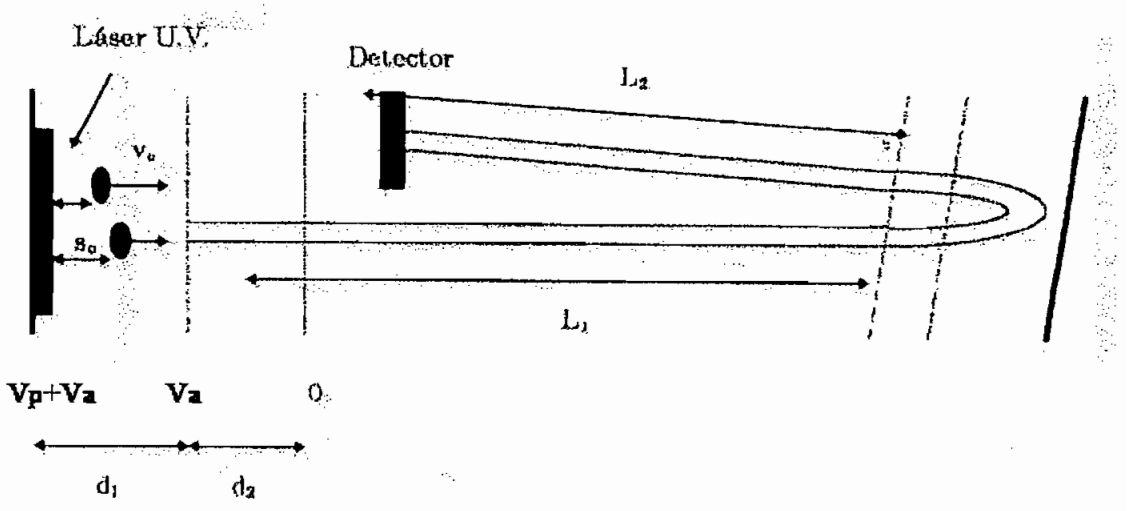


Figura 1-6 Esquema de un espectrómetro de masa MALDI TOF de dos etapas de aceleración con reflectrón

Ahora bien, calcular m/q directamente de las expresiones (13) y (14) no es una tarea fácil por lo que para simplificar la ecuación de calibración es necesario realizar algunas aproximaciones. En lo siguiente se muestran algunas alternativas.

1.3.4.4. APROXIMACIONES DE LA ECUACIÓN DE TIEMPO DE VUELO

A continuación se realiza las aproximaciones para un espectrómetro de tiempo de vuelo lineal, las cuales también pueden aplicarse para otros tipos de espectrómetro de tiempo

de vuelo, dada la similitud de las ecuaciones en cuanto a conceptos y formas, como se indicó anteriormente.

1.3.4.4.1. PRIMERA APROXIMACIÓN

Para realizar una primera aproximación de la ecuación de tiempo de vuelo para un espectrómetro de tiempo de vuelo lineal, se asume que la velocidad inicial en el instante en que se aceleran los iones es igual a cero ($v_o = 0$), por lo que la ecuación correspondiente a la ecuación (13) queda

$$t = \frac{2 * s + L}{\sqrt{\frac{2 * q * V}{m}}} \tag{15}$$

El numerador de la ecuación (15) se puede reemplazar por L_{ef}, lo que representaría una longitud efectiva del tubo de vuelo y así:

$$t = \frac{L_{ef}}{\sqrt{\frac{2 * q * V}{m}}} \tag{16}$$

Reordenando la ecuación, se puede apreciar la relación directa entre el tiempo de vuelo y la relación masa a carga (m/q)

$$t = \frac{L_{ef}}{\sqrt{2 * V}} \sqrt{\frac{m}{q}} \tag{17}$$

Si la masa se escribe en Daltons, para que esta expresión quede en unidades del Sistema Internacional, la carga como el número de cargas elementales, debemos multiplicar por un factor de corrección:

$$t = 1.021 * 10^{-24} * \frac{L_{ef}}{\sqrt{2 * V}} \sqrt{\frac{m}{z}} \quad [s] \tag{18}$$

La ecuación anterior puede verse de la forma

$$t = b * \sqrt{\frac{m}{z}} \tag{19}$$

donde b es una contante.

En esta ecuación no se está tomando en cuenta la incertidumbre en el instante inicial de impacto del láser sobre la muestra, por lo que para una mejor determinación de la masa es necesario realizar una nueva aproximación

1.3.4.4.2. SEGUNDA APROXIMACIÓN

De la observación anterior, se puede concluir que una mejor aproximación sería:

$$t = a + b * \sqrt{\frac{m}{z}} \qquad (20)$$

donde a representa la incertidumbre en el instante inicial de impacto del láser sobre la muestra.

Las constantes a y b se determinan por el tiempo inicial de registro de cada espectro y por las características geométricas del espectrómetro, respectivamente.

En esta segunda aproximación se supone que los iones son producidos en un punto sobre la superficie de la muestra, al mismo instante y sin ninguna velocidad inicial; sin embargo, los procesos de desorción y ionización son más complejos y como se mencionó antes, los iones son producidos en MALDI con una cierta distribución de velocidades iniciales, lo que produce, en primer término, un decrecimiento de la resolución (picos más anchos) y en segundo lugar, cuando la masa de las moléculas analizadas aumenta, crece la importancia de la energía cinética inicial de los iones ya que esta incide directamente en la asignación de masas a los respectivos picos.

En otras palabras, en virtud de esta energía cinética inicial, los iones llegan adelantados al tiempo supuesto, por lo que se les asigna una menor masa que la real. A bajas masas, este error es despreciable y la ecuación (20) es una buena aproximación, pero cuando la masa de las moléculas es grande el uso de dicha ecuación introduce errores sistemáticos en la determinación de las masas.

1.3.4.4.3. TERCERA APROXIMACIÓN

Está generalmente aceptado, de experimentos realizados, que la distribución inicial de velocidades para los iones en MALDI es bastante similar sin importar el tipo de molécula que se estudia[2]. Es decir, es independiente de la masa y de la carga del ion. Así, iones de péptidos o proteínas de bajo peso molecular como insulina (5734 Da) parecen ser desorbidos con la misma velocidad inicial (media) que proteínas de alto peso molecular como albúmina (66340 Da). Esta velocidad media parece estar entre 500 y 1000 m/s. También se conoce que los iones de matriz tienen una distribución inicial de velocidades con una media ligeramente superior.[2]

Una aproximación de siguiente orden en la curva de calibración, debería por lo menos introducir el efecto de esta energía cinética inicial en el tiempo de vuelo de los iones.

---

[2] Costa César, Un método sencillo para estimar las velocidades iniciales medias en MALDI (TOF) - MS, pág. 1

Un análisis más detenido de la ecuación de tiempo de vuelo puede hacerse si se trabaja con una serie de Taylor de la misma. Una serie de este tipo daría lugar una ecuación como:

$$t = a + b * \sqrt{\frac{m}{z}} + c * \frac{m}{z} + d * \left(\frac{m}{z}\right)^{\frac{3}{2}} + \ldots \qquad (21)$$

Donde se ve claramente que las dos aproximaciones anteriores (capítulos 1.4.4.1 y 1.4.4.2) corresponden a las primeras órdenes de esta expresión.

Las constantes a, b, c, d, ... son términos que se obtienen de expresiones complicadas de los parámetros geométricos y de las condiciones iniciales. Es importante recalcar que aunque a y b no depende de la energía cinética inicial de los iones, c, d, ... si lo hacen.

Dependiendo de la precisión necesaria se puede limitar el número de términos hasta incluir a aquel proporcional a c, e inclusive el siguiente. Aquí se limita al primer caso.

1.3.4.5. CALIBRACIÓN EXTERNA E INTERNA

Para determinar la relación entre t y m/z es necesario fijar los valores de las constantes a, b, c y/o d en la ecuación (21) dependiendo de la aproximación escogida. Esto se puede hacer de dos maneras.

Primero, se pueden usar las dimensiones del espectrómetro y las magnitudes de los voltajes, a esto se le conoce como *calibración externa*. En este caso se incluye también el uso de constantes medidas en un experimento previo.

Las calibraciones externas no son siempre adecuadas, ya que cualquier cambio pequeño en las condiciones del experimento puede resultar en asignamientos de masa que sean ligeramente incorrectas, produciéndose un error sistemático en la determinación de la masa.

Este problema puede ser corregido introduciendo sustancias de masas conocidas (calibrantes) dentro de la muestra a analizar, de modo que en cada espectro los picos correspondientes a dichas sustancias sirvan como referencia para determinar las constantes de calibración. A este proceso se le conoce como *calibración interna.*

Las calibraciones internas son inherentemente más precisas que las calibraciones externas; sin embargo, por ejemplo para el caso de la segunda aproximación, ecuación (20), se requiere al menos dos picos de masas exactamente conocidas en todo el espectro para la obtención de las constantes a y b, lo cual puede dificultar el arreglo.

El método más popular para la calibración interna de un espectro consiste en mezclar una proteína de masa conocida en la muestra, debido a que estas producen iones con diferentes estados de carga, usualmente z = +1 y +2, aunque pueden haber iones con carga z = +3 y +4. Esto ocasiona que se produzcan iones con predecibles valores de m/z. Así por ejemplo, para una proteína de masa M, la serie de la relación m/z de los

picos producidos son para z = 1, m/z = M+1; z = 2, m/z = (M+2)/2; z = 3, m/z = (M+3)/3, etc.. Por lo tanto, una sola proteína calibrante produce usualmente al menos dos picos que pueden ser usados para el cálculo de las constantes de calibración.

Algunas de las sustancias usadas como calibrantes son proteínas bien conocidas, entre las que se incluyen la insulina bovina (5733.6 Da), citocromo c del músculo del caballo (12170 Da), mioglobina del músculo del caballo (16951 Da), tripsinógeno bovino (23457 Da) y albúmina bovina (66341 Da), por ejemplo.

Para escoger adecuadamente los calibrantes es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones prácticas:

1) Sus masas deben ser relevantes frente a la masa de análisis. El uso de dos sustancias ambas con masas más pequeñas o más grandes que la que se analiza puede guiar a errores en el proceso.
2) Los calibrantes no deben interactuar químicamente con la sustancia a analizar.
3) Los calibrantes deben ser sustancias homogéneas tal que los *centroides* de los picos respectivos puedan ser determinados con una buena precisión.

1.3.4.6. RESOLUCIÓN Y PRECISIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE LA MASA

Como se mencionó anteriormente, la distribución de energía cinética de los iones a su arribo al detector genera un ensanchamiento de los picos del espectro de masas.

Debido a este hecho, el valor de la masa correspondiente se asigna a un punto interior del pico conocido como *centroide*, ubicado más o menos hacia la mitad del pico y que se determina mediante sencillas operaciones estadísticas, por lo tanto sujeta sujetas a variaciones o fluctuaciones, de modo que este proceso introduce cierta incertidumbre. Para disminuir esta incertidumbre usualmente se registra un buen número de espectros que mejoran la estadística y por ende la precisión.

Por esta razón, la precisión en la determinación de la masa dependerá de dos factores: de que tan bien podamos definir y separar los picos en el espectro y de la incertidumbre en la determinación del centroide del pico, donde se hace la asignación de la masa.

Para resolver y entender más claramente el problema en la determinación de la masa de un pico, se recurre a un parámetro conocido como *resolución*, el cual da la idea de cuán cerca dos picos pueden ser obtenidos en un espectro antes de volverse indistinguibles. En otras palabras, es una medida de la capacidad del instrumento para producir señales separadas de iones de similar masa.

La resolución en tiempo, para un pico dado, se la determina mediante la relación:

$$R = \frac{t}{2 * \Delta t} \tag{22}$$

donde t es el tiempo de vuelo correspondiente al centroide del pico y Δt es el ancho del pico medido a la mitad de la amplitud máxima del pico (fwhm). Ver Figura 1-7.

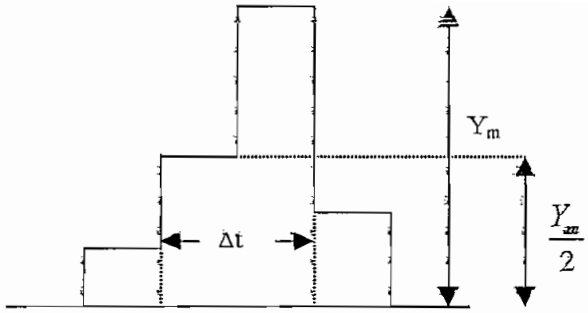


Figura 1-7 Resolución de un pico

De la segunda expresión de aproximación de la ecuación de tiempo de vuelo (20), la resolución puede ser determinada también como:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \tag{23}$$

donde m es la masa correspondiente al centroide del pico y Δm es el ancho del pico medido a la mitad de la amplitud máxima del pico.

Vale mencionar que el ancho de banda y la longitud del registro del osciloscopio digital imponen el límite final a la resolución obtenida.

Dado que la resolución está afectada principalmente por la distribución inicial de posiciones y velocidades, se han desarrollado algunos métodos para minimizarlos, entre los cuales están los siguientes:

1.3.4.6.1. ESPEJO ELECTROSTÁTICO O REFLECTRÓN

Es un aparato que se le añade al espectrómetro después de una región de vuelo libre que permite enviar a los iones de vuelta hacia una segunda región de vuelo libre. (Figura 1-8).

El fundamento físico de su uso es el siguiente: los iones con mayor energía cinética llegan más rápido al reflectrón y penetran más profundamente en el campo eléctrico, por lo que permanecen por más tiempo en él. En cambio, los iones con menor energía cinética no penetran mucho y salen más rápido.

Ajustando el campo eléctrico en el espejo electrostático se logra una compensación, de modo que todos los iones con la misma masa llegan al mismo tiempo al plano donde está el detector.

Esta corrección es independiente de la masa de los iones.

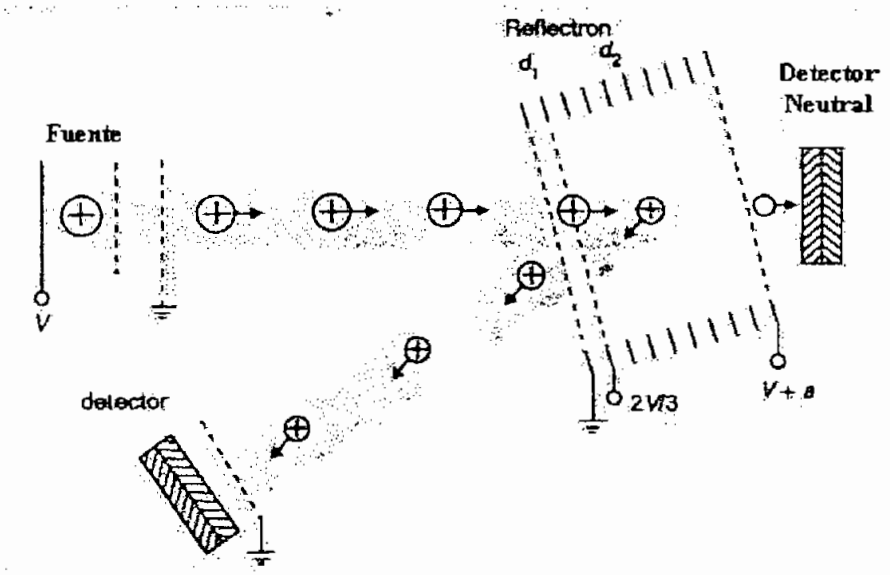


Figura 1-8 Esquema de un espectrómetro de masas MALDI TOF con reflectrón.

1.3.4.6.2. EXTRACCIÓN RETARDADA

Tiene por objeto corregir el efecto de la distribución inicial de velocidades, y consiste en activar el campo eléctrico de aceleración en la fuente un tiempo después del impacto del láser. (Figura 1-9).

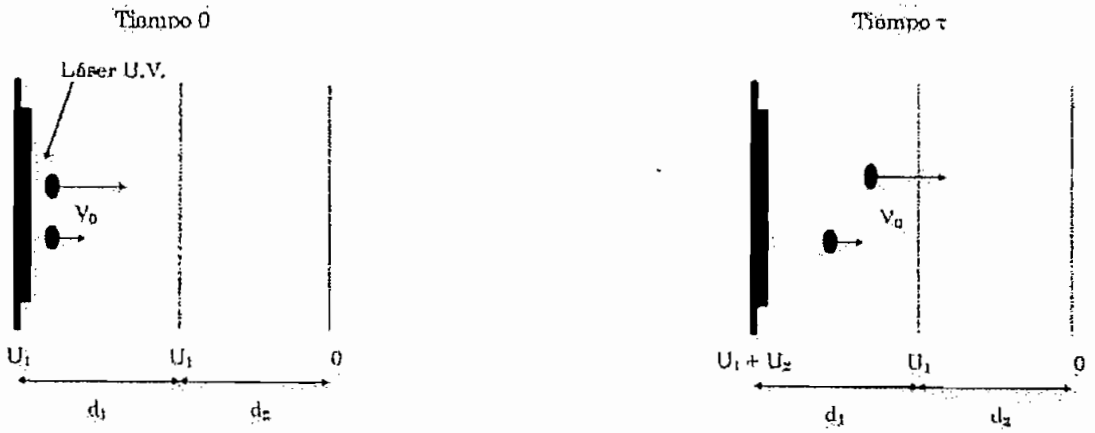


Figura 1-9 A la izquierda se muestran a los iones formados con diferente velocidad inicial luego del impacto del láser. A la derecha se muestra que los iones después de un tiempo τ han recorrido libremente cierta distancia en la fuente.

El efecto que esto produce es el siguiente: los iones se forman con diferente velocidad inicial y durante el tiempo que el campo eléctrico es nulo recorren libremente una distancia en la fuente del espectrómetro. Los iones que tienen mayor velocidad recorren mayor distancia y al activar el campo eléctrico adquieren menor energía cinética, mientras que los iones con menor velocidad recorren menor distancia y reciben mayor

energía cinética. Si se ajustan convenientemente los voltajes de aceleración y el tiempo de retardo, la mayoría de los iones llegarán simultáneamente al plano donde el detector será colocado.

Sin embargo, el tiempo óptimo de retardo es dependiente de la masa, por lo que se lo debe determinar del rango de masas donde se va a trabajar.

1.3.5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS TOF MALDI

Algunas ventajas de esta técnica son:

- Ilimitado rango de masas
- Preparación rápida y sencilla de muestras
- Tiempo de adquisición de datos muy corto que permite una alta tasa de repetición
- Alta transmisión entre ionización y detección
- Detección multicanal del espectro de masas (vista panorámica).

Como desventajas están:

- Iones de la matriz interfieren en el rango de masas bajo.
- Baja repetibilidad de la muestra, lo que obliga a acumular varios espectros con el fin de mejorar la calidad y la estadística del resultado.
- Niveles altos de background obligan también a acumular varios espectros.

CAPÍTULO 2

DETECCIÓN DE IONES Y ADQUISICIÓN DE DATOS

En este capítulo primeramente se hace una breve mención de todos los instrumentos y partes que son importantes para el análisis, la detección y la recolección de los espectros.

El espectrómetro construido en el Departamento de Física de la Facultad de Ciencias es del tipo de tiempo de vuelo con técnica MALDI (TOF MS) y se caracteriza por ser un espectrómetro lineal con una sola etapa de aceleración. El siguiente diagrama de bloques muestra el esquema del espectrómetro.

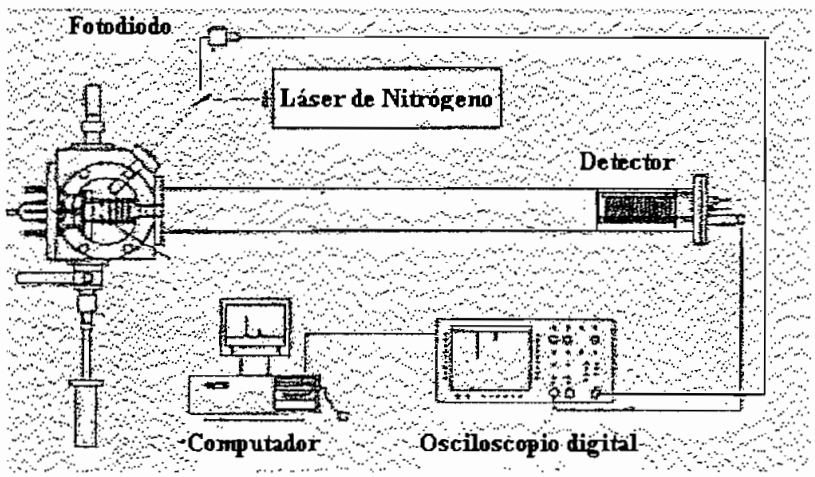


Figura 2-1 Diagrama de bloques de un espectrómetro de masas TOF MS

Como se puede apreciar en el diagrama, el sistema de detección de iones y adquisición de los espectros arranca con el disparo de un pulso láser sobre la muestra, produciéndose la vaporización e ionización de las moléculas que debido a su relación masa a carga se separan en paquetes y arriban al detector en una secuencia creciente. En el detector, el flujo de los iones se convierte a una corriente proporcional eléctrica, la cual es mostrada en un osciloscopio y enviada a su vez aun computador para el procesamiento de datos.

2.1. LÁSER ULTRAVIOLETA

En calidad de fuente de energía luminosa para producir la desorción de las moléculas a ser analizadas se emplea un láser ultravioleta de longitud de onda adecuada. Para este caso el láser utilizado es de nitrógeno de la marca Science, que genera pulsos de 3 ns en la longitud de onda de 337.1 nm con una tasa de repetición de 1 a 20 Hz.

2.2. CIRCUITO DE DISPARO DE INICIO DE COLECCIÓN DE ESPECTROS

Para la asignación correcta del tiempo de vuelo de los diferentes picos que aparecen en un espectro de masas, es necesario contar con una señal de disparo de inicio confiable, que indique al osciloscopio en que momento se ha producido el disparo del pulso láser.

Para tal efecto cuando se dispara el láser, una pequeña parte del rayo (≈ 5%) es enviada a un fotodiodo de respuesta rápida (tiempo de ascenso menor a 1 ns), sensible a la luz del láser, generando un pulso que coincide prácticamente con el disparo del láser.

Dicho pulso es enviado como señal de disparo en el osciloscopio.

2.3. DETECTOR DE PLACAS DE MICROCANALES (MCP)

El detector de iones consiste de dos placas paralelas llamadas Placas de Microcanales (MCP), las cuales funcionan bajo el principio de multiplicación de electrones.

Cada placa está conformada por millones de pequeños orificios, similar a la estructura de un "panal de miel de abeja", como se puede apreciar en la Figura 2-2.

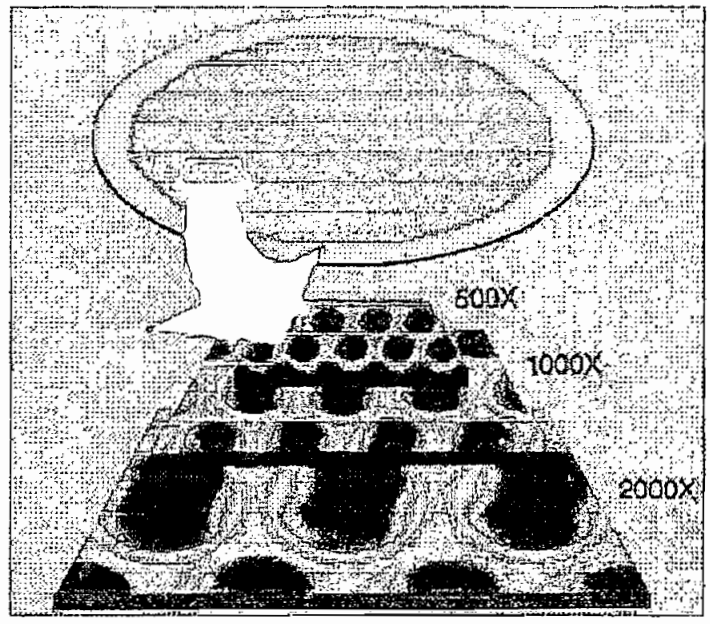


Figura 2-2 Características de un MCP

Cada orificio funciona como un solo canal multiplicador de electrones, relativamente independiente de sus canales adyacentes.

Las dimensiones de los canales se determinan principalmente por consideración de resolución, ya que existe una relación inversa entre estas. Usualmente el diámetro de los canales es de 8, 12 o 25 μm. En este caso tenemos 12 μm, con una separación entre los centros de 10 μm.

Cuando una partícula cargada o fotón incide en la entrada de un canal, electrones secundarios son generados y acelerados por el canal hacia su extremo final. Si estos electrones secundarios chocan con las paredes del canal, electrones adicionales son generados y así sucesivamente. Produciéndose una ganancia electrónica de 10^4 electrones a la salida de un canal recto de un MCP y de 10^6 electrones si el canal es encorvado. Las señales de salida son recolectadas típicamente por medio de un ánodo metálico. El proceso de multiplicación electrónica se ilustra en la Figura 2-3.

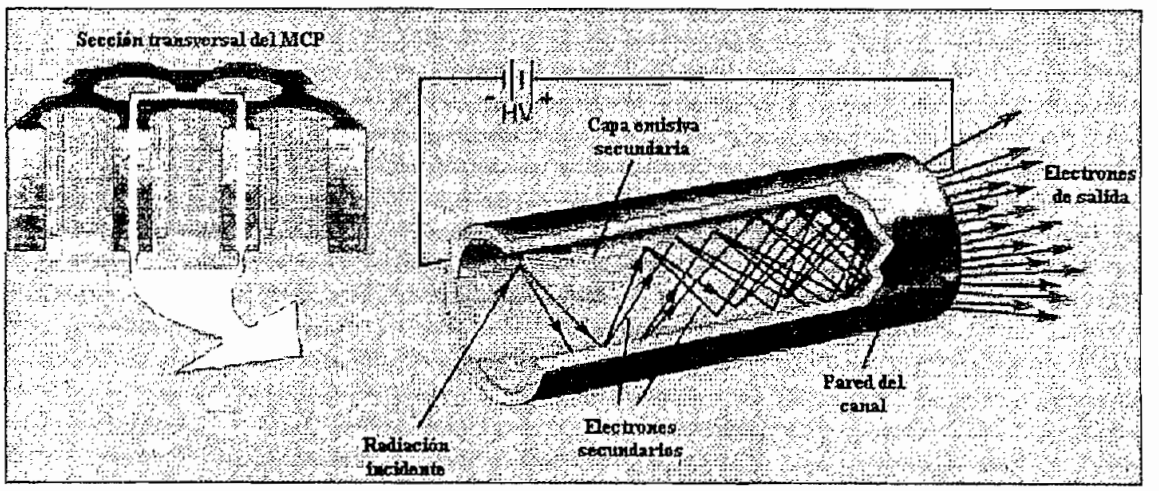


Figura 2-3 Multiplicación de electrones en un MCP

Para que los electrones iniciales se muevan y sean capaces de producir electrones secundarios, es necesario dotarlos de energía cinética suficiente por lo que la placa de microcanales debe someterse a una diferencia de potencial conveniente.

La disposición de sucesivas placas, polarizadas, aumenta la sensibilidad y la amplificación. Si dos o más MCPs de canales rectos son colocadas en serie, un solo evento puede generar un pulso aproximado de 10^7 electrones. Por lo que, usualmente, se ponen dos placas una a continuación de la otra.

Para evitar un problema de carga excesiva del ánodo metálico, que introduce una señal de saturación al recibir los electrones producidos por iones livianos, es necesario proveerlo de un drenaje, el cual no es más que una resistencia en paralelo a tierra. El valor de esta resistencia se escoge tal que sea menor a la resistencia de la punta de prueba del osciloscopio, pero no tan pequeña como para drenar excesivamente la carga del ánodo. A continuación se representa el esquema de polarización del detector:

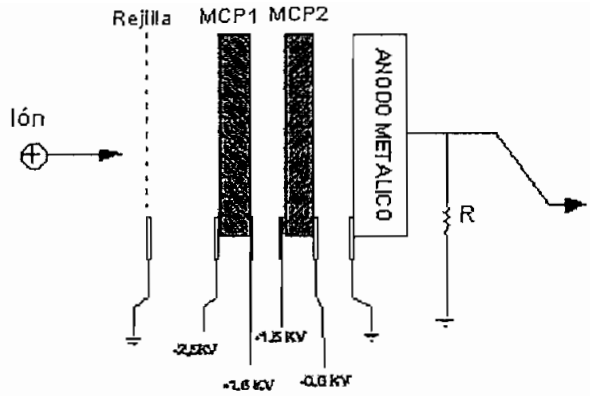


Figura 2-4 Esquema de polarización del detector

2.4. OSCILOSCOPIO

El osciloscopio es básicamente un dispositivo de visualización gráfica que muestra señales eléctricas variables en el tiempo. El eje vertical representa el voltaje mientras que el eje horizontal representa el tiempo.

Los osciloscopios pueden ser de dos tipos: analógicos ó digitales. Los primeros trabajan directamente con la señal aplicada, ésta una vez amplificada desvía un haz de electrones en sentido vertical proporcionalmente a su valor. En contraste los osciloscopios digitales utilizan previamente un conversor analógico-digital (A/D) para almacenar digitalmente la señal de entrada, reconstruyendo posteriormente esta información en la pantalla.

Ambos tipos tienen sus ventajas e inconvenientes. Los analógicos son preferibles cuando es prioritario visualizar variaciones rápidas de la señal de entrada en tiempo real. Los osciloscopios digitales se utilizan cuando se desea visualizar y estudiar eventos no repetitivos.

A continuación se describe una tabla de comparación entre estos dos tipos:

Analógico	Digital
Análisis visual en el dominio del tiempo	Análisis computarizado automático en el dominio del tiempo o frecuencia
Ajuste manual de los controles	Ajuste automático y remoto de los controles
No existe la posibilidad de enviar los datos a un computador	Lectura de los datos desde un computador
Almacenamiento de datos en un film polaroid	Almacenamiento de datos en diskettes o por impresora
Datos volátiles	Datos no volátiles

Tabla 2-1 Comparación entre los dos tipos de osciloscopios: analógicos y digitales

Del cuadro anterior se aprecia que la diferencia radical entre un osciloscopio analógico y un osciloscopio digital es que este último posee un sistema adicional de proceso de datos que permite almacenar la señal y enviar los datos a un computador.

Ahora bien, debido a la necesidad de que los datos provenientes del detector del espectrómetro a más de ser visualizados sean enviados a un computador para su respectivo análisis, se recurre a la utilización de osciloscopios digitales.

2.4.1. OSCILOSCOPIOS DIGITALES

Para entender el funcionamiento de un osciloscopio digital es necesario detenerse un poco en los procesos internos llevados a cabo por este aparato. A continuación se describe dicho proceso:

Cuando se conecta la sonda de un osciloscopio digital a un circuito (ver Figura 2-5), la señal atraviesa esta última y se dirige a la sección vertical. Dependiendo de donde se sitúe el mando del amplificador vertical se atenuará o amplificará.

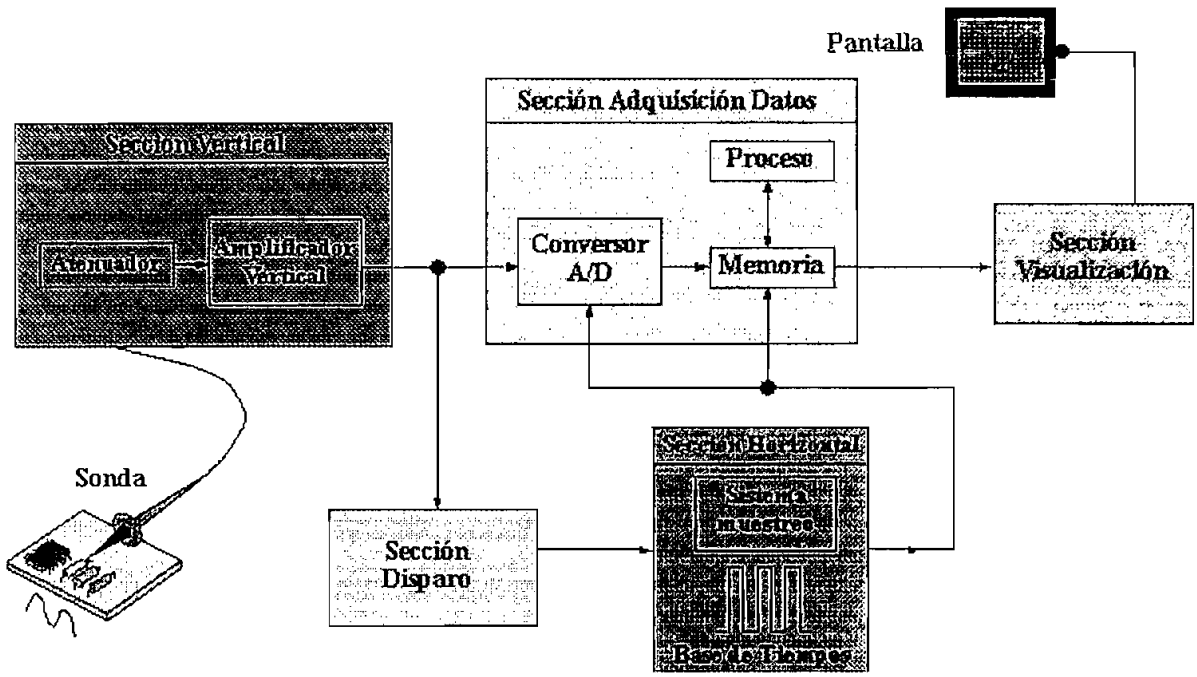


Figura 2-5 Funcionamiento de un osciloscopio digital

El conversor analógico-digital del sistema de adquisición de datos hace un muestreo de la señal a intervalos de tiempo determinados y convierte la señal de voltaje continua en una serie de valores digitales llamados *muestras*. En la sección horizontal una señal de reloj determina cuando el conversor A/D toma una muestra. La velocidad de este reloj se denomina velocidad de muestreo y se mide en muestras por segundo.

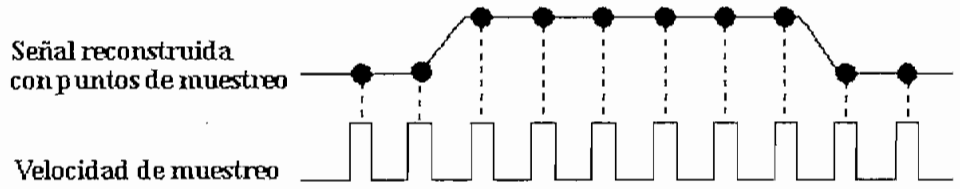


Figura 2-6 Reconstrucción de una señal

Los valores digitales muestreados se almacenan en una memoria como puntos de señal. El número de los puntos de señal utilizados para reconstruir la señal en pantalla se denomina *registro*. La sección de disparo determina el comienzo y el final de los puntos de señal en el registro. La sección de visualización recibe estos puntos del registro, una vez almacenados en la memoria, para presentar en pantalla la señal.

Todos las perillas y botones del panel frontal son constantemente monitoreados por el procesador interno y los parámetros son rápidamente reconfigurados. El procesador también controla la unidad del pórtico de control remoto GPIB, así como el pórtico RS-232-C, los cuales son usados para dirigir la interfaz del osciloscopio a un terminal remoto.

Dependiendo de las capacidades del osciloscopio se pueden tener procesos adicionales sobre los puntos muestreados, incluso se puede disponer de un predisparo, para observar procesos que tengan lugar antes del disparo.

2.4.1.1. PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE UN OSCILOSCOPIO DIGITAL

Los términos definidos en esta sección permiten comparar diferentes modelos de osciloscopios digitales disponibles en el mercado.

ANCHO DE BANDA

Especifica el rango de frecuencias en las que el osciloscopio puede digitalizar la señal adecuadamente. Por convenio el ancho de banda se calcula desde 0Hz (continua) hasta la frecuencia a la cual una señal de tipo senoidal se visualiza a un 70.7% del valor aplicado a la entrada (lo que corresponde a una atenuación de 3dB).

TIEMPO DE SUBIDA

Es otro de los parámetros que nos dará, junto con el anterior, la máxima frecuencia de utilización del osciloscopio. Es un parámetro muy importante si se desea medir con fiabilidad pulsos y flancos. Un osciloscopio no puede visualizar pulsos con tiempos de subida más rápidos que el suyo propio.

Se lo determina por medio de la fórmula:

$$t_r = \frac{0.35}{f_b} \tag{24}$$

donde

t_r es el tiempo de subida en nanosegundos (ns)
f_b es el ancho de banda en gigahertz (Gz)

SENSIBILIDAD VERTICAL

Describe el más pequeño cambio en la señal de voltaje de entrada que el conversor A/D puede capturar. Se suele proporcionar en mV por división vertical.

VELOCIDAD DE MUESTREO

Indica cuantas muestras por segundo es capaz de tomar el sistema de adquisición de datos (especificamente el conversor A/D). En los osciloscopios de calidad se llega a velocidades de muestreo de Megamuestras/seg. Una velocidad de muestreo grande es importante para poder visualizar pequeños periodos de tiempo. En el otro extremo de la escala, también se necesita velocidades de muestreo bajas para poder observar señales de variación lenta. Generalmente la velocidad de muestreo cambia al actuar sobre el mando TIMEBASE.

RESOLUCIÓN VERTICAL

Se mide en bits y es un parámetro que da la resolución del conversor A/D del osciloscopio digital. Indica con que precisión se convierten las señales de entrada en valores digitales almacenados en la memoria. Técnicas de cálculo pueden aumentar la resolución efectiva del osciloscopio.

LONGITUD DEL REGISTRO

Indica cuantos puntos se memorizan en un registro para la reconstrucción de la forma de onda. Algunos osciloscopios permiten variar, dentro de ciertos límites, este parámetro. La máxima longitud del registro depende del tamaño de la memoria de que disponga el osciloscopio. Una longitud del registro grande permite realizar zooms sobre detalles en la forma de onda de forma muy rápida (los datos ya han sido almacenados). Sin embargo, esta ventaja es a costa de consumir más tiempo en muestrear la señal completa.

Los osciloscopios digitales utilizados para la adquisición de datos en este espectrómetro son:

- Tektronix TDS 360
- LeCroy 9450A

En la Tabla 2-2 se describe las características más importantes de estos osciloscopios digitales:

Osciloscopio	Tektronix	LeCroy
Número de canales	2	2
Rango de escala horizontal	2.5 ns a 5 seg (en secuencia de 1-2.5-5)	1 ns/div a 5000 s/div [1] (en secuencia de 1-2-5)
Ancho de banda (MHz)	200	300
Tiempo de subida (ns)	1.75	1.17
Sensibilidad vertical	2mV/div a 10V/div	5mV/div a 2V/div
Velocidad de muestreo	10 muestras/seg. a 1 Gigamuestras/seg. en secuencia (1-2-5)	1 muestra/seg. a 400 Megamuestras/seg. [2]
Resolución vertical (bits)	8	8
Longitud del registro	1000	40 a 50000 [3]

Tabla 2-2 Características importantes de los osciloscopios digitales utilizados

[1] De 1 ns a 5 ns trabaja sólo en modo RIS (Random Interleaved Sampling)
[2] Estos valores se obtienen si se trabaja en modo SS (Single Shot), en RIS se llega hasta 10 Gigamuestras/seg.
[3] La longitud del registro depende de la escala del tiempo.

2.4.1.2. CONTROL REMOTO DEL OSCILOSCOPIO DIGITAL

Dos modos de operación son disponibles en el osciloscopio. El instrumento puede ser operado manualmente, usando los controles del panel, o remotamente por medio de un controlador externo (usualmente un computador).

La Tabla 2-3 describe como el modelo de control remoto difiere del control del osciloscopio usando el panel frontal.

CONTROL REMOTO	CONTROL MANUAL
Se puede acceder a todos los controles a la vez	Solo se puede cambiar los controles que son accesibles en el menú actual.
Se tiene más control sobre algunas características que están disponibles en el control remoto.	Se tiene menos control sobre algunas características que están disponibles en el control remoto

Tabla 2-3 Comparación entre el control remoto y el control manual de un osciloscopio digital

El osciloscopio puede ser controlado remotamente ya sea a través de la interfaz GPIB (General Purpose Interface Bus) o por vía serial RS-232. La interfaz GPIB es un bus paralelo de 8 bits que provee una alta velocidad en la transferencia de datos y el control

de múltiples instrumentos. En contraste, la interfaz RS-232 es un bus de datos serial de baja velocidad, pero con la ventaja en el costo de los controladores.

La necesidad de que los espectros adquiridos por medio del osciloscopio digital sean enviados al computador para su respectivo análisis con una alta tasa de velocidad en la transferencia de la información (para nuestro caso el pulso láser puede generarse con una velocidad máxima de 20 Hz, lo que equivale a que cada 50 ms se genere un nuevo espectro), hace que la opción de la interfaz GPIB sea la más adecuada.

2.5. TARJETA DE ADQUISICIÓN DE DATOS (GPIB)

La norma 488.1-1987 de la ANSI/IEEE, también conocida como GPIB (General Purpose Interface Bus) describe una interfaz estándar para la comunicación entre instrumentos y controladores de varios fabricantes. El GPIB es una interfaz digital de 8 bits de comunicación paralela con una tasa de transferencia de datos superior a 1 MB/s. El bus soporta un Controlador del Sistema, usualmente un computador, y un máximo de 14 instrumentos adicionales. La norma 488.2-1987 de la ANSI/IEEE se extiende a IEEE 488.1 para definir un protocolo de comunicación del bus, un conjunto común de códigos y formatos de los datos, y un conjunto genérico de comandos comunes de los aparatos.

2.5.1. OPERACIÓN DEL GPIB

A continuación se describe los conceptos básicos para comprender la operación del GPIB, sus características físicas y eléctricas, así como sus requerimientos de configuración.

2.5.1.1. TIPOS DE MENSAJES

Los instrumentos GPIB se comunican entre sí enviando "device-dependent messages" e "interface messages" por medio del sistema de interfaz.

- Los device-dependent messages, llamados frecuentemente *datos* o *mensajes de datos*, contienen información específica del aparato, tal como instrucciones de programación, resultados de medidas, estado de la máquina y datos de las formas de onda.

- Los interface messages manejan el propio cable de interconexión. Usualmente son llamados *comandos* o *mensajes de comando* y ejecutan tareas tales como inicializar el bus, direccionar y des-direccionar instrumentos y poner los dispositivos en modo de programación remota o local.

No hay que confundir el término "comando" usado aquí con algunas instrucciones del instrumento, las cuales también suelen llamarse comandos. Estas instrucciones específicas del instrumento son realmente mensajes de datos.

2.5.1.2. TALKERS, LISTENERS Y CONTROLLERS

Los dispositivos GPIB pueden ser Talkers, Listeners, y/o Controllers. Un Talker envía mensajes de datos a uno o más Listeners, los cuales reciben los datos. El Controller maneja el flujo de información en el bus. Este define los vínculos de comunicación y envía comandos GPIB a los instrumentos.

Algunos instrumentos son capaces de cumplir más de un rol. Un voltímetro digital, por ejemplo, puede ser un Talker y un Listener.

El rol del Controller GPIB es comparable al rol del CPU en un computador, pero una mejor analogía es comparar al Controller con el conmutador central del sistema telefónico de una ciudad.

El conmutador central (Controller) monitorea las comunicaciones de la red (GPIB). Cuando la central (Controller) nota que un individuo (instrumento) quiere hacer una llamada (enviar un mensaje de datos), conecta el visitante (Talker) al receptor (Listener).

El Controller usualmente direcciona (o habilita) al Talker y al Listener antes de que el Talker pueda enviarle su mensaje al Listener. Después de que el mensaje es transmitido, el Controller puede des-direccionar ambos instrumentos.

Un computador equipado con tarjeta de adquisición GPIB y el software NI-488.2 instalado puede ejecutar los tres roles:

- Controller - manejar el bus GPIB
- Talker - enviar datos
- Listener - recibir datos

2.5.1.3. DIRECCIONAMIENTO GPIB

Todos los instrumentos conectados al GPIB deben ser asignados a una única dirección GPIB. El Controller usa esta dirección para identificar a cada instrumento cuando envía o recibe datos.

La dirección es un número en el rango de 0 a 30. El Controller usa esta dirección para formar una dirección de hablante u oyente que es enviada por el GPIB cuando se comunica con un instrumento.

Una dirección de Talker se determina estableciendo el bit 6, esto es, el bit TA (Talk Active) de la dirección del GPIB. Una dirección de Listener se determina estableciendo el bit 5, esto es, el bit LA (Listen Active) de la dirección del GPIB. Por ejemplo si un instrumento está en la dirección 1, el Controlador envía el 41H (dirección 1 con el bit 6 establecido) para volver al instrumento un Talker. A causa de que el Controller está usualmente en la dirección 0, este envía el 20H (dirección 0 con bit 5 establecido) para hacerse a sí mismo un Listener. La siguiente tabla muestra la configuración de los bits de dirección del GPIB.

Posición del Bit	7	6	5	4	3	2	1	0
Significado	0	TA	LA	Dirección GPIB (rango de 0 - 30)				

Tabla 2-4 Bits de dirección del GPIB

2.5.1.4. SEÑALES Y LÍNEAS DEL GPIB

El sistema de interfaz GPIB consiste de 16 líneas de señal y 8 de retorno de tierra. Las 16 líneas de señal son divididas en tres grupos (ver Figura 2-7):

- Ocho líneas de datos
- Tres líneas de "handshake"
- Cinco líneas de manejo de la interfaz

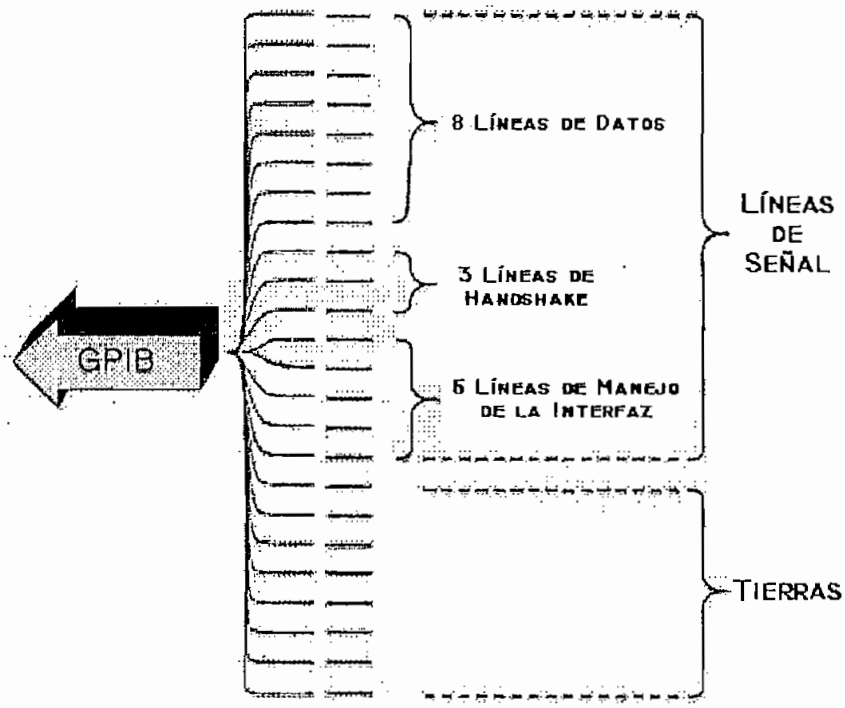


Figura 2-7 Señales y Líneas del GPIB

2.5.1.4.1. LÍNEAS DE DATOS

Las ocho líneas de datos, desde la DIO1 hasta la DIO8, llevan ambos datos y comandos. El estado de la línea de atención (ATN) determina si la información es dato o comando.

2.5.1.4.2. LÍNEAS DE HANDSHAKE

Tres líneas controlan asincrónicamente la transferencia de los bytes de mensaje entre los instrumentos. Este proceso garantiza que los bytes de mensaje en las líneas de datos sean enviados y recibidos sin error de transmisión.

- NRFD (not ready for data)

Indica si un dispositivo Listener está listo o no para recibir un byte de mensaje. Esta línea es establecida por todos los instrumentos cuando reciben comandos y por Listeners cuando reciben datos.

- NDAC (not data accepted)

Indica cuando un instrumento Listener ha aceptado o no un byte de mensaje. Esta línea es establecida por todos los instrumentos cuando reciben comandos y por Listeners cuando reciben datos.

- DAV (data valid)

Indica si las señales en las líneas de datos son datos estables (válidos). El Controller establece el DAV cuando envía comandos, y el Talker establece el DAV cuando envía datos.

2.5.1.4.3. LÍNEAS DE MANEJO DE LA INTERFAZ

Cinco líneas manejan el flujo de información a través de la interfaz.

- ATN (ATteNtion)

El Controller establece el ATN en verdadero cuando éste usa las líneas de datos para enviar comandos y establece el ATN en falso cuando un Talker puede enviar datos.

- IFC (InterFace Clear)

El Controller establece la línea de IFC en verdadero para inicializar el bus.

- REN (Remote ENable)

El Controller usa esta línea para colocar a los instrumentos en modo de programación remota o local.

- SRQ (Service ReQuest)

Cualquier instrumento puede establecer la línea SRQ en verdadero para requerir servicio asincrónicamente desde el Controller. Es equivalente a una línea de interrupción en el bus de un computador.

- EOI (End Or Identify)

Esta línea tiene dos propósitos. El Talker usa EOI para marcar el fin de una cadena de mensaje. El Controller usa la línea EOI cuando dirige un parallel poll.[1]

2.5.1.5. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y ELÉCTRICAS

Usualmente se conectan los instrumentos con un cable protegido de 24 conductores, cada extremo consta de un enchufe y un receptor del enchufe. Ver Figura 2-8.

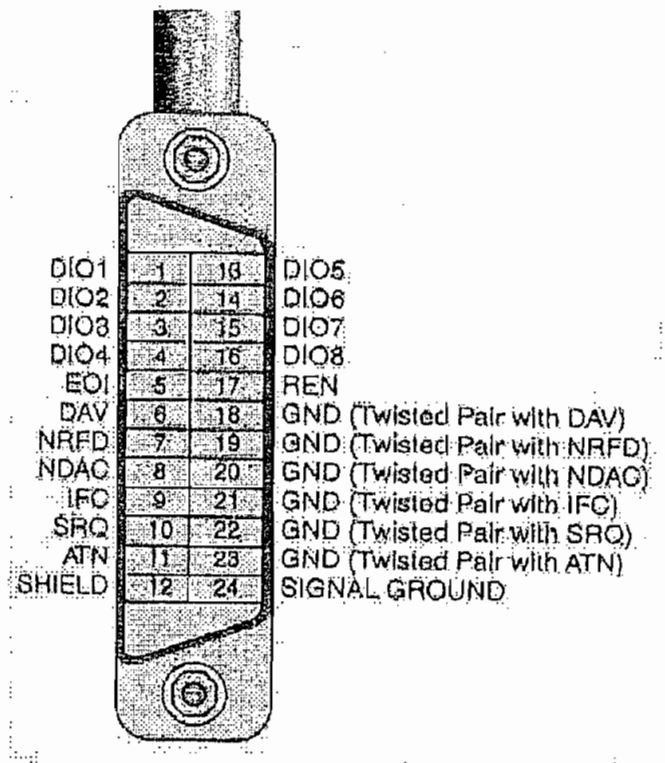


Figura 2-8 Conector GPIB y asignación de señales

El GPIB usa lógica negativa con niveles TTL estándares. Cuando el DAV es verdadero, por ejemplo, éste está en el nivel bajo TTL (≤ 0.8 V), y cuando el DAV es falso, está en el nivel alto TTL (≥ 2.0 V).

[1] En paralell poll, el Controller simultáneamente lee el bit Individual Status (IST) de todos los instrumentos para determinar cual de ellos necesita servicio. Para mayor información referirse a NI-488.2™ User Manual for MacOs, Capítulo 5.

2.5.1.6. REQUERIMIENTOS DE CONFIGURACIÓN

Para lograr un alto porcentaje en la transferencia de datos para el cual fue diseñado el GPIB, se debe limitar las distancias físicas entre los instrumentos y el número de instrumentos en el bus. Las siguientes restricciones son típicas:

- Asignar una única dirección para cada instrumento en el bus.
- La longitud del cable debe ser menor a dos metros.
- No conectar más de 15 instrumentos a un solo bus.

2.5.1.7. SOFTWARE DE MANEJO DEL GPIB (NI-488.2)

El software NI-488.2 controla el flujo de comunicación en el GPIB y comprende una serie de componentes, los cuales se detallan a continuación. Este software debe permanecer residente en el sistema del computador.

- **Configuration utility.** Es usado para editar los recursos de hardware y los parámetros que la tarjeta de interfaz usa en la comunicación con otros instrumentos, tales como: dirección primaria y secundaria del GPIB, modo de terminación de lectura y escritura y límite del tiempo-fuera en la transferencia de datos. Un ejemplo de esta configuración se muestra en la Figura 2-9.

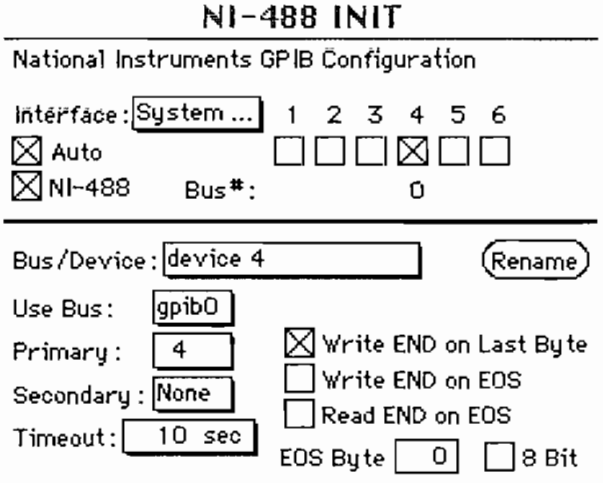


Figura 2-9 Ejemplo de configuración de una tarjeta GPIB

- **Interactive control utility.** Es un software poderoso de herramientas desarrolladas para el control del instrumento desde el teclado del computador.

- **NI-488.2 software monitor utility.** Ayuda en la depuración de las aplicaciones de monitoreo, despliegue y registro realizadas por el usuario.

- **Languaje interface libraries.** Ayuda al usuario a implementar aplicaciones NI-488.2 usando varios lenguajes de programación populares.

- **GPIB diagnostic utility.** Verifica la instalación del hardware y software NI-488.2

El software NI-488.2 automáticamente ejecuta todas las operaciones del manejo del bus necesarias para la comunicación con otros instrumentos. La Figura 2-10 muestra como el software NI-488.2 trabaja con el sistema.

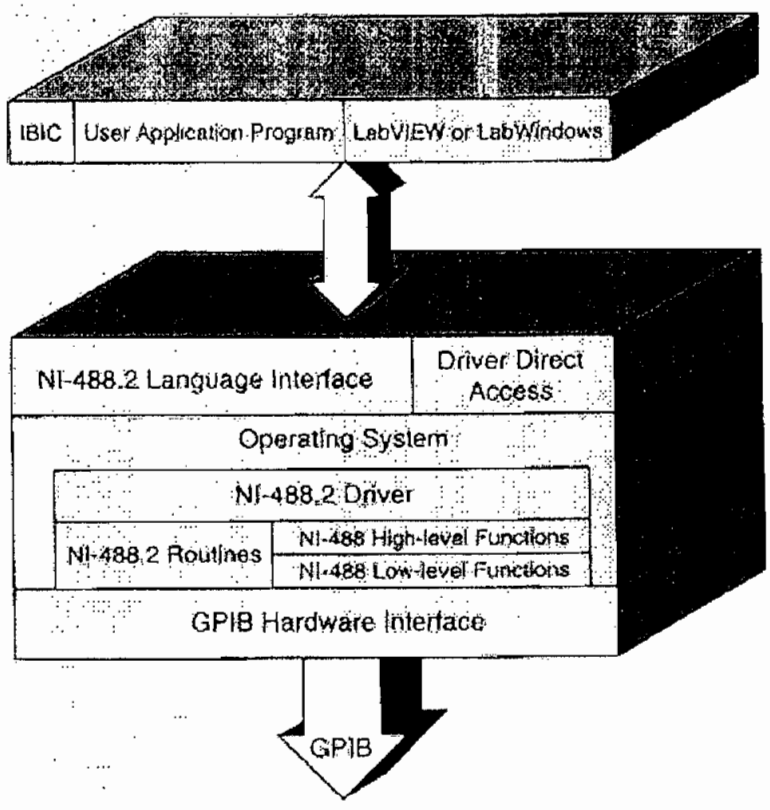


Figura 2-10 Coordinación entre el Software NI-488.2 y el Sistema Operativo

2.6. TARJETA DE INTERFAZ NUBUS

Debido a que el computador con el cual se realiza la adquisición y manipulación de los datos provenientes del osciloscopio es un computador Power Macintosh 7100, provisto sólo de interfaces de tipo NuBus, se seleccionó la tarjeta NB-GPIB/TNT la cual a más de corresponder al tipo de interfaz NuBus, cumple con el tamaño del slot requerido.

2.6.1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LA TARJETA NB-GPIB/TNT

El NB-GPIB/TNT es una tarjeta de interfaz IEEE 488 para computadoras equipadas con el NuBus que corren bajo el sistema operativo Mac OS entre las que se incluyen las computadoras Macintosh, Power Macintosh y compatibles. El chip TNT4882C en esta tarjeta ejecuta las funciones básicas de la IEEE 488 que son: Talker, Listener y

Controlador. Esta tarjeta puede mantener porcentajes en la transferencia de datos de 1.3 MB/s. Sus dimensiones son de 27.305 cm por 10.16 cm. Su costo es de $650.

En cuanto a la descripción del software, NI-488.2, que viene incluido con la tarjeta, este es exclusivo para Mac OS y ocupa un espacio de 1.5 MB en el disco duro. El software comprende un conjunto de componentes que transforman al computador Macintosh en un Controller GPIB.

El software recomendado para realizar aplicaciones con esta tarjeta es LabVIEW.

2.7. PLATAFORMA DE PROGRAMACIÓN

Como se mencionó anteriormente, el software NI-488.2 contiene funciones de librerías para los más populares lenguajes de programación, tales como Basic, C++ y Visual Basic. Aunque para incrementar la productividad y la facilidad de uso, la casa fabricante recomienda el uso de LabVIEW, un excelente ambiente de programación gráfica para instrumentación, el cual contiene librerías GPIB para el control de instrumentos.

LabVIEW es una innovadora metodología de programación. Se caracteriza porque mientras los programas tradicionales tales como BASIC o C se basan en líneas de texto para crear programas, LabVIEW usa un lenguaje de programación gráfico (G) que permite crear programas en forma de diagramas de bloques.

LabVIEW es un lenguaje de programación de propósito general, pero también incluye librerías de funciones y herramientas desarrolladas específicamente para la adquisición de datos y el control de instrumentos. Por lo que con LabVIEW se puede desarrollar un sistema completo de instrumentación en el que se adquiera, analice y presente datos.

Así por ejemplo: se puede acceder a librerías que permiten controlar y adquirir datos desde instrumentos GPIB, VXI, RS-232 y tarjetas de adquisición de datos (DAQ). Después, por medio de librerías de análisis permitir que los datos adquiridos se conviertan en resultados significativos, para finalmente presentarlos a través de paneles frontales interactivos. También se tienen numerosas opciones para el manejo de datos como almacenamiento de datos en disco o envío de datos a impresoras.

2.7.1. LOS INSTRUMENTOS VIRTUALES EN LABVIEW (VIs)

Los programas realizados en LabVIEW son llamados instrumentos virtuales (VIs) debido a que su apariencia y funcionamiento son similares a la de los instrumentos reales. Por otro lado, los VIs son similares a las funciones de los lenguajes de programación convencionales.

Un VI está estructurado por:

- La interfaz interactiva para el usuario llamada *Panel Frontal*, a causa de su similitud con el panel de un instrumento físico. El panel frontal puede contener perillas, botones, gráficos y otros controladores e indicadores.

- Una región en la que se construyen las instrucciones en G llamada *Diagrama de Bloques*. El diagrama de bloques es la solución pictórica a un problema. También es el código fuente para el VI.

- Debido a que los VIs son jerárquicos y modulares, estos pueden ser usados como subrutinas dentro de otros programas. Un VI, cuando se lo usa dentro de otro VI, se llama subVI. *El icono y los conectores del icono* sirven para representar al subVI y para permitir el flujo de información con otros VIs, respectivamente.

2.7.2. CONTROL DE INSTRUMENTOS

Como se mencionó anteriormente, una de las características más importantes de LabVIEW es el hecho de contener librerías de funciones y herramientas desarrolladas específicamente para controlar y adquirir datos desde instrumentos GPIB, VXI, RS-232 y tarjetas de adquisición de datos (DAQ).

Adicionalmente, para el control y adquisición de datos desde instrumentos GPIB, VXI y RS-232, se cuenta con la librería Instrument Driver que contiene *controladores* para más de 600 instrumentos de más de 65 fabricantes, disponible en el mismo CD de LabVIEW.

2.7.2.1. INSTRUMENT DRIVER (CONTROLADORES)

Un instrument driver (controlador) es un conjunto de VIs que permiten realizar el control de un instrumento programable. Cada VI corresponde a una operación de programación, como configuración, lectura, escritura, o activación del instrumento. Los instrument driver simplifican el control del instrumento ya que eliminan la necesidad de aprender el protocolo de programación a bajo nivel.

Como se mencionó anteriormente, la librería Instrument Driver de LabVIEW contiene controladores para una gran variedad de instrumentos programables que usan la interfaz GPIB. Debido a que los instrument driver son distribuidos con el código fuente de su diagrama de bloques, estos pueden ser adaptados a la necesidad del usuario.

Si el instrument driver para un particular instrumento no existe, se puede:

- Tratar de usar un controlador de un instrumento similar. Con frecuencia los instrumentos de la misma fábrica tienen similares si no idénticos controladores.

- Modificar los VIs de la librería Instrument Driver Template para crear un nuevo controlador para el instrumento. Estos VIs están localizados en la librería *insttmpl.llb* del subdirectorio *instr* del directorio *examples*, y son como una especie de plantillas de los controladores.

- Desarrollar completamente el controlador del instrumento usando algunos de los VIs contenidos en las librerías GPIB o VISA Transition proporcionadas con LabVIEW.

2.7.2.1.1. ESTRUCTURA DE LOS INSTRUMENT DRIVERS

La siguiente figura muestra la organización de un instrument driver estándar:

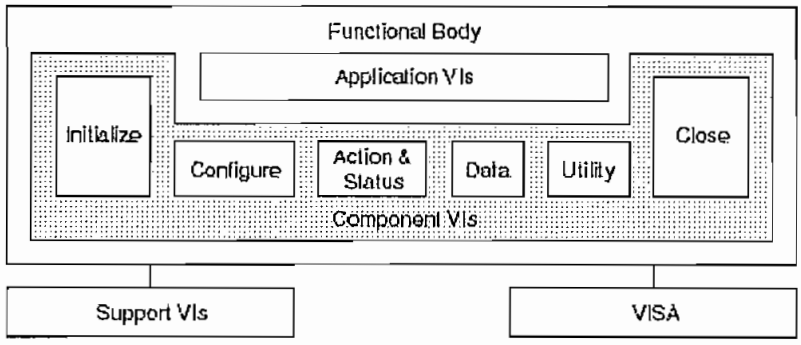


Figura 2-11 Instrument driver estándar

Los instrument driver de LabVIEW consisten de dos principales categorías de VIs:

- Instrument Driver Application VIs
- Instrument Driver Component VIs

2.7.2.1.1.1. INSTRUMENT DRIVER APPLICATION VIs

Estos VIs son ejemplos de agrupamiento de component VIs y sirven como test de demostración de alto nivel de la ejecución de operaciones comunes, tales como configuración del instrumento, activación y toma de medidas.

2.7.2.1.1.2. INSTRUMENT DRIVER COMPONENT VIs

Esta categoría comprende módulos individuales de software que controlan un área específica de funcionalidad del instrumento. Los componentes VIs se clasifican en seis categorías: *initialize*, *configuration*, *action/status*, *data*, *utility* y *close*.

El **initialize VI** es el primer VI llamado de los controladores y establece la comunicación con el instrumento. En las operaciones exitosas, el initialize VI retorna una guía que direcciona al instrumento en todos los subsecuentes controladores VIs. Adicionalmente, desde este VI se puede identificar en forma opcional cual es el instrumento de trabajo. Generalmente, sólo es necesario llamarlo una vez al inicio de la aplicación.

Los **configuration VIs** son un conjunto de rutinas de software que configuran el instrumento para ejecutar una operación deseada. Después de que estos VIs son llamados, el instrumento está listo para tomar medidas o estimular un sistema.

La categoría de **action/status** contiene dos tipos de VIs. Los action VIs causan que el instrumento inicie o termine las operaciones de medida. Estas operaciones pueden incluir armar el trigger (disparo) del sistema o generar un estímulo. Estos VIs son

diferentes de los configuration VIs debido a que ellos no cambian los parámetros del instrumento, solamente ordenan al instrumento llevar a cabo una acción basada en su configuración actual. Los status VIs obtienen el estado actual del instrumento.

Los **data VIs** transfieren datos hacia y desde el instrumento. Los ejemplos incluyen VIs para la lectura de un valor medido o de una forma de onda desde el instrumento de medida, y VIs para la transmisión de ondas o configuraciones hacia el instrumento.

Los **utility VIs** pueden ejecutar una variedad de operaciones auxiliares, además incluyen VIs que son comunes en la mayoría de instrumentos tales como reset, selt-test, revision y error query y puede incluir otros VIs habituales de los instrument driver que pueden ejecutar operaciones tales como calibración o almacenamiento.

El **close VI** termina la conexión de software al instrumento y libera recursos del sistema. Generalmente, sólo es necesario llamarlo al fin de la aplicación o cuando finaliza la comunicación con el instrumento. Por cada llamada exitosa del initialize VI se debe emparejar con un close VI, caso contrario se estará utilizando innecesariamente memoria del sistema.

Cada una de estas categorías, con excepción de los initialize y close VIs, consisten de varios módulos de VIs.

La figura siguiente muestra como se usan los instrument driver component VIs para el Generador de Formas de Onda Tek VX4790 en el diagrama del VI Tek VX4790 Example application.

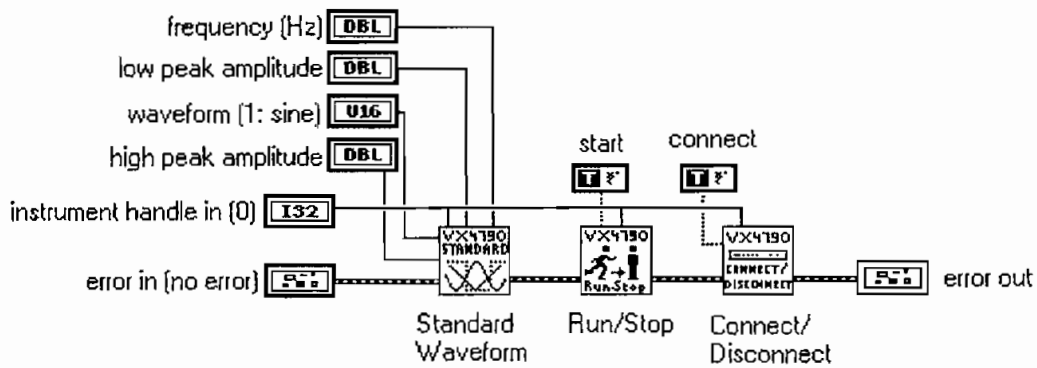


Figura 2-12 Diagrama del VI Instrument Driver Application del Generador de Ondas Tek VX4790. Se aprecia el uso de los VIs Instrument Driver Component: Standard Waveform, Run/Stop y Connect/Disconnect.

Los iconos que se muestran en la Figura 2-12 corresponden a la simbología normalizada que emplea LabVIEW. Conocer su funcionamiento implica estudiar los manuales de operación y desarrollo de este programa. A manera de ejemplo se indica lo que hacen los instrument driver component mostrados en dicha figura:

- **Standard Waveform:** permite configurar el tipo de señal que entrega el generador, la frecuencia y el pico de amplitud mínimo y máximo de la forma de onda.

- **Run/Stop:** arma el trigger
- **Connect/Disconnect:** conecta y desconecta la señal enviada desde el generador

No es el objetivo de este trabajo emplear la función de todos los drivers que intervienen en el sistema, además de que se estaría repitiendo la información de los manuales ya mencionados; por lo mismo en lo que sigue se omitirán estas descripciones.

2.7.2.1.1.3. ELEMENTOS BÁSICOS DE LOS INSTRUMENT DRIVER COMPONENT VIs

El diagrama de bloques de los instrument driver component VIs usa VIs estándar de LabVIEW, así como los VIs de la Librería *VISA Transition* para construir cadenas de texto de comandos y enviarlos al instrumento. En la siguiente figura se muestra el diagrama de bloques del component VI VX4790 Config Std Wave. Aquí se aprecia como se enlazan las cadenas de comandos y se los conecta al VI INSTR Write (que pertenece a la librería VISA Transition). Este VI envía la información al instrumento por medio de la interfaz GPIB, chequea los errores y actualiza el indicador de error.

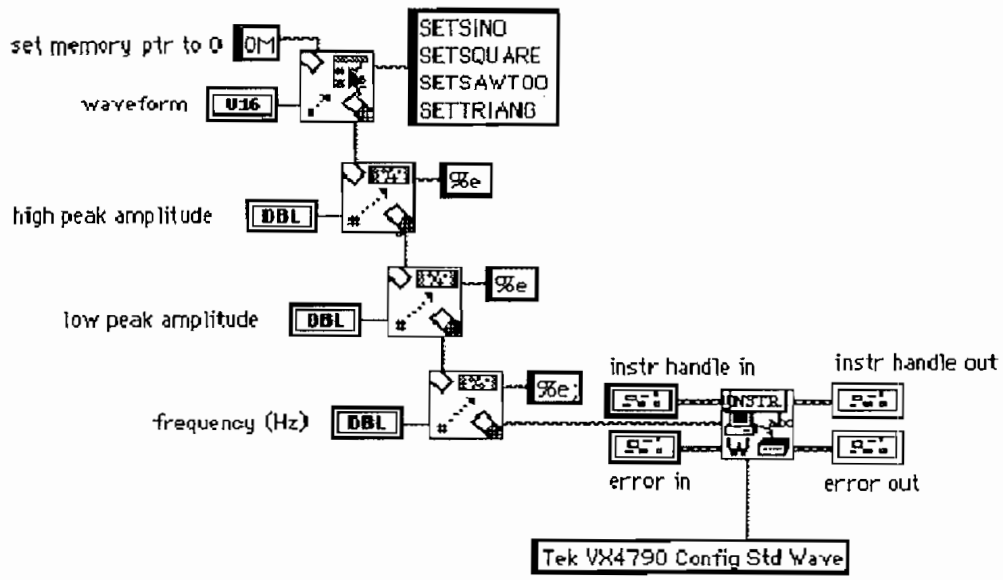
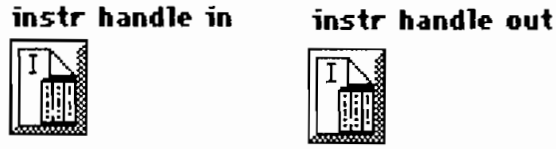


Figura 2-13 Diagrama del VI Component VI VX4790 Config Std Wave

Por lo que cada VI de los instrument driver component contiene, en adición a los controles requeridos para operar la función del instrumento para el cual fue creado, los siguientes controles:

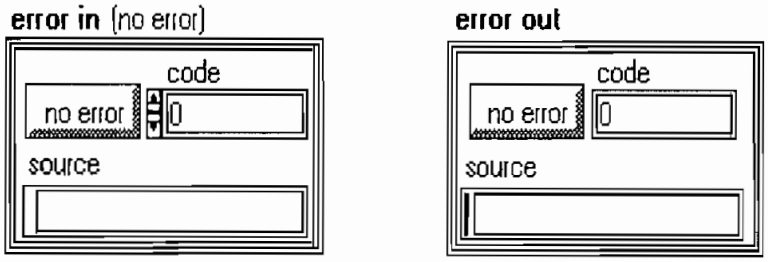
a) Los **instr handle** son identificadores lógicos únicos usados para la comunicación:



- **instr handle in** (excepto parta el initialize VI) es un identificador único de referencia para una sesión de entrada/salida (I/O) del dispositivo. Este identifica el dispositivo con el cual el VI se comunica y toda la información de la configuración necesaria para ejecutar la I/O.

- **instr handle out** es un identificador único de referencia para una sesión de entrada/salida (I/O) del dispositivo. Este identifica el dispositivo con el cual el VI se comunica y toda la información de la configuración necesaria para ejecutar la I/O.

b) Los **clúster de error** son usados por los controladores para reportar todo los errores. Cada VI de los controladores tiene un error in (entrada) y un error out (salida). Alambrando el clúster error out de un VI al clúster error in de otro VI, se pasa la información del error a lo largo de los controladores usados, propagándose al VI de mayor nivel de la aplicación.



- **error in** describe las condiciones de error que ocurrieron antes que el VI se ejecute. El clúster error in contiene los siguientes parámetros:

  status es verdadero si un error ha ocurrido. Si el status es verdadero, este VI no ejecuta ninguna operación y coloca el valor del clúster error in en el clúster error out.

  code es el código del error. Un valor de 0 significa que no hay error. Referirse al apéndice B, Códigos de Errores, para una descripción de los posibles códigos de error.

  source es el nombre del VI que ha producido el error.

- **error out** es un clúster que contiene la información del error. Si el clúster error in indica un error, los elementos status, code, y source del error out tienen los mismos valores de los elementos correspondientes del error in. Si el error in no indica un error, el èrror out describe el error encontrado por el VI.

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DEL SOFTWARE

La necesidad de enviar los espectros captados en el osciloscopio digital a un computador para su respectivo análisis ha involucrado el desarrollo de un software que permita satisfacer básicamente los siguientes aspectos:

- Definir desde el computador los parámetros de operación del osciloscopio
- Transmisión de las formas de onda del osciloscopio al computador
- Manejo versátil del espectro que se tiene en pantalla
- Almacenamiento y generación de reportes

Todo esto se ha integrado en un conjunto que permite manejar el sistema de una forma sencilla, especialmente tomando en cuenta que las personas que eventualmente manipularán el programa no tendrán conocimientos del paquete de programación usado.

Por las características especiales de esta aplicación fue necesario recurrir a la utilización del ambiente de programación LabVIEW, el cual elimina la necesidad de aprender el protocolo de comunicación a bajo nivel cuando se utiliza la interfaz GPIB.

Con el fin de cumplir las condiciones requeridas, se ha desarrollado el software Aldebarán, el cual está íntegramente desarrollado en el lenguaje gráfico LabVIEW 3.1 y compuesto por 118 instrumentos virtuales (VIs), de los cuales 44 VIs corresponden a las librerías propias de LabVIEW y el resto, esto es, 74 VIs son de propia autoría.

Debido a que LabVIEW es un programa multitarea, es decir que no solo se ejecuta una operación o una subrutina a la vez, se dificulta la realización de un flujograma, por lo que se ha optado por describir en el siguiente diagrama (Figura 3-1) que operaciones se habilitan y bajo que condiciones.

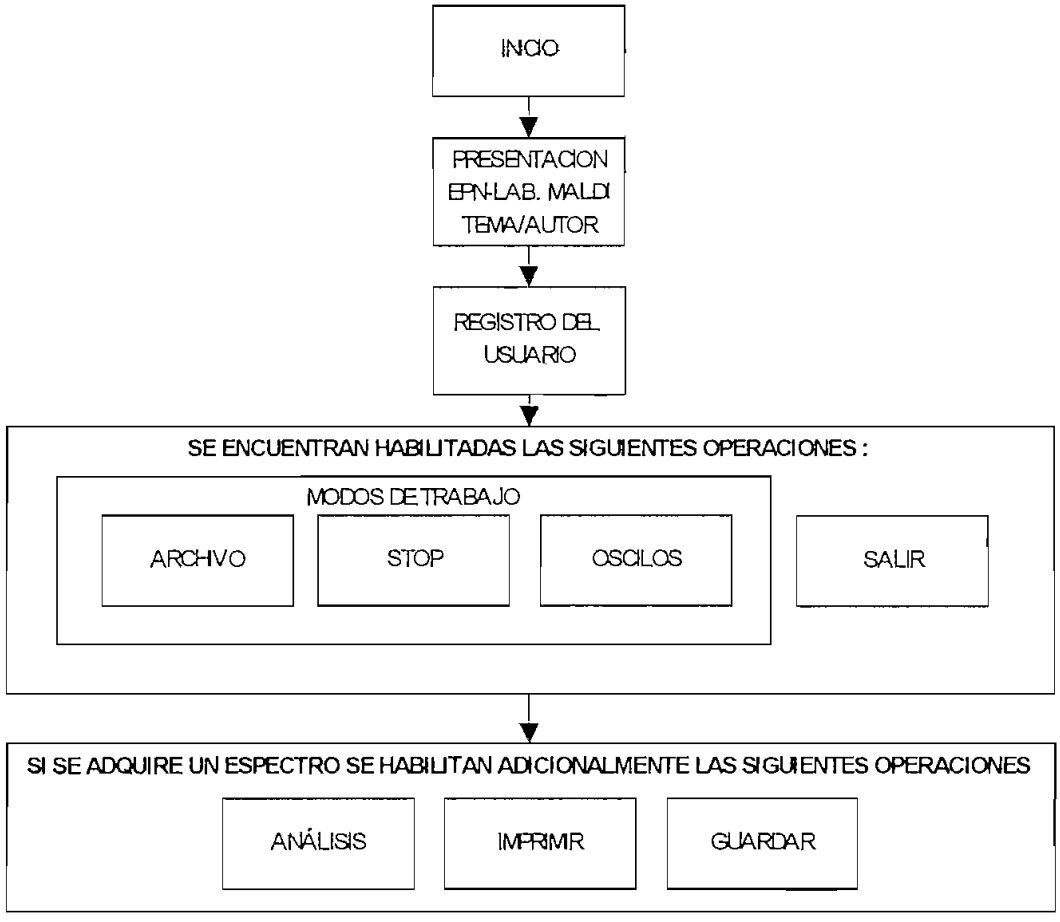


Figura 3-1 Diagrama de descripción del software

La pantalla ADQUISICION que se muestra en la Figura 3-2 es la principal pantalla de interfaz con el usuario, pues desde aquí se selecciona el MODO DE TRABAJO bajo el que se desea operar.

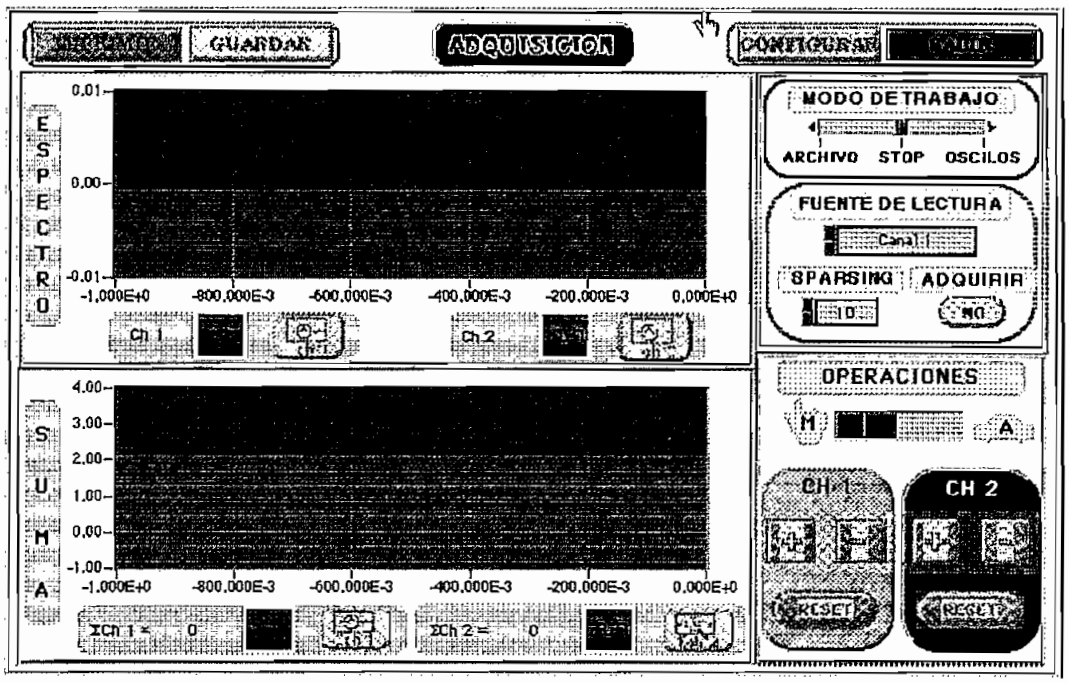


Figura 3-2 Pantalla ADQUISICION

A continuación se describe las características de cada uno de los MODOS DE TRABAJO.

MODO ARCHIVO

En este modo se puede realizar la lectura de un archivo previamente almacenado. Una vez que se ejecuta la lectura, se cambia automáticamente al modo de trabajo STOP.

Las características de la implementación de esta parte del software se detallan más adelante en el Capítulo 3.4.2.

MODO STOP

El programa arranca en este modo de trabajo (Figura 3-2). Desde aquí sólo se puede realizar las operaciones de: análisis de los espectros (a excepción de las de SUMA, RESTA y RESET), administración de la información y finalización de la sesión de trabajo. Las dos primeras se habilitan siempre y cuando se haya adquirido un espectro previamente, ya sea desde el modo ARCHIVO o desde el modo OSCILOS, como se puede apreciar en la Figura 3-3.

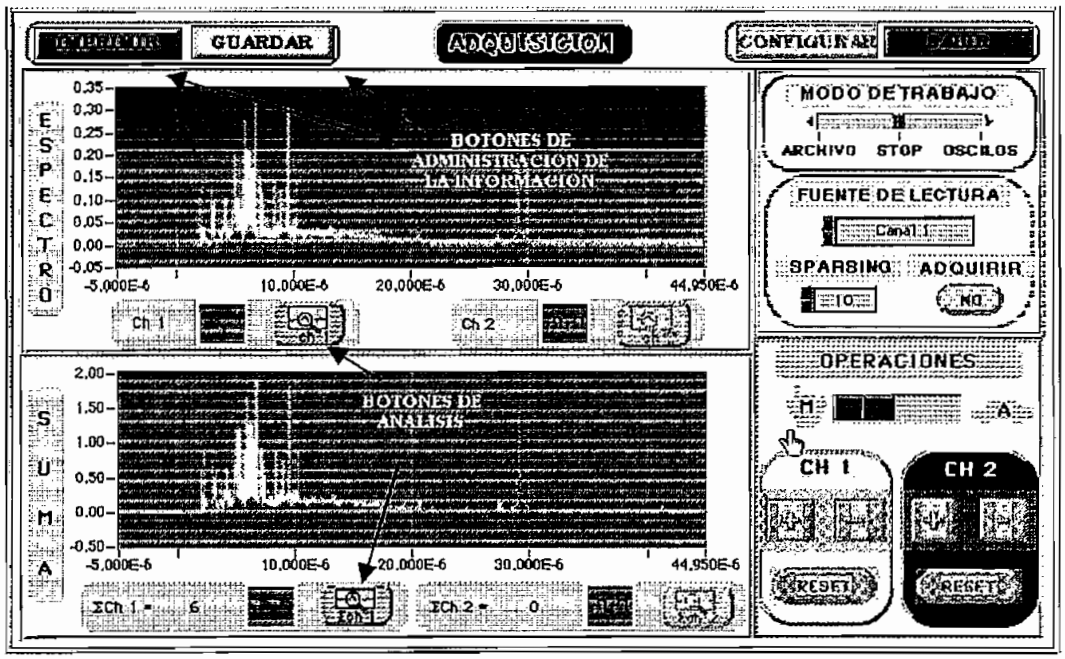


Figura 3-3 Modo STOP

MODO OSCILOS

En este modo de trabajo se inicia la comunicación hacia el osciloscopio. Por lo que en este modo se habilita la operación de configuración del osciloscopio (botón CONFIGURAR), y se realiza la adquisición y transferencia de los espectros o formas de onda, ver Figura 3-4.

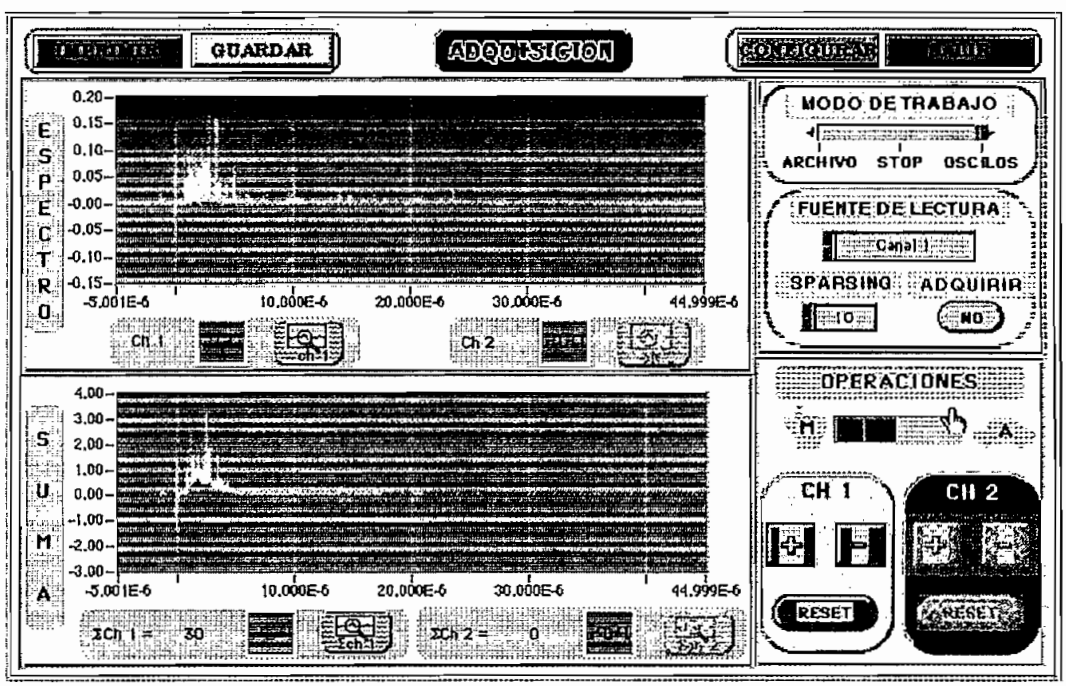


Figura 3-4 Modo OSCILOS

En este modo se pueden realizar las mismas operaciones disponibles en el modo STOP. Adicionalmente, se habilitan las operaciones de SUMA, RESTA y RESET. Todo esto siempre y cuando se haya adquirido un espectro o forma de onda, como se puede apreciar en la Figura 3-4.

Al cambiar a otro modo de trabajo o salir del programa, finaliza la comunicación con el osciloscopio.

Debido a que el programa ha sido desarrollado como pantallas que se interrelacionan en forma modular, y en el que cada pantalla contiene una serie de subVIs, es más conveniente clasificar las funciones que realiza el programa en diferentes categorías para su entendimiento y fácil comprensión, que ir detallando cada uno de los VIs. Estas categorías son:

- Control del osciloscopio
- Adquisición y transferencia de los espectros del osciloscopio al computador
- Análisis de los espectros
    - Presentación visual de los espectros
    - Manipulación de los espectros
    - Solución matemática de la ecuación de calibración
    - Calibración de espectros: conversión de escala de tiempo a masa
- Administración de la información adquirida
    - Almacenamiento de espectros y sus características
    - Lectura de espectros y sus características
    - Generación de reportes

En el anexo A se listan todos los VIs construidos para este software y que no son parte de las librerías de LabVIEW, clasificados de acuerdo a su categoría, en el que se indica el icono, el nombre y una breve descripción de la función que cumple cada VI.

A continuación se detalla las características de cada una de estas categorías, indicando que consideraciones y pasos se han seguido para cumplir satisfactoriamente las necesidades del programa.

3.1. CONTROL DEL OSCILOSCOPIO

A continuación se describen las consideraciones que se deben tomar en cuenta para realizar el control del osciloscopio y las características que presentan los módulos utilizados:

3.1.1. CONSIDERACIONES

Para la implementación de los VIs encargados de realizar el control del osciloscopio (o de cualquier otro instrumento) es necesario primero seguir los siguientes pasos:

1. Familiarizarse con la operación del instrumento en forma práctica por medio de la lectura del manual de operación.

2. Examinar el conjunto de instrucciones del manual de programación para ver que controles y funciones están disponibles y como organizarlas.

3. Decidir que características se ajustan mejor a un control programático.

4. Examinar si los drivers (controladores) de LabVIEW necesarios para el manejo del instrumento en particular existen. (En caso de no existir estos deben construirse, siguiendo los pasos recomendados en el Capítulo 2.7.2.1).

5. En caso de que existan los drivers del instrumento en particular, o de que se esté usando drivers de un instrumento similar, es necesario realizar una comprobación interactiva de estos, antes de incluirlos en la aplicación. Esto ayuda a seleccionar apropiadamente que partes de estos drivers (VIs) se ajustan mejor a las necesidades del usuario para el control del instrumento

6. Después de este análisis interactivo se selecciona que VIs son necesarios para el control del instrumento y se determina si existe la necesidad de modificar algún driver del instrumento ya sea para optimizar el código o para añadir alguna otra instrucción.

7. Establecer el orden de ejecución de los VIs. Primero se debe ejecutar el VI de inicialización de la comunicación (*Initialize*), seguido por uno o más VIs de configuración (*Configuration*). Si se está usando un trigger para realizar medidas, es necesario llamar un VI de acción (*Action*) para armar el trigger. Se llaman los VIs de datos (*Data*) para colectar los valores medidos. Y cuando finalice la sesión, se deberá correr el VI de cierre (*Close*). (Para la descripción de estos instrumentos virtuales básicos ver Capítulo 2.7.2.1.1.2).

8. Después de seleccionar y el establecer el orden de ejecución de los VIs, se puede proceder a la construcción de la aplicación. Los VIs se deben conectar entre sí secuencialmente en el orden adecuado establecido, siguiendo el flujo de las conexiones de los controles llamados *instr handle* y *error cluster*, que dan la secuencia de trabajo. Es importante considerar, que no se necesita alambrar todas las entradas de todos los VIs. Por ejemplo, si el valor por defecto de algún control

usado como entrada del VI es suficiente para la aplicación, no es necesario alambrar dicho terminal de entrada a un nuevo control.

3.1.2. CARACTERÍSTICAS

Para el control de los osciloscopios Tektronix TDS360 y LeCroy 9450A, se siguieron los pasos previamente indicados.

Fue necesario hacer modificaciones importantes a algunos drivers existentes para estos instrumentos. Entre estas modificaciones están: la optimización del código y/o la adición de subrutinas completas y de nuevas instrucciones.

La librería de los drivers que se usó para el control del osciloscopio Tektronix TDS360 fue: Tkttds3xx.llb (librería de drivers de la familia TKT TDS 3xx) y para el osciloscopio LeCroy 9450A fue: lcdsob.llb (librería de drivers de la familia LeCroy 93xx).

La siguiente tabla muestra la organización de los VIs seleccionados de acuerdo a cada categoría de los Instrument Driver Component:

Instrument Driver Component	**Módulos (función que realizan)**
Initialize VI	• Inicialización
Configuration VIs	• Configuración vertical • Configuración horizontal • Configuración del trigger • Configuración del modo de adquisición
Action/Status VIs	• Lector del estado del trigger • Armado del trigger
Data VIs	• Lectura de las formas de onda
Close VI	• Cierre

Tabla 3-1 Módulos correspondientes a los componentes usados en la aplicación

El orden de ejecución de los VIs se lo detalla en el siguiente diagrama de flujo:

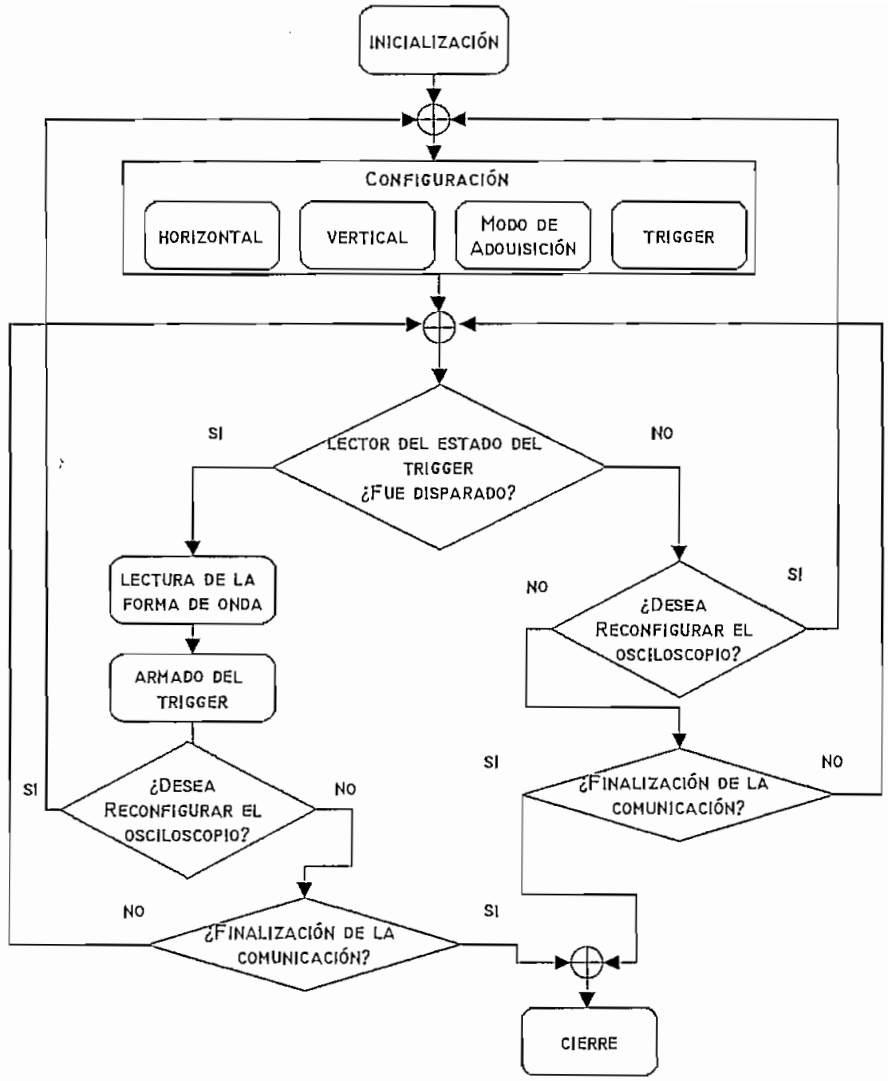


Figura 3-5 Diagrama de flujo del control del osciloscopio

Una observación importante es que al VI de inicialización (*Initialize.vi*) se lo modificó para que automáticamente identifique cual es el osciloscopio conectado al computador, y dependiendo de esto, acceda a su respectiva configuración. Con esto se crea una facilidad de detección automática no existente anteriormente que elimina la necesidad que el usuario tenga que hacerlo. La dirección GPIB asignada para cualquiera de los dos osciloscopios es 4, por lo que antes de realizar la ejecución del programa es necesario verificar que la dirección del instrumento concuerde con dicho número.

Los VIs de configuración se los ha agrupado como subVIs en un solo VI principal de configuración, el cual es individual para cada osciloscopio, esto con el fin de presentar al usuario un panel de configuración virtual en una sola pantalla. En las figuras siguientes se muestra la pantalla y el diagrama de configuración empleado para cada osciloscopio.

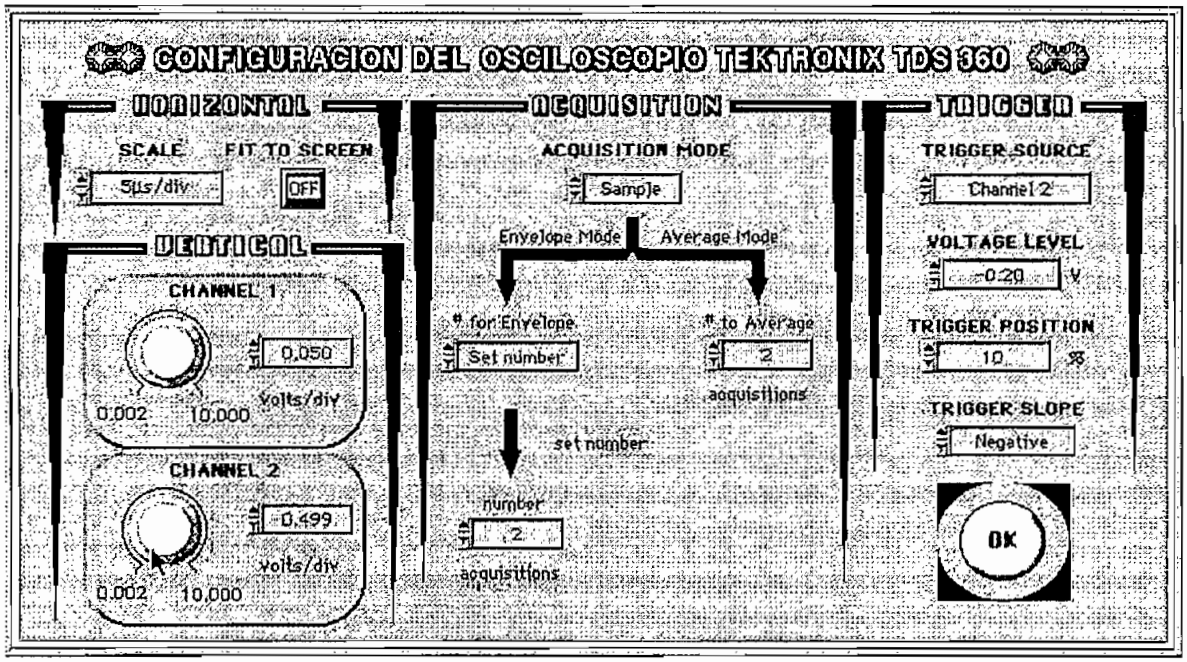


Figura 3-6 Panel virtual de configuración del osciloscopio Tektronix TDS 360

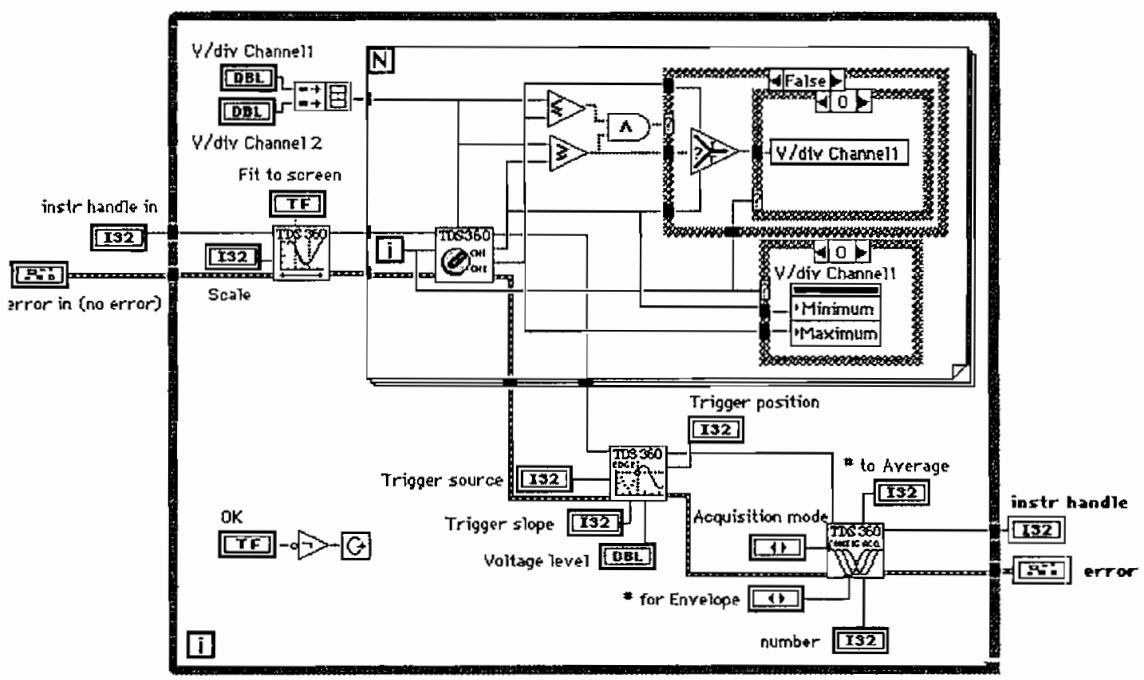


Figura 3-7 Diagrama del VI de configuración del osciloscopio Tektronix

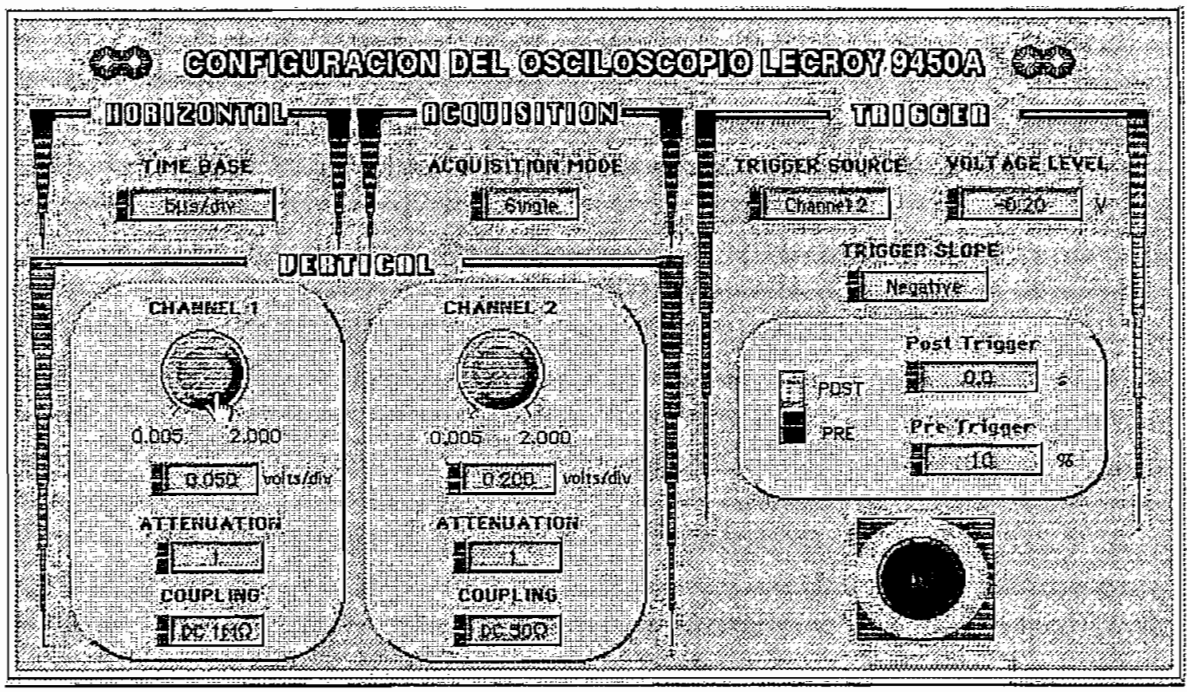


Figura 3-8 Panel virtual de configuración del osciloscopio LeCroy 9450A

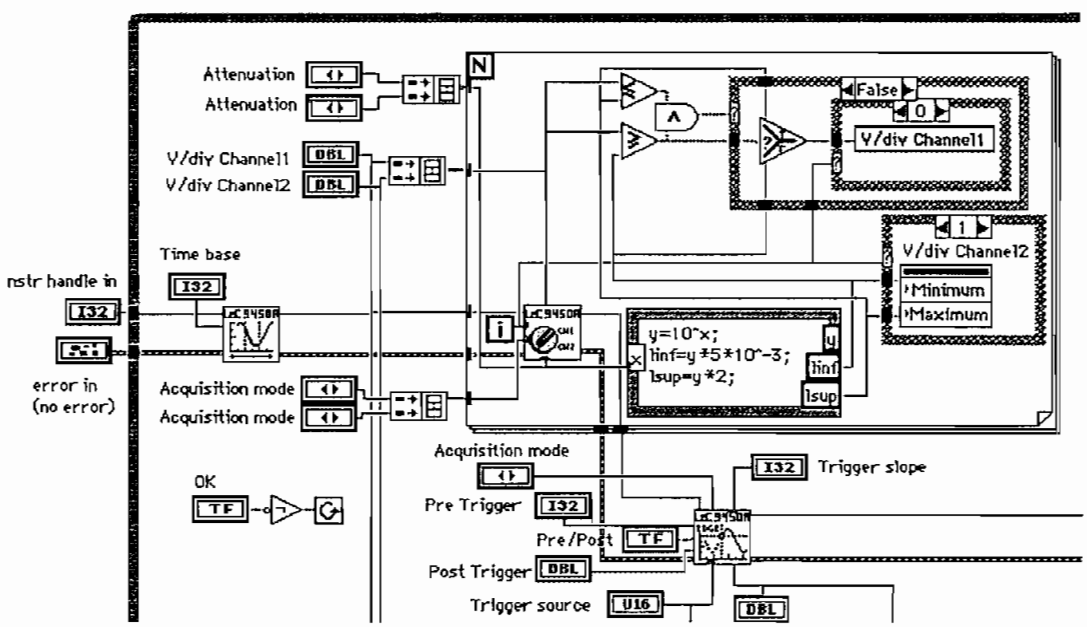


Figura 3-9 Diagrama del VI de configuración del osciloscopio LeCroy

En estos diagramas, Figuras 3-7 y 3-9, se aprecia como se enlazan los instrument driver component VIs a través de los instr handle y los clúster de error. Además, debido a que los controles implementados para el manejo de la escala vertical son perillas, se requirió programar internamente sus límites mínimos y máximos, ya que estos valores dependen del factor de atenuación de la punta de prueba empleada.

Una consideración adicional que se tomó en cuenta, es que si bien se puede realizar la adquisición de los espectros sin necesidad de primero configurar los parámetros del osciloscopio, es necesario que el usuario verifique si los parámetros son los adecuados, por lo que cada vez que se inicia la comunicación del osciloscopio (MODO OSCILOS), el primer paso después de su identificación es la configuración.

Una modificación importante en los VIs encargados de ejecutar la lectura de las ondas permite ahora, a más de la lectura individual de cada canal, realizar la lectura simultánea de los dos canales del osciloscopio, con el fin de facilitar al usuario adquirir dos espectros independientes a la vez o monitorear al espectro y alguna otra señal de interés, como por ejemplo la forma de onda del trigger. También, se le agregó el despliegue de la información de los parámetros del osciloscopio bajo los cuales se realizó la adquisición y la operación de invertir la forma de onda debido a que la intensidad de los iones es de valor negativo.

3.2. ADQUISICIÓN Y TRANSFERENCIA DE LOS ESPECTROS DEL OSCILOSCOPIO AL COMPUTADOR

Aunque estas operaciones pertenecen a la categoría anterior, es necesario describir que consideraciones se toman en cuenta para su ejecución y que características presentan, todo esto por razones metodológicas.

3.2.1. CONSIDERACIONES

Los estados transitorios que ocurren dentro del osciloscopio pueden ser monitoreados remotamente mediante el sondeo de los *registros de status*[1] internos del osciloscopio. Sin embargo, en este caso esto no es necesario porque este tipo de monitoreo solo es importante cuando se trabaja con múltiples instrumentos GPIB, o cuando se requiere que un proceso sea completado antes de que otro empiece, como por ejemplo en la adquisición de una onda y el valor de su amplitud, es necesario primero que la adquisición de la onda sea completada antes de tomar la medición, esta sincronización se logra mediante el uso de los registros internos. Para nuestro caso particular, en el que la adquisición de un nuevo espectro está ligada a un evento único, como el cambio del estado del trigger, basta un continuo monitoreo del valor del *comando* relacionado a este evento para que se ejecute automáticamente la transferencia de la onda al computador.

[1] Registros de status: son registros que permiten al usuario determinar rápidamente los procesos internos del osciloscopio en cualquier momento. Algunos de estos registros son requeridos por la norma IEEE 488.2 mientras que otros son específicos del instrumento. En cada registro, cada bit está asociado a un tipo de evento particular, tales como la ejecución de un error o el requerimiento de servicio.

Una vez estimado que el proceso requerido para la adquisición, es el de "adquiera uno y pare la adquisición hasta que se rearme el trigger", se determinó que los modos que satisfacen dichas características son: Tektronix - Modo Sample, LeCroy - Modo Single. Aunque se puede resaltar el hecho de que también se puede trabajar en los otros modos de adquisición, lo que permite que el programa sea útil a cualquier experimento que involucre el uso del osciloscopio.

Además, si bien la transferencia de las ondas está ligada al estado del trigger, adicionalmente se incorporó una opción para que el usuario determine si desea adquirir la forma de onda presente en el osciloscopio, pese a que no se haya producido el disparo del trigger.

Aunque la operación de invertir la onda se la puede realizar en el propio osciloscopio, con el fin de limitar el tiempo de procesamiento dentro del osciloscopio, es mejor transferirla al computador para que este sea el encargado de realizarla.

3.2.2. CARACTERÍSTICAS

Para realizar la transferencia de la onda es necesario, primero, especificar los siguientes aspectos generales que se relacionan con el modo de comunicación y que se deben tomar en cuenta para decidir por una opción óptima:

3.2.2.1. FUENTE

Fija la localización de la forma de onda a ser transferida desde el osciloscopio. También se pueden transferir múltiples formas de onda a la vez seleccionando varias fuentes. Por ejemplo: canal 1, canal 2, referencia 1, canal 1 y canal 2, etc.

3.2.2.2. ANCHO

Permite especificar el número de bytes que representa a cada punto registrado en el osciloscopio (1 o 2 bytes). El número de bytes depende del modo de adquisición especificado cuando se adquiere el dato. Así, por ejemplo en el osciloscopio Tektronix el dato adquirido en los modos: *envelope*, *sample*, o *peak detect* usa un byte por cada punto de la forma de onda; y el dato adquirido en el modo *average* usa dos bytes.

Si se especifica dos bytes para un dato que usa solamente uno, el byte menos significativo estará lleno de ceros; y si se especifica un byte para un dato que usa dos, el byte menos significativo será ignorado.

Si se realiza algún tipo de operación matemática con la forma de onda adquirida dentro del mismo osciloscopio, se requiere para su transmisión hacia al computador, trabajar con un ancho de dos bytes, con el fin de mantener las características de la forma de onda; caso contrario, se podría estar perdiendo características muy relevantes.

Para nuestro caso, como todas las operaciones realizadas sobre los espectros adquiridos son procesadas en el computador, se requiere fijar un ancho de un byte para la transmisión.

3.2.2.3. FORMATO

Permite especificar que el formato del dato sea ASCII o binario.

- **ASCII:** el dato ASCII consiste de valores enteros en el rango de –128 a 127. Por lo que cada punto consiste de 4 bytes en el peor de los casos (3 bytes para el valor del punto, uno por cada posición decimal, y 1 byte para el signo). El valor del ancho es ignorado cuando se usa este formato debido a que el ancho es siempre uno para cada caracter ASCII.

- **BINARIO:** el dato BINARIO permite representar valores enteros con signo o valores enteros positivos. El rango de los valores depende del ancho especificado. Cuando el ancho es de un byte, el rango va de –128 a 127 o de 0 a 255, respectivamente. Cuando el ancho es de dos bytes, el rango va de –32768 a 32767 o de 0 a 65535.

En este último caso también se debe especificar cual byte es el primero a transferirse. Si se especifica dos bytes para un dato que sólo tiene uno, el byte menos significante se llenará de ceros; de similar manera, si se especifica un byte para un dato que usa dos, el byte menos significante será ignorado.

Cuando el formato del dato es binario solo se requiere de un byte para representar a cada punto, asumiendo que se fijo un ancho de uno, no importa si es entero positivo o entero con signo.

Es evidente, de acuerdo con lo expuesto, que una misma forma de onda puede transferirse más rápido y requiriendo menos memoria cuando se usa formato BINARIO que cuando se usa formato ASCII.

3.2.2.4. LONGITUD

Permite transferir una porción de la forma de onda o el registro entero. En caso de que sea una región se debe especificar el punto inicial y el punto final o el punto inicial y el número de puntos a ser transmitidos.

En el caso del osciloscopio LeCroy existe la posibilidad de fijar un factor de separación entre los puntos del registro (sparsing) con el fin de minimizar el número de puntos enviados al computador, obteniendo una transferencia más rápida y requiriendo menos memoria del computador.

En la siguiente tabla se dan los valores del modo de comunicación empleado para los dos osciloscopios:

Características	Tektronix TDS 360	LeCroy 9450A
Fuente	Canal 1 Canal 2 Canal 1 y Canal 2 Referencia 1	Canal 1 Canal 2 Canal 1 y Canal 2 Memoria C
Ancho (bytes)	2	2
Formato	Binario	Binario
Rango de los valores	0 a 255	–128 a 127 [1]
Primer byte transferido	Byte más significativo	Byte más significativo
Longitud (puntos)	1000	40 a 50000 [2]
Espaciamiento	-	10 a 25000 [3]

Tabla 3-2 Características de los modos de transferencia de las formas de onda empleados para los dos osciloscopios digitales.

Una vez que se especifican los aspectos relacionados con el modo de comunicación, se envía al osciloscopio el comando de solicitud de retorno de la información de la forma de onda. La información acerca de cada forma de onda que se transfiere desde el osciloscopio al computador puede dividirse en dos bloques:

- un conjunto de valores que representa usualmente a la forma de onda presente en el osciloscopio, y

- un bloque de información descriptiva de la forma de onda, tal como la escala horizontal, la escala vertical, entre otros. Esta información es necesaria para la comprensión y manipulación del registro de la forma de onda.

Una vez que se procesan estos dos bloques, se obtiene una cadena (string) en la que se incluyen los parámetros del osciloscopio bajo los cuales se realizó la adquisición y un clúster de los siguientes 3 elementos numéricos, tal como se muestra en la Figura 3-10:

[1] Para este osciloscopio solo se puede representar los datos con valores enteros con signo

[2] Depende de la escala de tiempo

[3] El valor de 10 ha sido fijado como valor mínimo y por defecto, este valor significa que tomamos un dato cada 10 puntos del registro. Es importante imponer este mínimo factor de separación, ya que en el peor de los casos, es decir cuando se trabaja con un registro de 50000 puntos, si bien solo disminuye la velocidad de adquisición, al momento de procesar esta información el computador usado no lo puede hacer por falta de memoria.

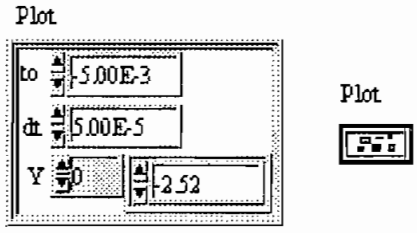


Figura 3-10 Clúster del gráfico y su equivalente en el Diagrama

- **to:** representa el desplazamiento horizontal (en segundos) y se encuentra relacionado con la posición del trigger en la pantalla, de ahí su valor negativo.

- **dt:** representa el intervalo horizontal entre los puntos (en segundos).

- **Array Y:** es el vector de los puntos que representa los valores de voltaje (en voltios).

Para minimizar el uso de memoria requerida por el Array Y se debe cambiar su representación del formato de precisión extendida (EXT, valor fijado en el driver) al de doble precisión (DBL). Este cambio se lo realiza en los VIs encargados de realizar la lectura de las formas de onda, cambiando la función *To Extended Precision Float* por la función *To Double Precision Float*, como se aprecia en las siguientes figuras.

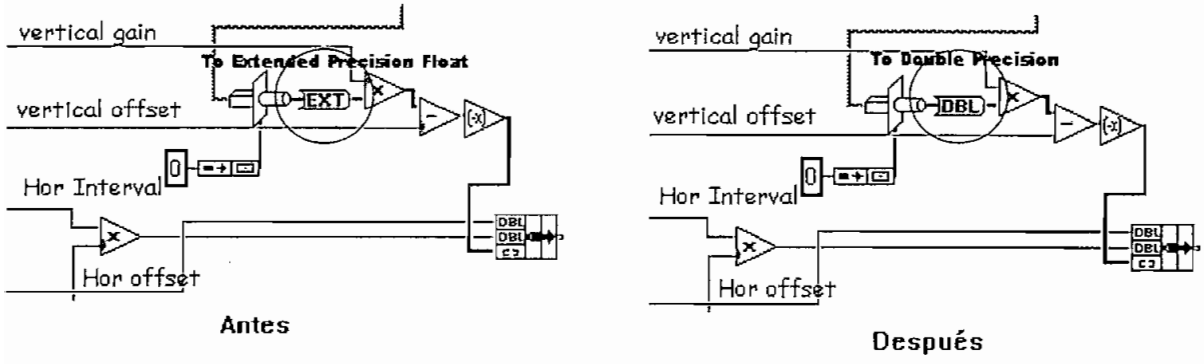


Figura 3-11 Cambio de representación del Array Y

3.3. ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS

Una vez que se adquiere un espectro, es necesario primero realizar su presentación visual en pantalla, antes de iniciar cualquier tipo de manipulación con el mismo. A continuación se describen las consideraciones que se tomaron en cuenta para el análisis de los espectros:

3.3.1. PRESENTACIÓN VISUAL DEL ESPECTRO

La presentación de las señales provenientes del osciloscopio en la pantalla del computador se hace mediante un gráfico del tipo *waveform graph,* ver Figura 3-3 gráfico ESPECTRO, el cual acepta como tipo de dato el formato que entrega el osciloscopio, es decir el clúster de *to, dt* y *Array Y.* En el caso presente, los clústers correspondientes al canal 1 y 2 se combinan previamente en un solo arreglo de forma secuencial, y es este arreglo el que se grafica.

Un problema generado en este arreglo es que como cada clúster representa una forma de onda, cuando se realiza la lectura de un solo canal el un clúster queda vacío, y parte del arreglo tiene como valor cero. Como el gráfico waveform graph se autoescala con respecto al menor valor del arreglo; esto es, con respecto a cero, el gráfico se contrae. Con el fin de remediar dicho problema fue necesario dividir el arreglo antes de graficarlo mediante la función *Split 1D Array,* con lo que se obtienen dos subarreglos, de los cuales se elimina el arreglo nulo, en los casos conflictivos, ver Figura 3-12.

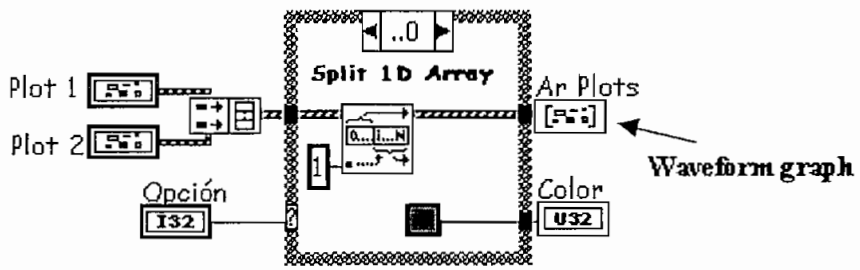


Figura 3-12 Arreglo formado para la presentación conjunta de los dos canales

Además, para la correcta identificación de las formas de onda en el gráfico por parte del usuario se dan colores diferentes a cada una de los canales.

3.3.2. MANIPULACIÓN DEL ESPECTRO

Una vez que se ha desplegado el espectro adquirido se puede procesar su información, pero como se mencionó anteriormente, con el fin de mejorar la calidad estadística del resultado se hace necesario por lo regular acumular varios espectros antes de proceder al análisis respectivo.

3.3.2.1. SUMA DE ESPECTROS

La suma de los espectros se despliega en otro gráfico del mismo tipo que el que se utiliza en la adquisición (favor ver Figura 3-3 gráfico SUMA), es decir un waveform graph, con el fin de permitir al usuario manipular tanto el último espectro capturado, así como su respectiva suma. Estos dos gráficos son visibles simultáneamente, pero pueden manipularse y analizarse por separado. Se cuenta, además, con un elemento visualizador para cada canal que da el número de espectros totales sumados, junto al gráfico de las sumas.

Ahora bien, debido a que lo que se suma de los espectros es el arreglo de los valores de intensidad (voltaje) punto por punto, es necesario que la escala horizontal no se vea afectada mientras se realiza este proceso. Por esta razón, es muy importante que no se varíen los parámetros horizontales del osciloscopio durante la adquisición seriada de espectros, caso contrario se estaría provocando un error.

Con el fin de que dicho error no se produzca, en el momento en que se ejecuta la suma, el programa verifica si se ha producido algún cambio en la escala horizontal, para automáticamente reiniciar la suma con los valores del clúster correspondiente al nuevo espectro, si así ha ocurrido.

El proceso de suma es de dos tipos manual y automática. En el modo manual el usuario determina por si mismo si el espectro adquirido debe ser sumado o no. En el modo automático, cada espectro nuevo se agrega a la suma.
Otras opciones importantes accesibles al usuario en el proceso de suma son: la resta del último espectro adquirido (modo manual), y el reinicio (reseteo) de la suma. Esto se consigue manteniendo en memoria el último espectro adquirido todo el tiempo por medio del uso de un *shift register*.[3]

Cabe señalar que esta parte del software se aplica no solamente cuando se lee de una sola fuente (canal) sino también cuando se adquiere simultáneamente de los dos canales. Así por ejemplo, si la suma está en modo automático, cada vez que se realiza el disparo del trigger se añaden a sus respectivas sumas los espectros capturados en el canal 1 y el canal 2; pudiendo reiniciar independientemente la suma para cada canal. De igual forma se puede escoger independientemente si se desea agregarlos o no en modo manual.

Debido a que como se dijo anteriormente, el programa compara los valores de *to* y *dt* del espectro adquirido con los de su respectiva suma, para verificar que no ha existido ningún cambio en la escala de tiempo, en el caso de Tektronix se podrían comparar directamente, pero para el caso de LeCroy el valor de *to* presenta fluctuaciones en sus valores decimales (pese a que la posición del trigger se mantenga constante); por lo que, es necesario limitar la comparación a solo dos decimales (con el número en formato exponencial). Con este procedimiento se asegura una comparación correcta en ambos casos.

Si se accede a espectros de la información almacenada en memoria, de igual forma se los puede sumar, siempre y cuando los parámetros de *to*, *dt* y el factor de separación de los puntos (caso LeCroy) sea el mismo que los establecidos al momento de hacerlo.

3.3.2.2. FUNCIONES DE ZOOM

Una vez que se tiene la señal adquirida y/o se ha realizado una suma, se puede efectuar un análisis más detallado de los espectros adquiridos para determinar sus características.

---

[3] Shift register: los shift registers vienen a ser como variables locales que realimentan o transfieren valores de la terminación de una iteración al principio de la próxima. Se pueden usar para cualquier tipo de dato y son propias de las estructuras *Loop* (For Loop y While Loop).

Para lograr dicho propósito, es necesario realizar acercamientos (zoom in) de las regiones que el usuario crea conveniente, ya sea para la definición de picos o para visualizar de mejor manera algún detalle.

Este análisis se lo puede realizar a un gráfico a la vez, ya sea de las formas de onda presentes en la gráfica ESPECTRO o de las de la gráfica SUMA, para esto es necesario presionar el botón de análisis respectivo, accesibles desde la pantalla ADQUISICIÓN, como se detalló en la Figura 3-3.

Al presionar uno de estos botones, se da paso a la pantalla de análisis en el tiempo del espectro, llamada TIEMPO, como se muestra en la Figura 3-13.

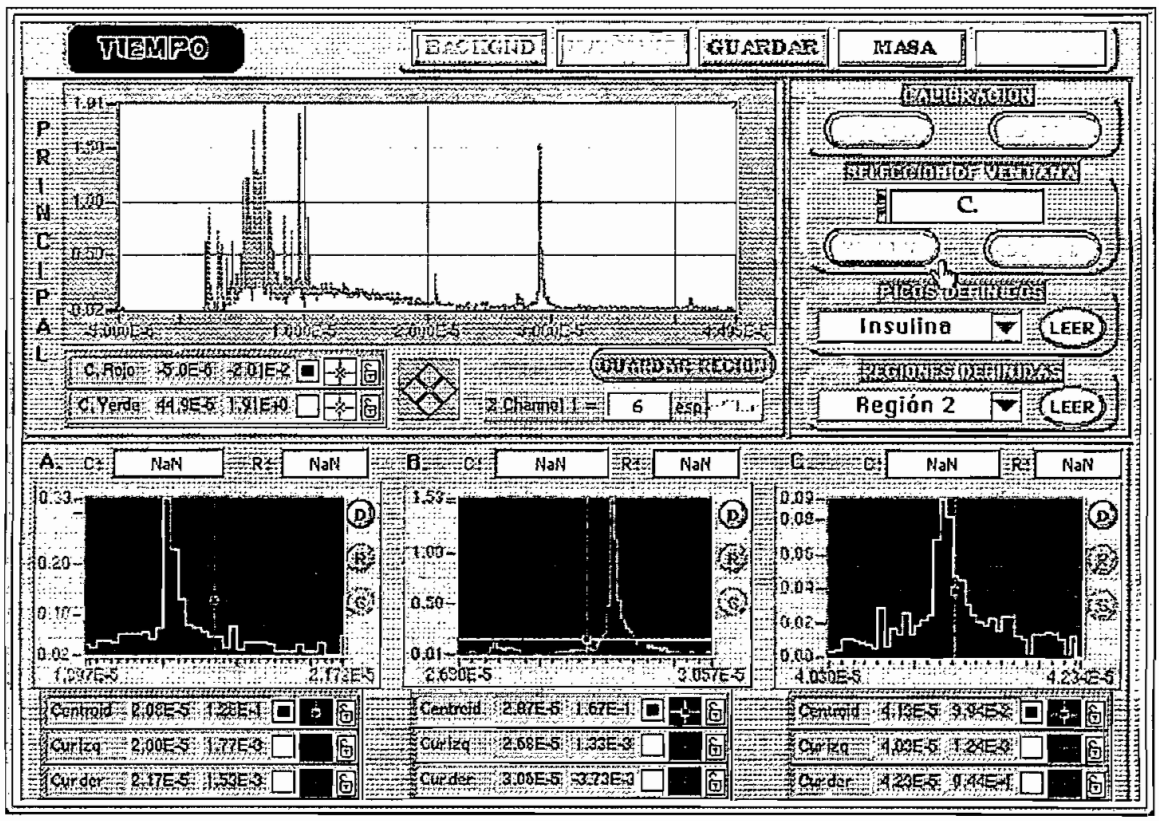


Figura 3-13 Pantalla TIEMPO

Esta pantalla contiene cuatro ventanas gráficas. La más grande se llama Principal y en ella se presenta la vista general del espectro al inicio del análisis. Las otras tres ventanas secundarias: A, B y C son más pequeñas y sirven para observar detalles más pequeños y para definir picos.

Aunque LabVIEW permite realizar la operación de acercamiento interactivamente a través de la paleta del gráfico, la necesidad de realizarlo con mayor precisión obligó a usar otro método especialmente diseñado por el autor y que se detalla a continuación.

El zoom de una área del espectro se la realiza mediante el uso de los cursores de la ventana PRINCIPAL y de sus atributos (*attribute nodes*). La posición de los cursores

elegida por el usuario, mediante un click y arrastre de los mismos, definen la región en la que se desea realizar el acercamiento. Los atributos correspondientes a la posición horizontal de los cursores se leen y se escriben sobre los atributos correspondientes a los límites de presentación del gráfico elegido (favor ver Figura 3-14). Esto se conjuga con la facilidad de autoescala en la escala vertical, dando lugar a la presentación final que muestra la región deseada debidamente escalada. Los límites verticales se imponen por el mayor y el menor valor en *Y* de los puntos encerrados en la ventana.

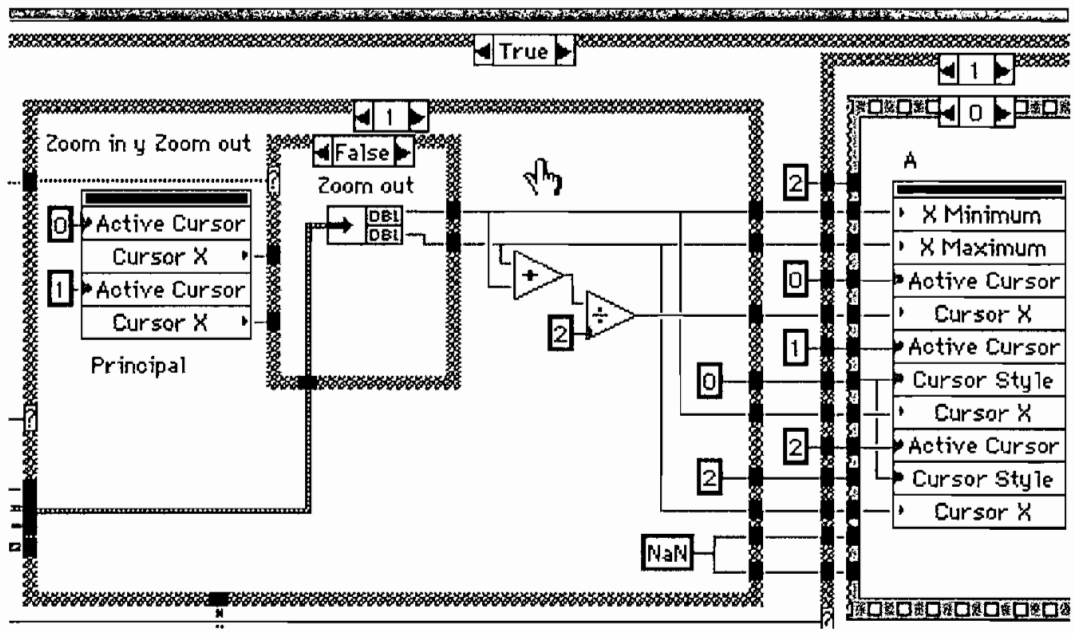


Figura 3-14 Función ZOOM

El software se lo ha diseñado de tal forma que los acercamientos de regiones del espectro pueden ser realizados en la misma ventana Principal o en las tres ventanas secundarias.

Una vez que se tienen definidas la región y la ventana de trabajo, para realizar el acercamiento se debe presionar el botón ZOOM IN (ver Figura 3-13), con lo que se logra la amplificación de la región deseada.

Si la operación de acercamiento se ejecuta en la ventana Principal, para volver a visualizar todo el espectro está disponible la función ZOOM OUT, la cual vuelve a desplegar todo el espectro en la ventana Principal.

3.3.2.3. DEFINICIÓN DE UN PICO

Un pico en el espectro se define como una región en la que los valores en *Y* superan un cierto nivel umbral a lo largo de una región horizontal determinada. Adicionalmente, un pico se delimita por sus flancos de ascenso y descenso. Aunque la definición de un pico es simple, su determinación mediante un algoritmo matemático no necesariamente se

implementa con facilidad. Así, por ejemplo: no es posible utilizar la función *Threshold Peak Detector* de LabVIEW ya que no se ajusta a las necesidades del usuario.

Para la definición y análisis de los picos, en el presente caso, es necesario primero ejecutar el acercamiento de la porción del espectro que se desea analizar, y presentar la región correspondiente en una de las ventanas secundarias.

Al enviar una región del espectro a una de estas ventanas, el cursor llamado Centroid se ubica automáticamente en la mitad del eje horizontal de la ventana y en los indicadores de valores de centroide y resolución ubicados sobre la ventana, C y R, respectivamente, se fija el valor NaN (Not a Number), ver Figura 3-13.

Si se ejecuta la tarea de definición del pico (botón D), el programa busca un pico en las proximidades del cursor. Para esto se hace una búsqueda a partir de la posición del cursor Centroid, para lo que primero se da un movimiento de un punto a la izquierda, para posteriormente hacer un movimiento secuencial de 2 hacia la derecha. En el proceso se va comparando el valor de la ordenada con el de umbral o referencia (*ho*), hasta encontrar el pico. El valor de referencia está determinado por el nivel vertical del cursor Centroid, que define el usuario. Sin embargo, la definición del pico no sólo está en función de ésta posición, sino que también está en función del nivel del background, *hb*, definido para la ventana (como se explica más adelante) y por los flancos de ascenso y descenso del pico. La Figura 3-15 y el diagrama de flujo de la Figura 3-16, ayudan a comprender el algoritmo utilizado para la detección y definición del pico.

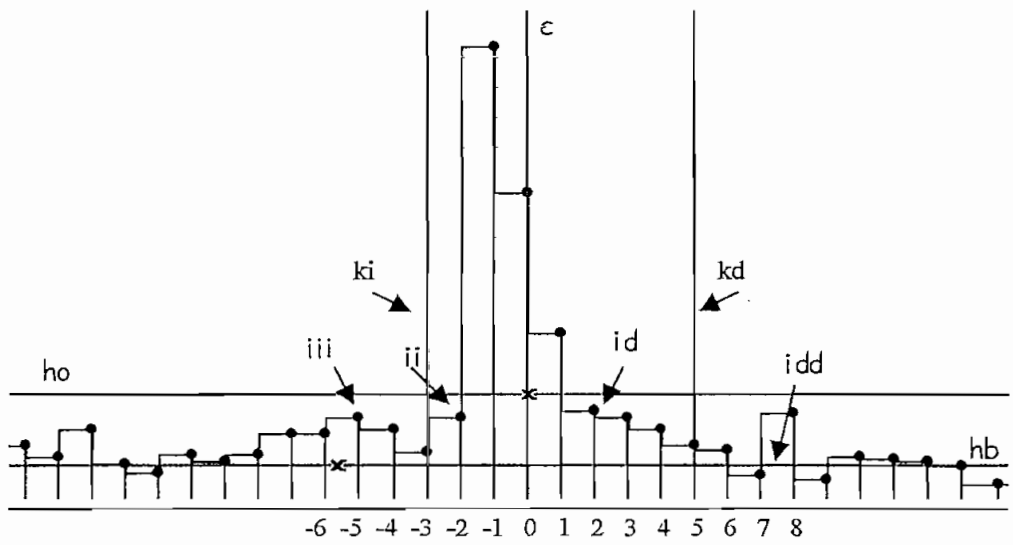


Figura 3-15 Parámetros que intervienen en la detección y definición del pico. La región azul comprende el pico definido

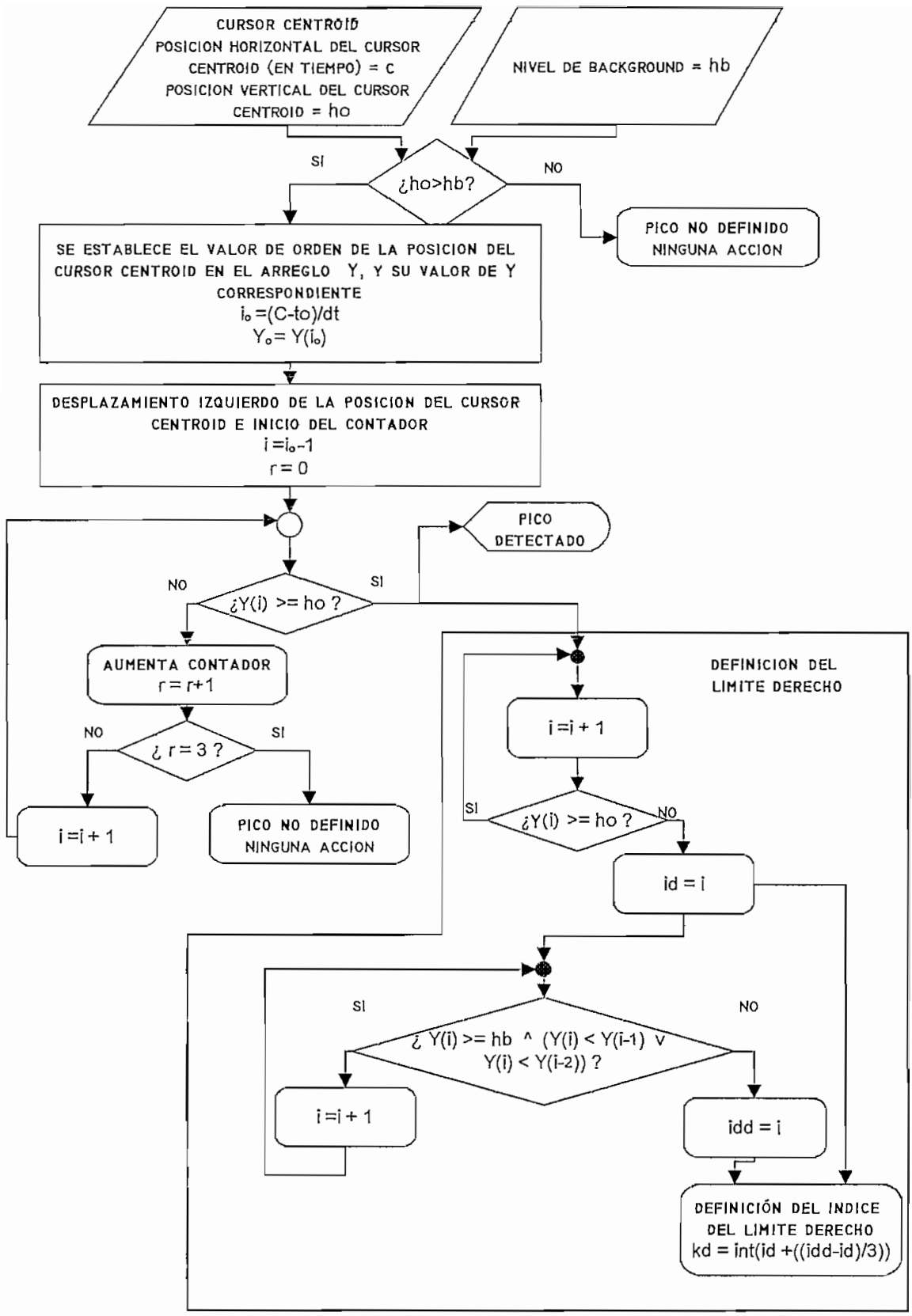


Figura 3-16 Diagrama de flujo para la detección y definición del pico

En el diagrama de flujo se detalla solo el algoritmo usado para el cálculo del límite derecho, puesto que el cálculo del límite izquierdo es similar.

Una vez que el pico es localizado y definido se definen sus valores de centroide y de resolución (como se explica más adelante). Adicionalmente, el cursor Centroid se ubica en el valor del centroide calculado, mientras que los cursores Cur izq y Cur der se activan y delimitan la región del pico, debido a que la ventana se extiende cinco puntos a la izquierda y a la derecha de los límites del pico (Figura 3-17 ventana A).

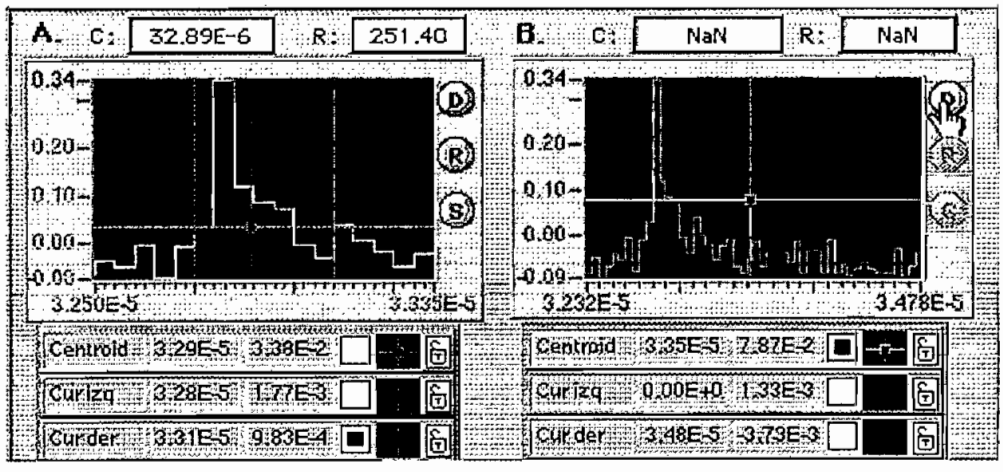


Figura 3-17 Características que se presentan en la definición de un pico. Ventana A: pico localizado. Ventana B: pico no localizado.

Si el algoritmo no localiza un pico, la región dentro de la ventana permanece invariable, los valores de centroide y resolución se establecen en NaN y los cursores Cur izq y Cur der permanecen desactivados (Figura 3-17 ventana B).

En caso de que no se detecte un pico en la posición inicial del cursor Centroid, es necesario ubicarlo adecuadamente en las cercanías de alguna región en forma de pico, pues como se explicó anteriormente, son las posiciones: horizontal y vertical de este, las que definen el inicio de búsqueda del pico y el valor de umbral ho, respectivamente. Los dos valores, aunque determinados por el mismo cursor, se marcan independientemente. El reinicio de la búsqueda se la realiza presionando el mismo botón D y se lo puede ejecutar cuantas veces se lo desee.

Una vez que el pico es localizado se habilitan también los botones R (redefinir pico) y S (salvar pico) de la ventana respectiva, ver Figura 3-17 ventana A.

3.3.2.3.1. REDEFINICIÓN DEL PICO

Los picos detectados y determinados por el algoritmo pueden ser posteriormente modificados, de acuerdo con las necesidades del usuario, a través de la función de redefinición, como se explica a continuación.

En la función de redefinición, el usuario mueve los cursores Cur izq y Cur der a conveniencia. Con esto marca nuevos límites para el pico. Al presionar el botón R, lo

que se hace es recalcular el valor del centroide y de la resolución en función de los nuevos límites. Además, se recalculan los nuevos límites de la ventana.

3.3.2.3.2. ALMACENAMIENTO TEMPORAL DE LOS PICOS

Los picos definidos pueden almacenarse momentáneamente, ya sea para realizar la calibración, para su respectivo análisis en la escala de masas, o para presentarlo en el reporte.

El almacenamiento de un pico se lo realiza tomando los valores que lo representa, como son: los tiempos mínimo y máximo de la ventana, los valores mínimo y máximo en la ordenada, el centroide, la resolución y el nombre. Todos estos se agrupan en un clúster de 7 elementos (6 elementos numéricos y uno de texto), el que a su vez se anexa a un arreglo de clústers, el que finalmente contiene todos los picos y regiones que se van almacenando (ver Figura 3-18).

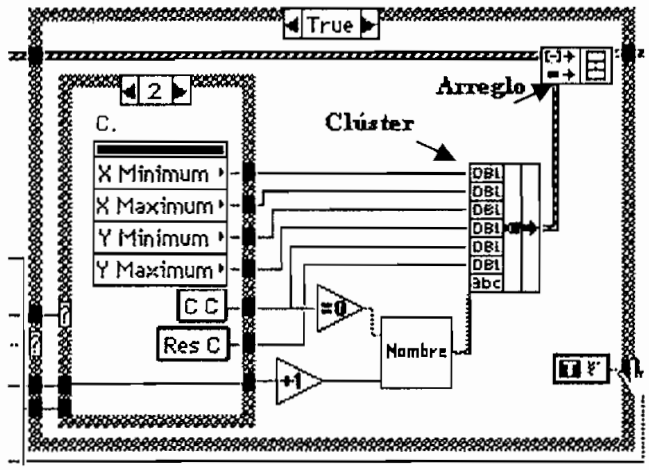


Figura 3-18 Diagrama del proceso de almacenamiento de un pico

No se ha adicionado, entre los elementos que se almacenan, los valores de la posición de los cursores que delimitan la región del pico. Esto con el fin de minimizar el tamaño del clúster y debido a que se conoce que existe una diferencia de 5 puntos entre estos y los valores mínimo y máximo horizontales de la ventana, respectivamente.

Adicionalmente a este proceso, el nombre del pico se anexa a una lista visible para el usuario (ver Figura 3-13, lista PICOS DEFINIDOS), en la que se van adjuntando todos los picos almacenados, con el fin de permitir una fácil selección del pico con el que se desea trabajar posteriormente.

3.3.2.3.3. LECTURA DE LOS PICOS ALMACENADOS

Debido a la necesidad de que los picos almacenados se puedan presentar nuevamente en cualquiera de las ventanas, sea porque se definieron nuevas regiones sobre las ventanas

usadas para su almacenamiento, o por cualquier otro motivo, se ha desarrollado el software que se describe a continuación.

Para el proceso de lectura se hace necesario, primero separar los picos de las regiones almacenadas, luego del arreglo de clústers separar al elemento clúster que contiene las características del pico deseado, para finalmente desagrupar sus elementos y enviarlos a los atributos del gráfico en el que será mostrado. Todo este proceso se sintetiza en la Figura 3-19.

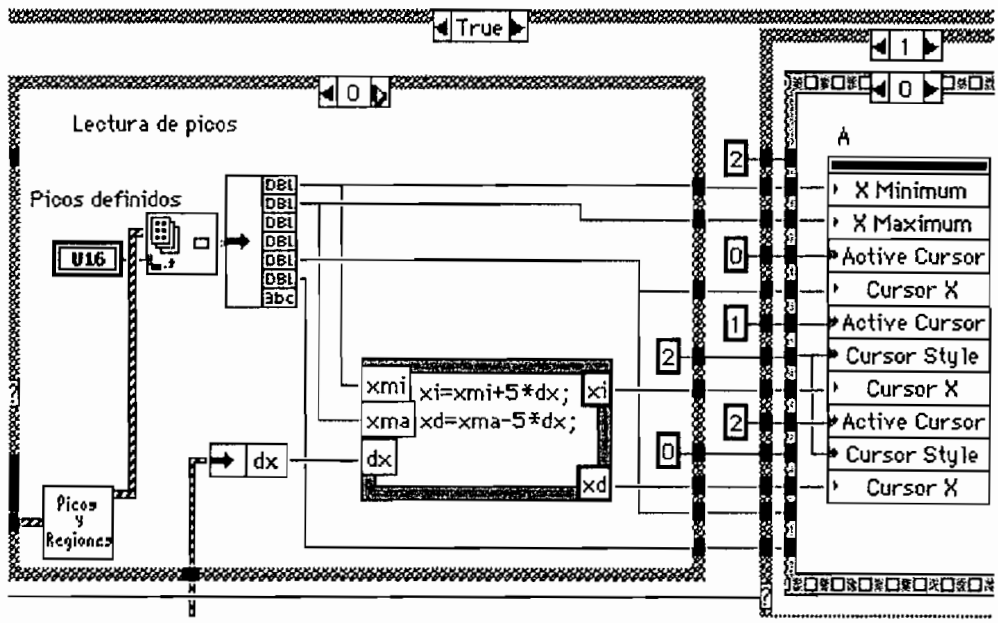


Figura 3-19 Diagrama del proceso de lectura de un pico

Debido a que, como se dijo anteriormente, no se incluyen entre los elementos que se almacenan los valores de la posición de los cursores que delimitan la región del pico, se realiza el cálculo de los mismos en base a los valores límites horizontales de la ventana, como se puede apreciar en la Figura 3-19.

Por lo que, al leer los picos en las ventanas secundarias, se muestran nuevamente las características bajo los cuales fueron almacenados, con los mismos valores de centroide y resolución. Habilitándose también los botones R (redefinir pico) y S (salvar pico) de la ventana respectiva.

Al leer los picos en la ventana PRINCIPAL, solo se los puede visualizar, puesto que esta ventana carece de indicadores de centroide y resolución.

3.3.2.3.4. CÁLCULO DEL VALOR DE BACKGROUND

El background o valor de fondo del espectro es como una especie de ruido presente en todos los espectros MALDI, producido por las variaciones de temperatura que experimenta el detector, así como también por las fragmentaciones que se producen en la muestra.

El background, *hb*, es utilizado en este programa para la definición del pico, ya que su valor sirve como un nivel de referencia para indicar donde empieza la base del pico.

Con este propósito, se decidió permitir que el usuario defina el background. Para esto debe introducir un valor de porcentaje de puntos, el cual es individual para cada ventana secundaria, y que por defecto tienen el valor de 10 (dentro de un rango de 1 a 100).

El método consiste en ordenar en forma ascendente el arreglo de los valores Y (voltaje) de todo el espectro. Luego, de este arreglo ordenado ascendentemente, se toma desde el valor más bajo del arreglo, el número de puntos correspondientes al valor del porcentaje ingresado por el usuario (de la ventana en la que se está definiendo el pico), los cuales se consideran como valores que se encuentran bajo la línea de background. El valor del background corresponde así al más alto del grupo seleccionado de esta manera. Todo este proceso se consigue con el arreglo de la Figura 3-20.

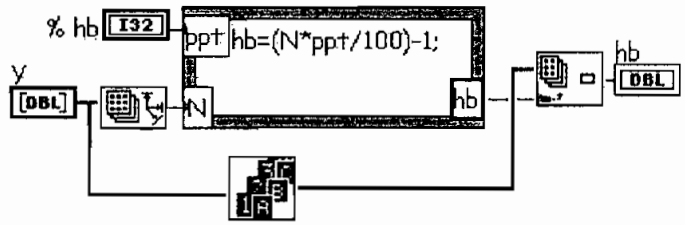


Figura 3-20 Diagrama del cálculo del valor del background

3.3.2.3.5. CÁLCULO DEL CENTROIDE DE UN PICO

El valor del centroide de un pico se determina aplicando la siguiente fórmula, la cual es muy similar a la del cálculo de un centroide de masas en un sólido:

$$\bar{c} = \frac{\sum_{i=t_o}^{t_f} t_i * y_i}{\sum_{i=t_0}^{t_f} y_i} \qquad (25)$$

donde

t_o	es el límite horizontal izquierdo del pico
t_f	es el límite horizontal derecho del pico
t_i	son los valores de tiempo
y_i	son los valores de la intensidad del pico

Debido a que el subarreglo de los valores de Y (voltaje) que define al pico puede contener valores negativos que afecten la determinación del centroide y por ende de la resolución (este último se encuentra ligado al primero, como se verá más adelante), de los valores que conforman el subarreglo se determina su menor valor y se lo resta al subarreglo inicial, con esto se pasa a los valores de Y a una escala positiva, y es este nuevo subarreglo el utilizado para el cálculo del centroide.

3.3.2.3.6. CÁLCULO DE LA RESOLUCIÓN DE UN PICO

Como se explicó en el Capítulo 1.3.4.6 la resolución de un pico se la determina mediante la relación (22):

$$R = \frac{t}{2 * \Delta t} \tag{22}$$

donde

t	es el valor del centroide
Δt	es el ancho del pico medido a la mitad de la amplitud máxima del mismo (fwhm)

El valor de t, que corresponde al centroide se lo toma del resultado anterior. Para el cálculo del ancho, Δt, se ha diseñado el siguiente procedimiento: una vez que se tiene definido el subarreglo de los valores de Y que conforman el pico, se determina el valor máximo del subarreglo y se lo divide para 2. Este valor, que es la mitad de la amplitud máxima, se utiliza como entrada de umbral (*threshold*) de la función *Threshold 1D Array*, función que permite buscar en un arreglo de 1 dimensión un par de valores tales que el threshold sea más grande que el primer valor y menor o igual que el segundo valor. Con este método se ubica el punto izquierdo a media altura, tal como se muestra en la Figura 3-21 secuencia 1. Para el cálculo del punto derecho se invierte el orden del arreglo con la función *Reverse 1D Array* y se repite el procedimiento anterior, con la diferencia de que como se invirtió el orden del subarreglo, se debe restar este valor del número de elementos que conforman el subarreglo menos uno. La medida del ancho se determina por diferencia de los valores encontrados (Figura 3-21 secuencia 2).

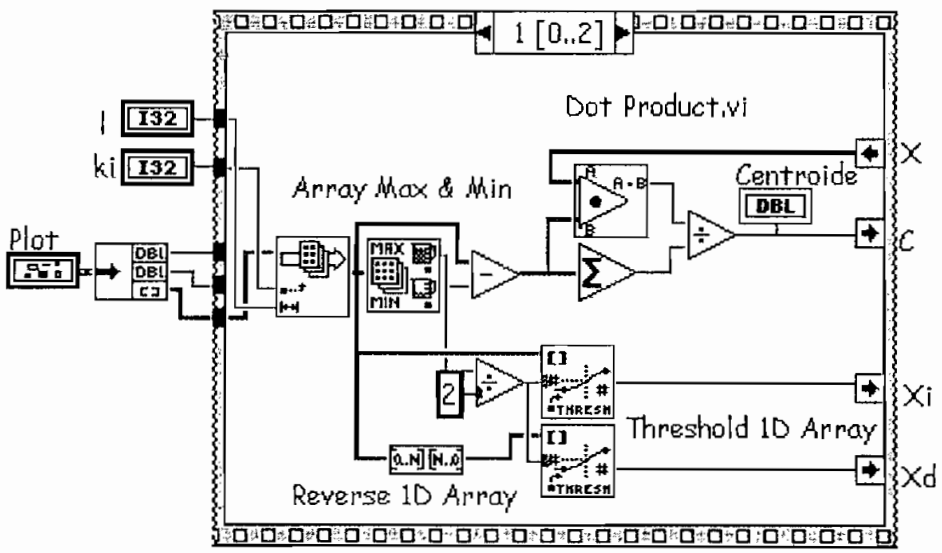


Figura 3-21 Diagrama del cálculo de la resolución de un pico (Secuencia 1)

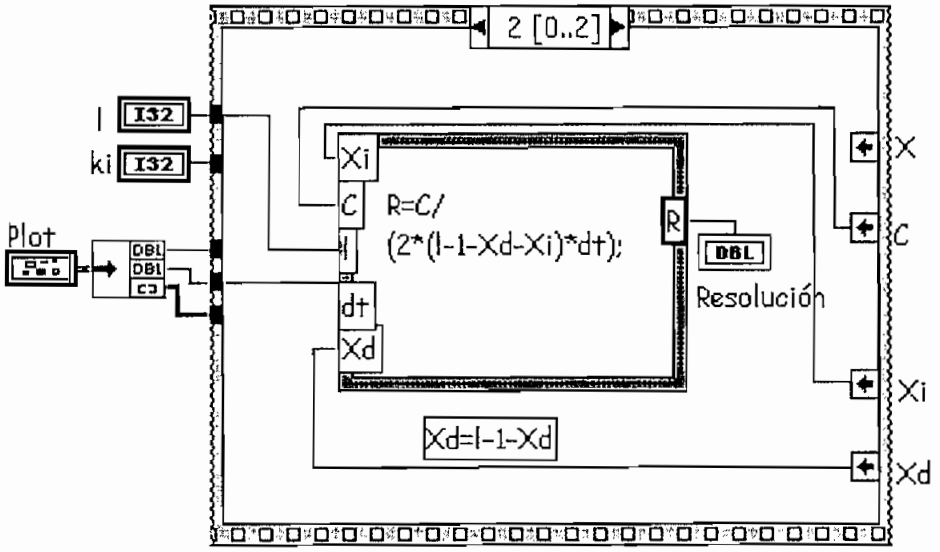


Figura 3-21 Diagrama del cálculo de la resolución de un pico (Secuencia 2)

3.3.2.4. ALMACENAMIENTO DE UNA REGIÓN

Una utilidad adicional permite al usuario almacenar regiones enteras del espectro, la cual se usa primordialmente en la generación de reportes.

El proceso es similar al almacenamiento de los picos, con la diferencia de que sólo se la puede realizar desde la ventana Principal. Las regiones se definen de igual manera que los picos y se almacenan con la misma información adicional, excepto el valor del centroide y la resolución que no pueden definirse en este caso (se almacenan con valor cero).

De igual forma, el proceso de lectura de regiones es similar a la de lectura de los picos, con la diferencia de que cuando se leen en las ventanas secundarias los valores de los indicadores de centroide y resolución se establecen en NaN (not a number).

3.3.3. SOLUCIÓN MATEMÁTICA DE LA ECUACIÓN DE CALIBRACIÓN

Las calibraciones generan un grupo de valores que se convierten en parámetros de la ecuación de tiempo de vuelo, tal como se explica en el Capítulo 1.

En **Aldebarán** se han implementado varios procedimientos para hallar la solución matemática de la ecuación de calibración, con distintos grados de precisión y que dependen de la información asequible al usuario.

Es necesario, para algunas calibraciones, contar con picos definidos y almacenados previamente. Todas las calibraciones presentan en el panel frontal la ecuación de calibración usada y una señal de error para indicar al usuario que se ha cometido algún resultado erróneo durante el proceso de calibración. Además, las calibraciones en las que se aplica algún tipo de regresión para el cálculo de los coeficientes, muestran el valor del error cuadrático medio (Mean Squared Error, m.s.e.) con el fin de establecer que tan bueno fue el ajuste realizado. Las calibraciones implementadas son:

3.3.3.1. CALIBRACIÓN DESDE ARCHIVO

Mediante esta opción se puede utilizar una calibración previamente realizada y almacenada. Al ingresar a la pantalla de esta opción, todas las calibraciones archivadas se enlistan en función de su nombre (etiqueta), tal como se muestra en la Figura 3-22.

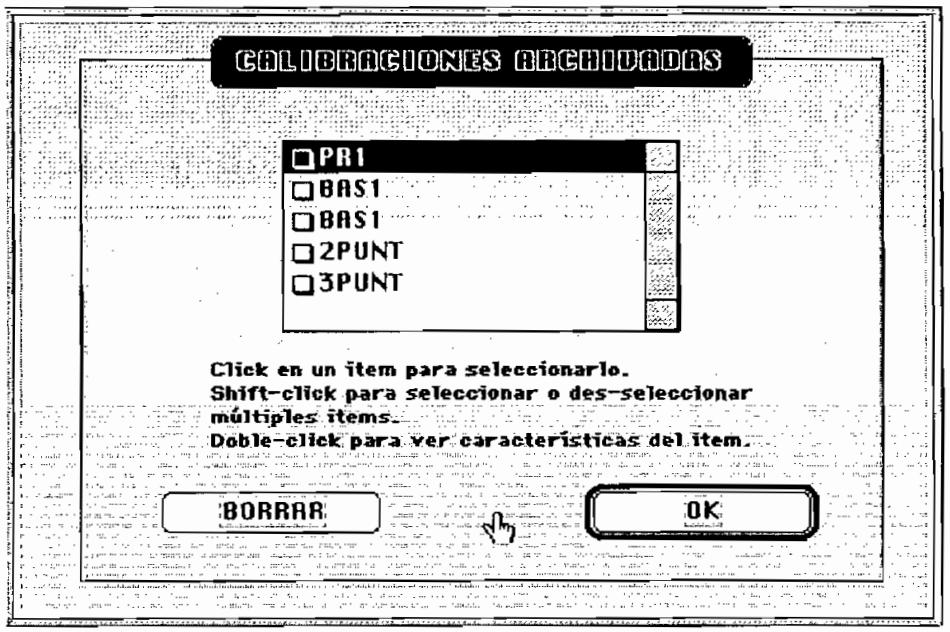


Figura 3-22 Pantalla de calibraciones archivadas

El usuario puede examinar las condiciones bajo las cuales la calibración seleccionada se almacenó, dando doble click en una de estas, con lo que se presenta la nueva pantalla de la Figura 3-23.

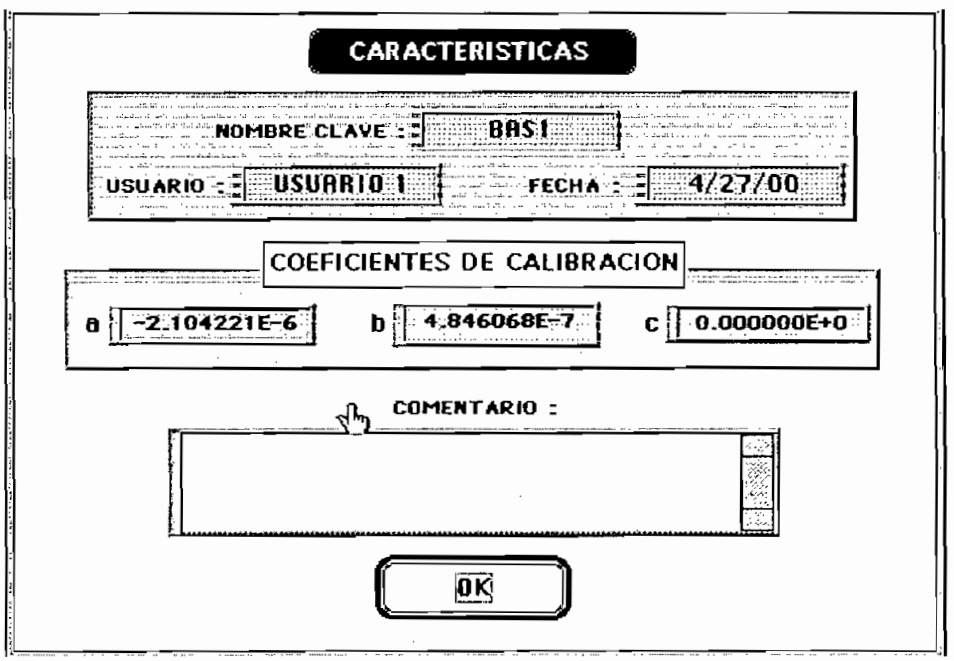


Figura 3-23 Pantalla de características de una calibración de archivo

Adicionalmente, desde aquí se pueden borrar calibraciones almacenadas, si es que ya no son de utilidad, seleccionando el correspondiente ítem y presionando el botón BORRAR (Figura 3-22).

Para utilizar una de estas calibraciones en la conversión de escala, basta dar un click sobre el ítem y salir de la calibración.

Todo este proceso se inicia con el VI *Open/Create/Replace File* fijado en el modo Open (valor por defecto) y como entrada de *file path* la constante: Macintosh HD:Aldebarán:Calibraciones.txt, correspondiente a la dirección del archivo donde se almacenan todas las calibraciones. Este VI es el encargado de abrir el archivo y realizar la lectura del tamaño del archivo en bytes. Este VI se lo interconecta al VI *Read File+ (string)*, a través de los refnum (número de referencia del archivo abierto) y de los clúster de error, para que realice la lectura del archivo en base al número de bytes, los diagramas de la Figura 3-24 muestran como se efectúa esto. Como toda la información almacenada se encuentra separada por delimitadores, se procede a separarla en un arreglo de dos dimensiones, en la que cada fila corresponde a una calibración y las columnas corresponden a sus características.

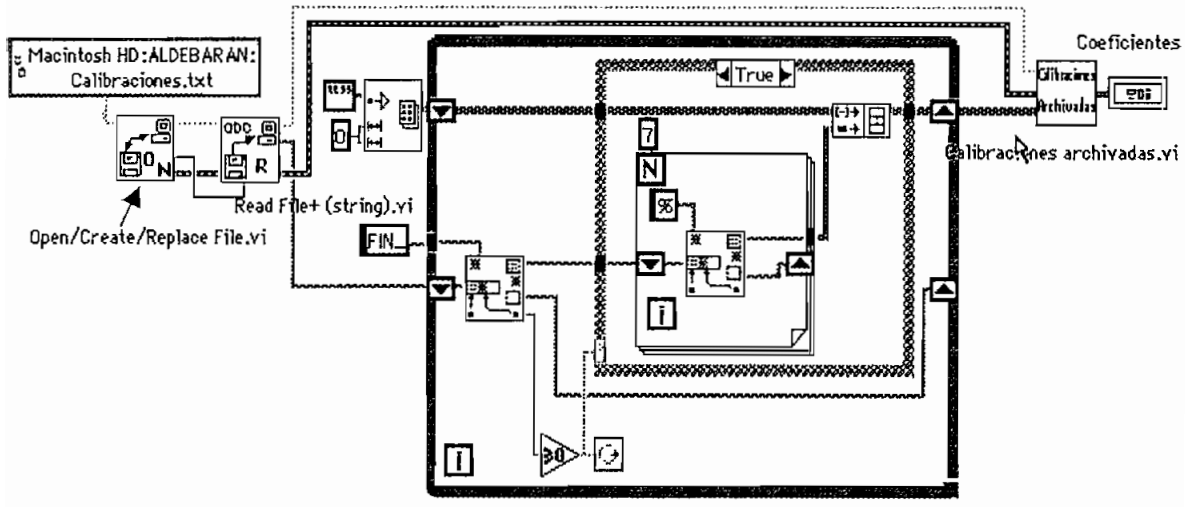


Figura 3-24 Proceso de lectura de las calibraciones archivadas

Una vez realizado esto, se traslada este arreglo al VI *Calibraciones Archivadas*, en el que se toma la columna correspondiente a las etiquetas de las calibraciones y se envía a un listbox para su presentación al usuario, a través de su atributo *Item Names*, siguiendo la lógica de la Figura 3-25. También se utiliza el atributo *Double-Click* del listbox, para controlar el ingreso a la pantalla de despliegue de las características de la calibración seleccionada, para la cual previamente se separa la fila correspondiente a la calibración seleccionada.

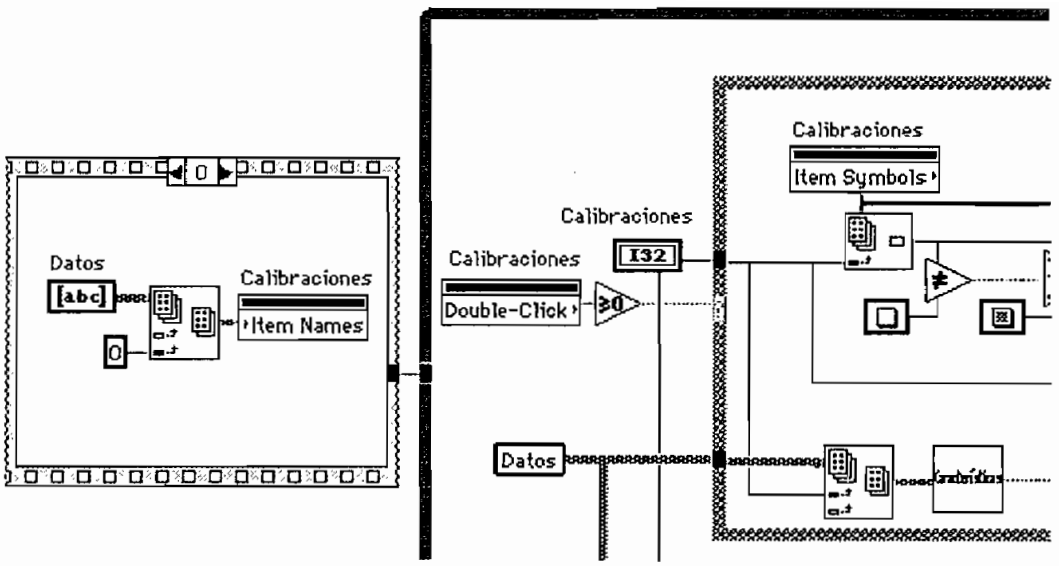


Figura 3-25 Proceso de presentación de las calibraciones archivadas

Para el caso de que se elija borrar una calibración se ha construido el VI *Borrar fila arreglo de string 2-D*, que permite borrar una fila de un arreglo de strings de dos dimensiones. Luego, toda la información del arreglo sobrante, se la convierte en una sola cadena de texto separando los elementos con delimitadores de texto. Esta cadena de texto se conecta a la entrada *strings* del *VI Write File+ (string)*, el cual realiza el almacenamiento en el mismo archivo, para lo cual previamente se establece el *end of file* (final del archivo) al inicio del mismo, a través del VI *EOF*. Este proceso se condensa en Figura 3-26.

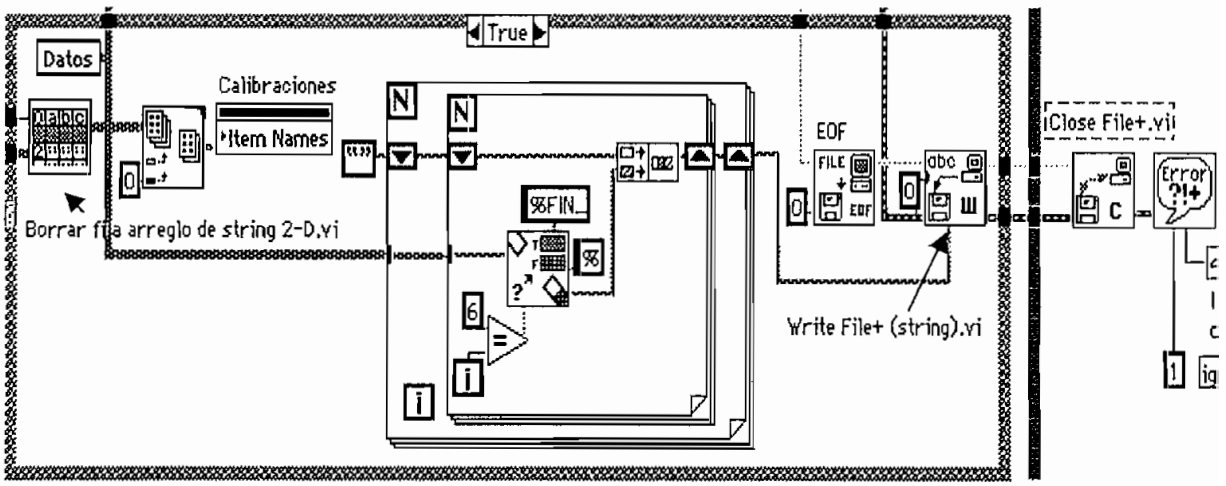


Figura 3-26 Proceso de borrado y realmacenamiento de las calibraciones archivadas

Finalmente, al salir de esta calibración se cierra el archivo a través del VI *Close File+*.

3.3.3.2. CALIBRACIÓN BÁSICA DE UN COEFICIENTE

La expresión matemática correspondiente a esta calibración es la ecuación 19. Para el cálculo del coeficiente *b* se utiliza una estructura fórmula node en la que se tienen como valores de entrada: el voltaje de aceleración usado y la longitud efectiva del tubo de vuelo (Figura 3-27). Los valores de estos parámetros son entregados por el usuario, aunque tienen valores por defecto de 0.97 m y 18000 V (Figura 3-28). Además, una vez que se ejecuta la calibración, se presenta el valor del coeficiente calculado y la señal de error.

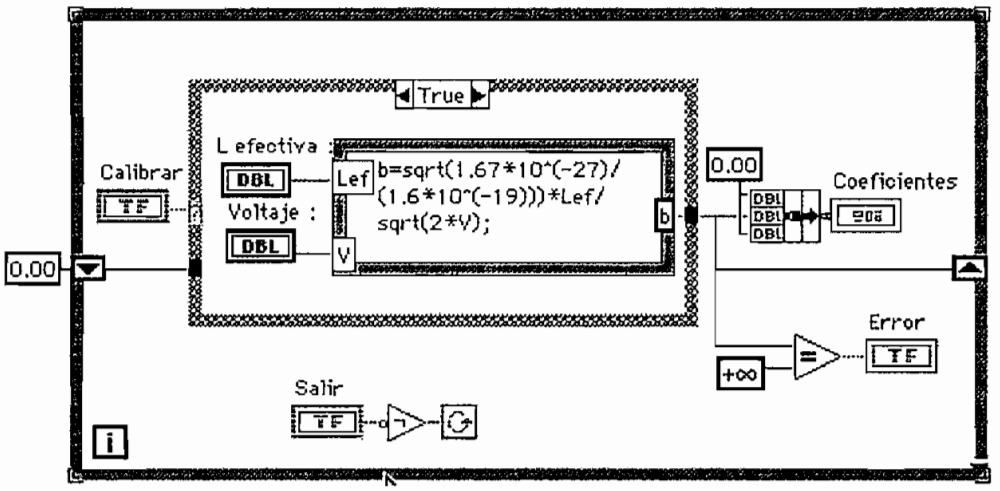


Figura 3-27 Diagrama de Calibración Básica de un coeficiente

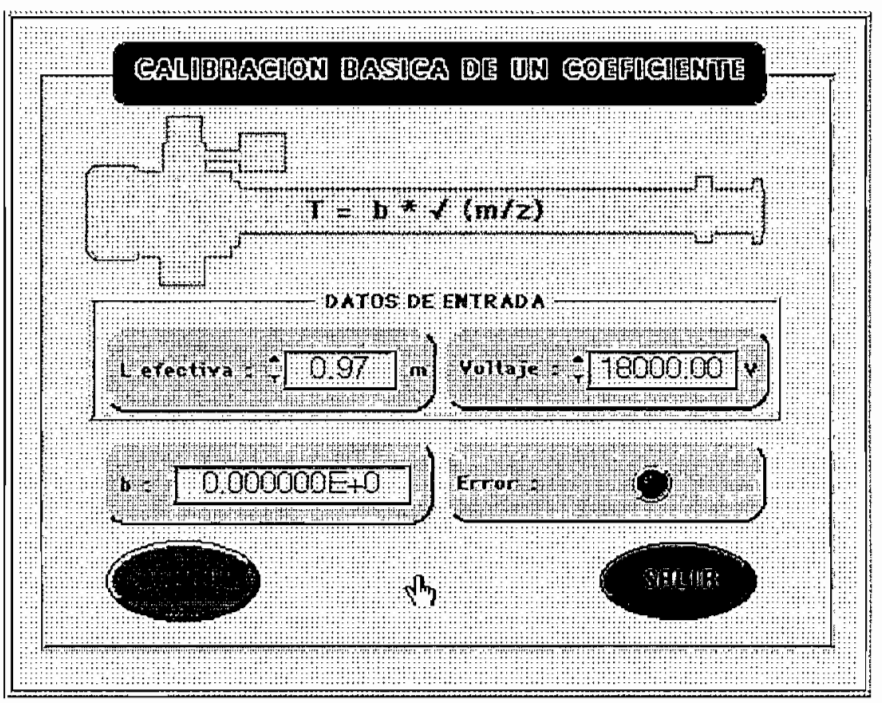


Figura 3-28 Pantalla CALIBRACIÓN BÁSICA DE UN COEFICIENTE

3.3.3.3. CALIBRACIÓN BÁSICA DE DOS COEFICIENTES (UN CALIBRANTE)

La expresión matemática correspondiente a esta calibración es la ecuación 20. Para su determinación se requiere que se haya definido y almacenado por lo menos un calibrante (pico de masa conocida) en la lista de picos.

El coeficiente *b* se lo determina en idéntica forma que en el caso anterior, y para el cálculo del coeficiente *a* se utiliza: el mismo coeficiente *b*, el valor del centroide en tiempo y el valor de la relación entre la masa y la carga del pico calibrante, como se muestra en la Figura 3-29.

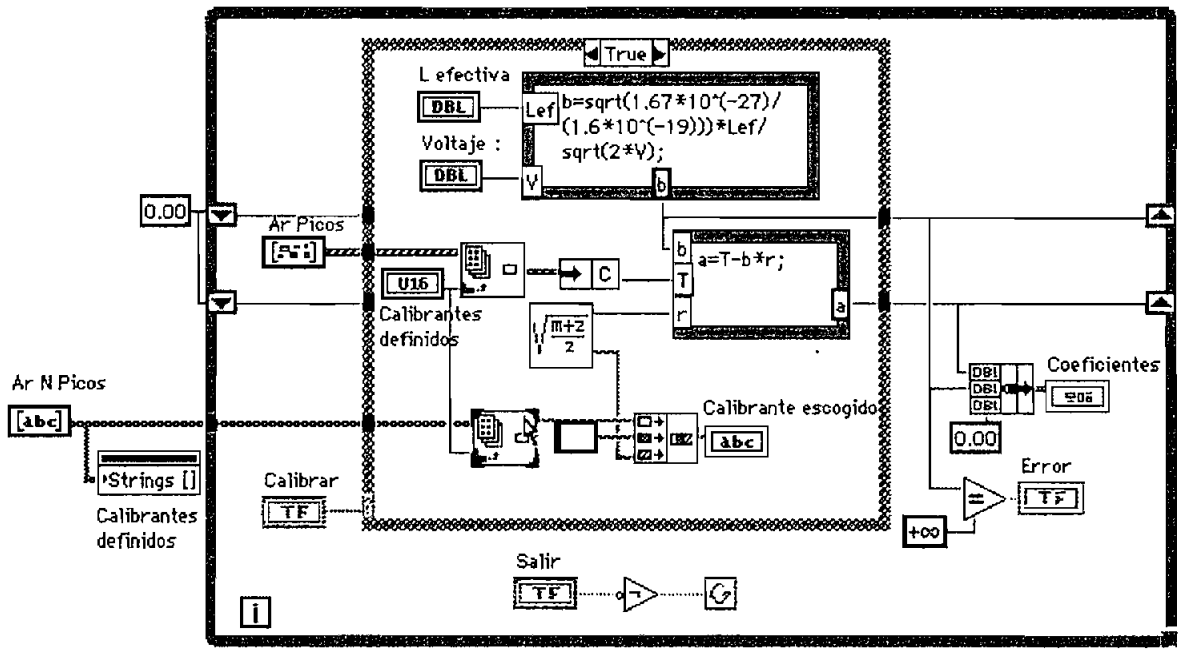


Figura 3-29 Diagrama de la Calibración básica de dos coeficientes

Para que el usuario pueda determinar que pico usar como calibrante, se requiere previamente enviar los nombres de todos los picos almacenados a una lista (lista CALIBRANTES DEFINIDOS de la Figura 3-30), en el mismo orden en el que fueron almacenados. Una vez que es elegido el pico de esta lista, se separa al elemento clúster que contiene las características del pico deseado, para finalmente tomar su valor de centroide y enviarlo a la entrada de la estructura fórmula node empleada para el cálculo del coeficiente *a* (Figura 3-29).

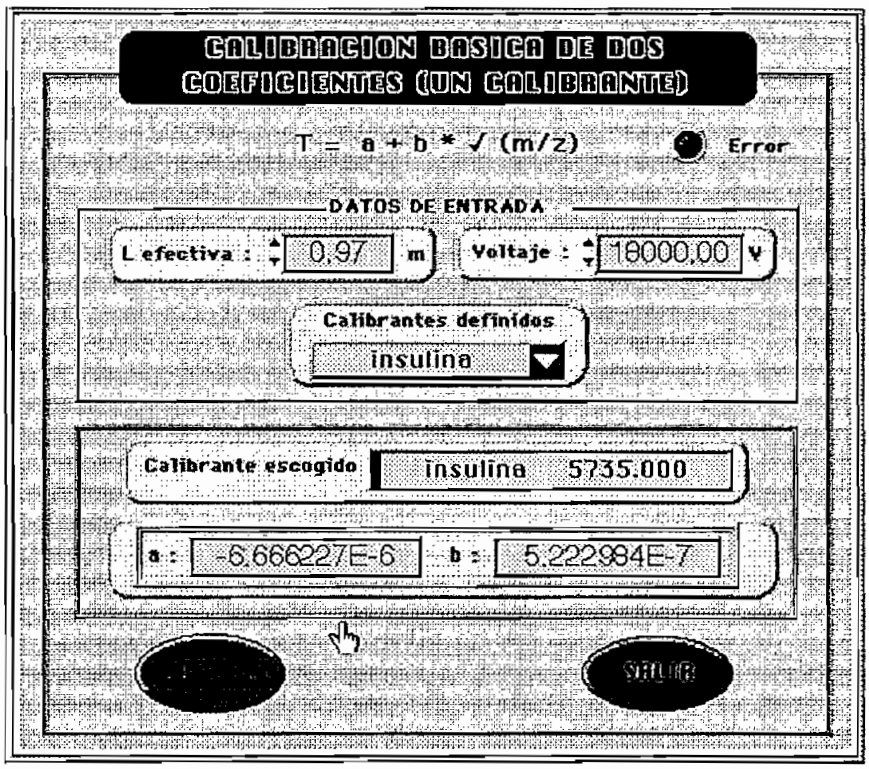


Figura 3-30 Pantalla de Calibración Básica de dos coeficientes

Adicionalmente, al seleccionar el pico como calibrante se presenta una pantalla para que el usuario asigne el valor de masa y de carga de la sustancia (Figura 3-31). Estos valores son usados para el cálculo del valor de la relación $\sqrt{((m+z)/z)}$, el cual es usado en el cálculo del coeficiente *a*, como se mencionó anteriormente.

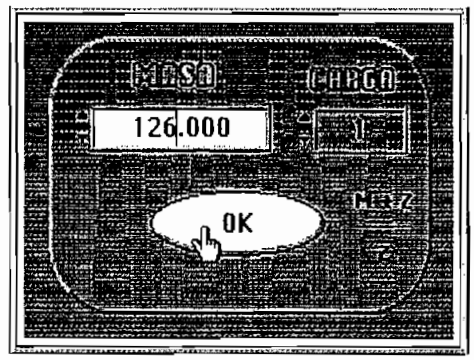


Figura 3-31 Pantalla de asignación de la masa y carga del calibrante

Con el fin de que el usuario verifique los datos del pico usado como calibrante, una vez que un pico es seleccionado como tal, su nombre se añade a la lista CALIBRANTE ESCOGIDO con su respectivo valor de la relación (m+z)/z, tal como se aprecia en la Figura 3-30.

Una vez que se ejecuta la calibración, se presenta el valor de los coeficientes calculados y la señal de error. Se puede reiniciar el cálculo sin salir de la pantalla.

3.3.3.4. CALIBRACIÓN DE DOS PUNTOS (2 O MÁS CALIBRANTES)

La expresión matemática correspondiente a esta calibración es también la ecuación 20. La diferencia con el método anterior es que ambos coeficientes se determinan a partir de dos o más picos conocidos. Este método, inherentemente más preciso, utiliza regresión lineal para determinar la calibración. En la pantalla de calibración mostrada en la Figura 3-32, se presenta como resultados a más de los coeficientes de calibración y la señal de error, el valor del m.s.e. y el valor del coeficiente de correlación, r. (En el Anexo B se detallan las fórmulas empleadas para sus cálculos y el significado que tienen estos dos valores).

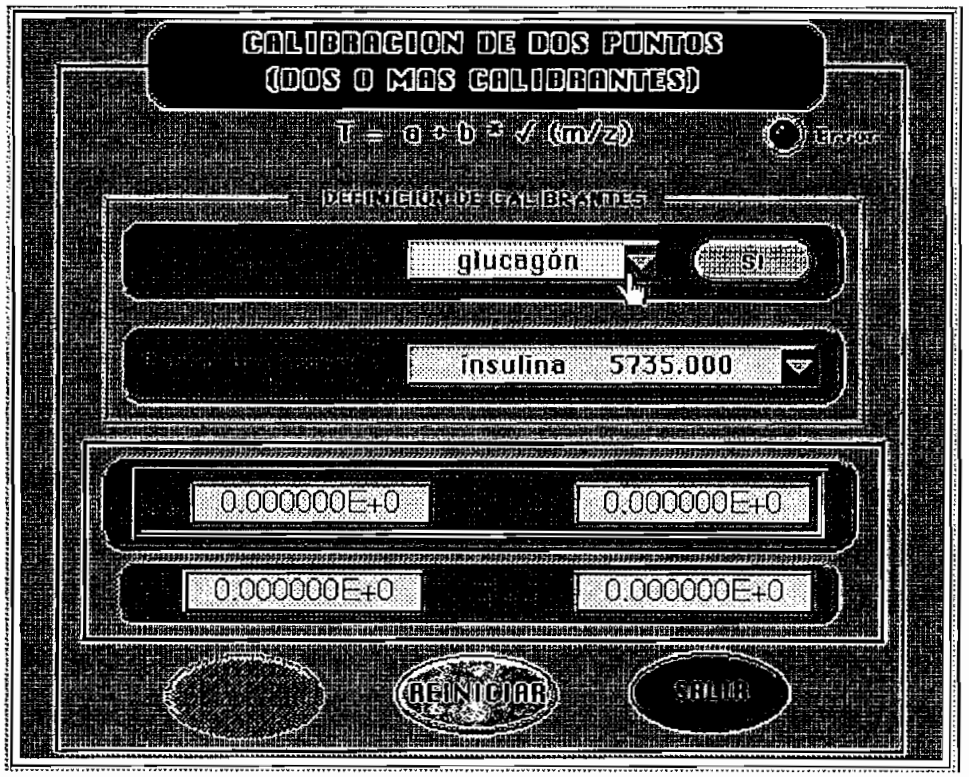


Figura 3-32 Pantalla CALIBRACIÓN DE DOS PUNTOS

Como se aprecia en la figura anterior, se puede reiniciar el cálculo de los coeficientes sin salir de la pantalla, lo cual implica el reseteo de la lista de los picos definidos como calibrantes.

El proceso de seleccionamiento de un pico como calibrante, es similar al caso anterior, con la diferencia de que en este caso, cada vez que se define a un pico como calibrante, sus valores de centroide y de la relación $\sqrt{((m+z)/z)}$se indexan en arreglos diferentes (Figura 3-33).

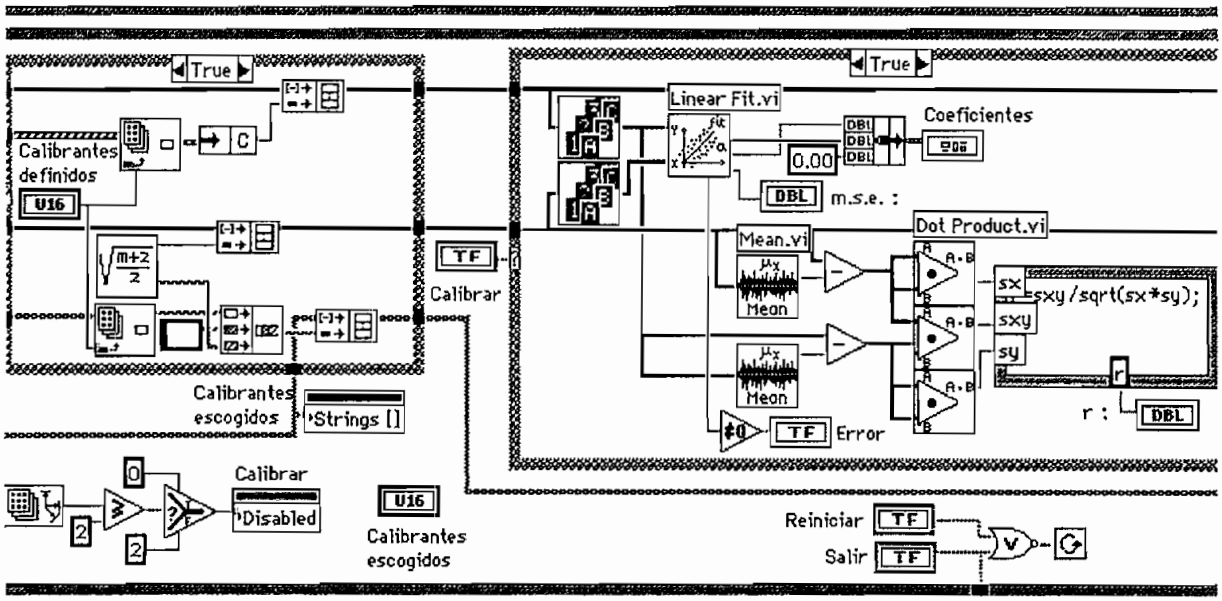


Figura 3-33 Diagrama del VI de Calibración de dos puntos

La regresión lineal se la realiza utilizando el VI *Linear Fit* y tomando como entrada de *Y values* los valores de centroide de los calibrantes y para *X values* los valores de la relación $\sqrt{((m+z)/z)}$ de los mismos calibrantes.

Debido a que el VI *Linear Fit*, sólo entrega el valor del m.s.e, fue necesario implementar el cálculo del valor del coeficiente de correlación, utilizando una estructura Formula Node y los VIs *Mean* y *Dot Product*, donde estos dos últimos determinan el valor medio de un arreglo y la suma de un producto de dos arreglos, respectivamente.

3.3.3.5. CALIBRACIÓN DE TRES PUNTOS (3 O MÁS CALIBRANTES)

La expresión matemática correspondiente a esta calibración es la ecuación 21 hasta el tercer término (*c*). En este caso para determinar los tres coeficientes se requiere partir de tres o más picos conocidos. Este método utiliza una regresión polinomial de orden 2 para determinar los coeficientes de calibración, donde la variable del polinomio es $\sqrt{(m/z)}$. En la pantalla de calibración mostrada en la Figura 3-34, se presenta como resultados a más de los coeficientes de calibración y la señal de error, el valor del m.s.e.. También, se puede reiniciar el cálculo de los coeficientes sin salir de la pantalla, lo cual implica el reseteo de la lista de los picos definidos como calibrantes.

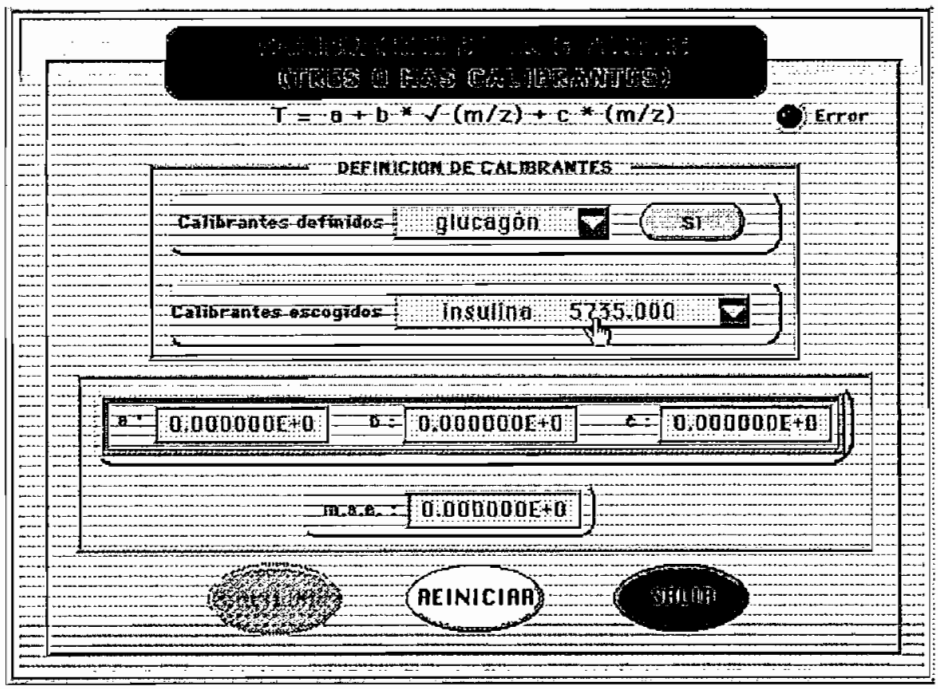


Figura 3-34 Pantalla CALIBRACIÓN DE TRES PUNTOS

El proceso de seleccionamiento de un pico como calibrante, es similar al caso anterior.

La regresión polinomial se la realiza utilizando el VI *General Polynomial Fit*, donde se optó por el algoritmo de Givens, ya que durante la realización del programa fue el que menores valores de m.s.e arrojó. De igual forma que en el caso anterior, se tomó como entrada de *Y values* los valores de centroide de los calibrantes y para *X values* los valores de la relación √((m+z)/z) de los mismos calibrantes (Figura 3-35).

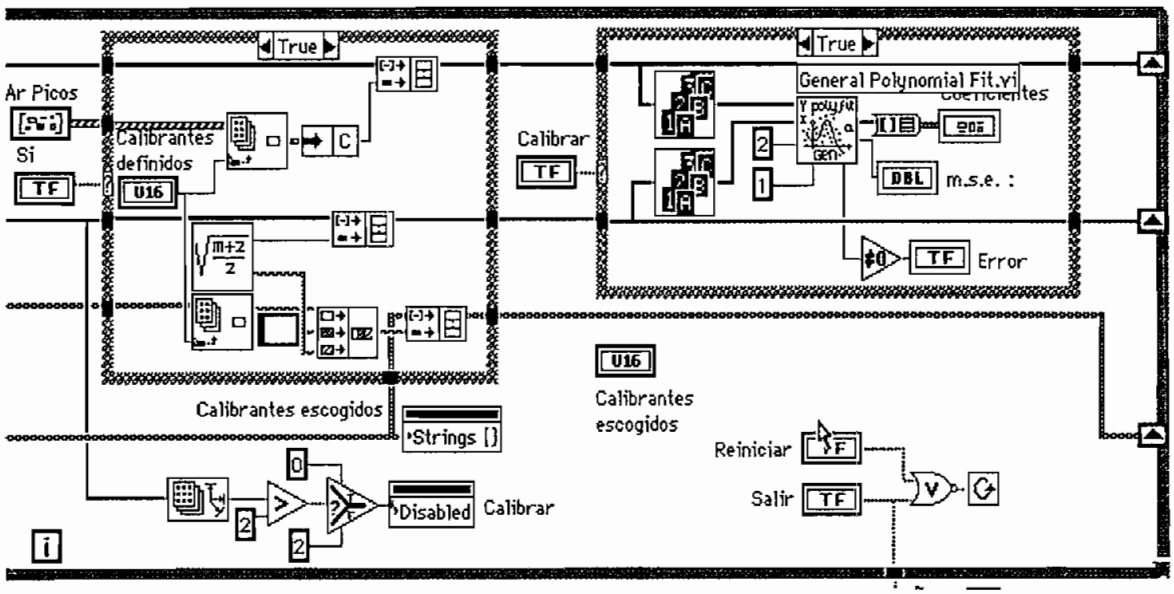


Figura 3-35 Diagrama del VI de Calibración de tres puntos

3.3.3.6. CALIBRACIÓN DE TRES PUNTOS (3 O MENOS CALIBRANTES)

La expresión matemática correspondiente a esta calibración es la misma que en el caso anterior, es decir la ecuación 21 hasta el tercer término (*c*). En este caso para determinar los tres coeficientes se requiere partir de tres o menos picos conocidos. Esta calibración aprovecha las características de los espectros de masas MALDI, en los que se encuentran generalmente picos correspondientes a la misma sustancia pero con diferente estado de carga. La identificación de estos picos para una sustancia problema permite utilizar un algoritmo que explote esta información. Este algoritmo se describe en la Figura 3-36.

En esta calibración básicamente, se trata de minimizar los errores cuadráticos totales (m.s.e.) para diferentes curvas de calibración del mismo tipo, en las que la relación masa a carga, m/z, de la sustancia desconocida (que tiene los múltiples estados de carga) se usa como un parámetro más, el mismo que se varía en un rango dado, de acuerdo con el algoritmo. En este tipo de calibración se utiliza una regresión polinomial de orden 2 y se establece una correlación entre diferentes valores del parámetro m/z y el m.s.e. en cada caso. Mediante una interpolación adecuada se determina el valor de m/z para el que este error es mínimo. El resultado de la interpolación se lo usa para establecer la ecuación de calibración. Para este método se requiere contar con valores iniciales aceptables de todos los parámetros involucrados en la ecuación de calibración, incluyendo m/z. Para esto se puede partir de una calibración previa anterior del mismo espectro. Es recomendable contar con al menos un calibrante en este método para asegurar la convergencia.

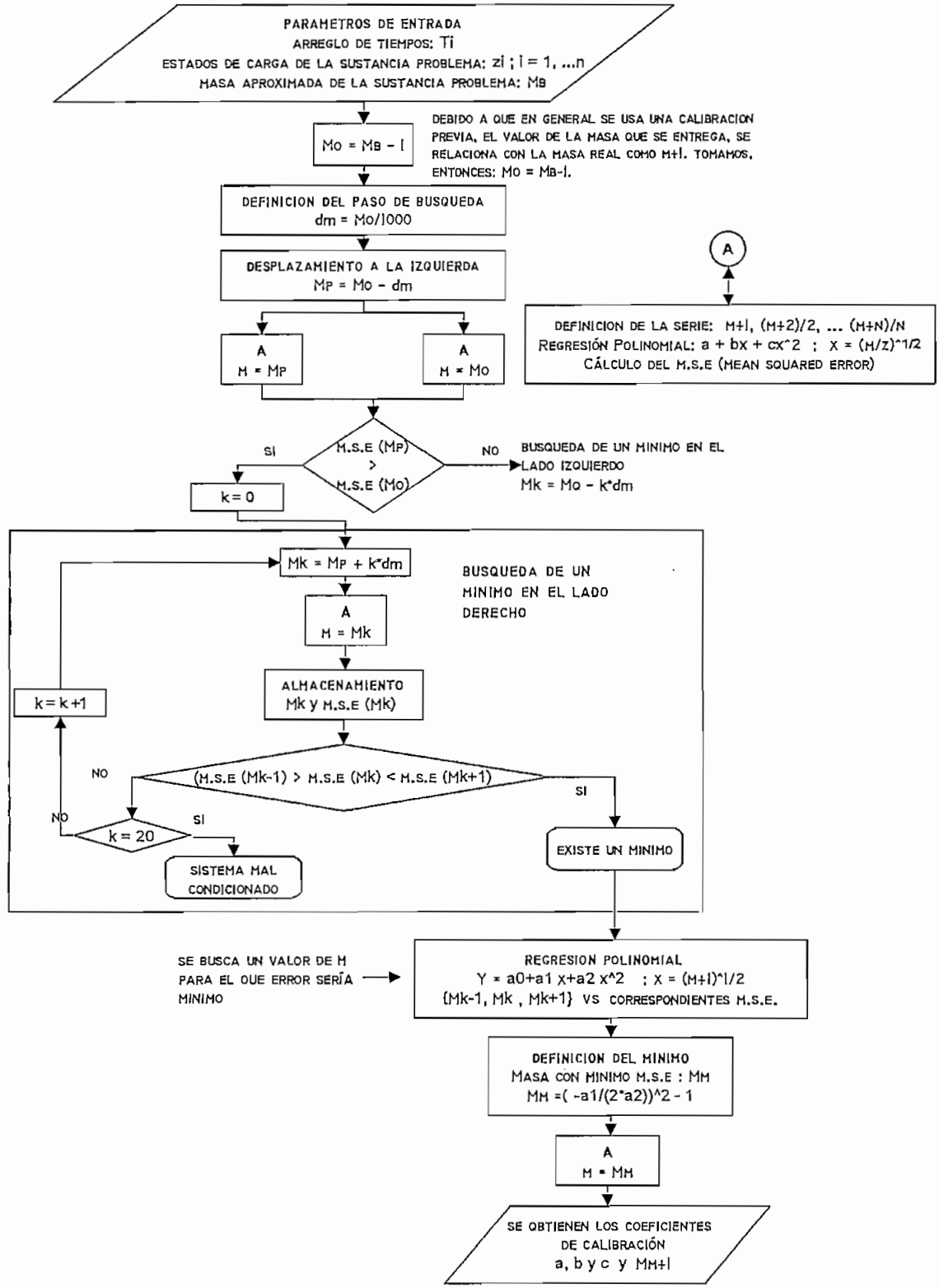


Figura 3-36 Diagrama de flujo para la calibración de tres puntos cuando se tienen tres o menos calibrantes

El proceso de seleccionamiento de un pico como calibrante, es similar al caso anterior. Solo se ha añadido la capacidad de definir a un pico como parte de la serie de la sustancia protonada por medio del botón MASA, tal como se muestra en la Figura 3-37.

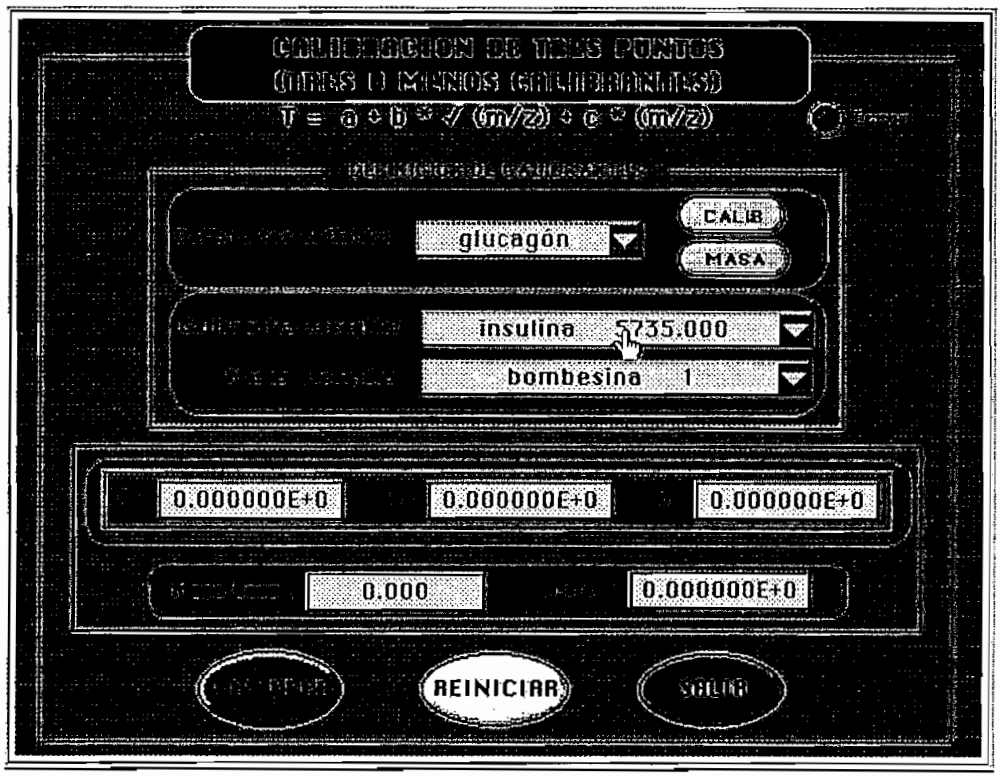


Figura 3-37 Pantalla CALIBRACIÓN DE TRES PUNTOS (3 calibrantes o menos)

Al seleccionar un pico como de dicha serie, se presenta una pantalla para que el usuario asigne el valor de la carga (Figura 3-38).

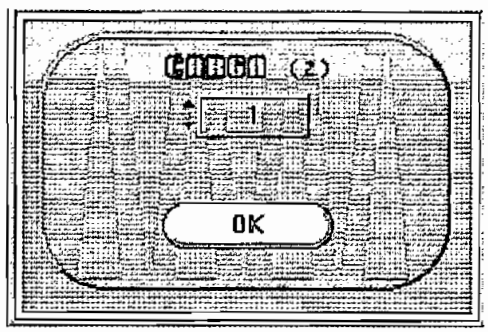


Figura 3-38 Pantalla de asignación de la carga a un pico perteneciente a la serie de la sustancia de masa desconocida

Y de idéntica forma con lo que pasa al definir un pico como calibrante, con el fin de que el usuario verifique los datos del pico usado como de la serie protonada, su nombre se añade a una lista (lista MASAS ESCOGIDAS) con su respectivo valor de carga (Figura 3-37).

En la pantalla de calibración mostrada en la Figura 3-37, se presenta como resultados a más de los coeficientes de calibración y la señal de error, el valor del m.s.e. y la masa base de la sustancia desconocida. De igual forma, se puede reiniciar el cálculo de los coeficientes sin salir de la pantalla, lo cual implica el reseteo de la lista de los picos definidos como calibrantes y como masas de la serie protonada.

3.3.3.7. ALMACENAMIENTO DE LA CALIBRACIÓN

Con el fin de que las calibraciones realizadas en una sesión puedan ser utilizadas en una nueva, se almacenan los coeficientes de calibración, incluyendo su nombre clave de identificación, el nombre del usuario, la fecha y su comentario respectivo, como se muestra en la Figura 3-39:

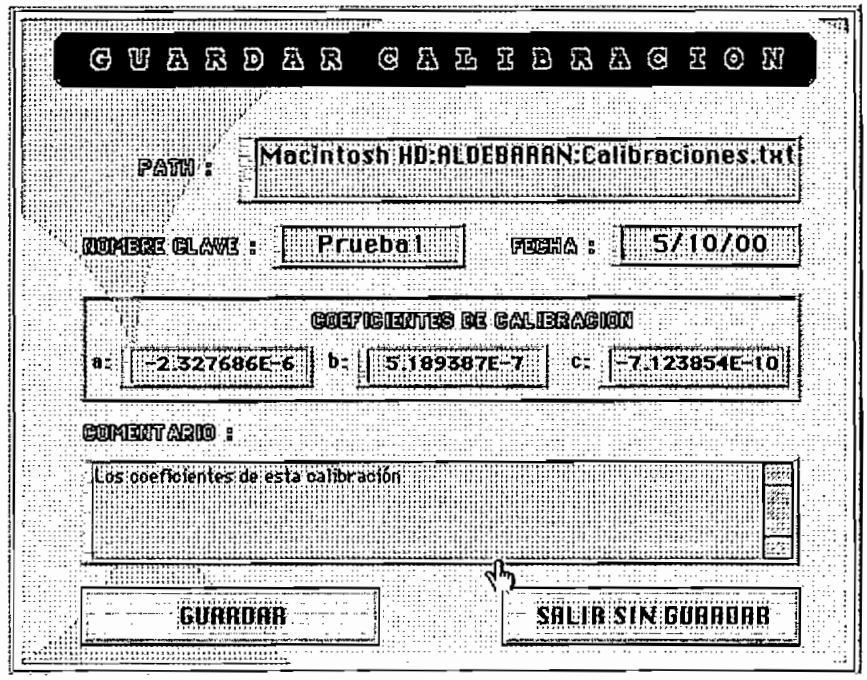


Figura 3-39 Pantalla de almacenamiento de la calibración

Todo este proceso se inicia con el VI *Open/Create/Replace File* fijado en el modo Open or Create y como entrada de *file path* la constante: Macintosh HD:Aldebarán:Calibraciones.txt, correspondiente a la dirección del archivo donde se almacenan todas las calibraciones. Este VI es el encargado de abrir o crear el archivo indicado, y se encuentra interconectado al VI *Write File+ (string)*, a través de los refnum (número de referencia del archivo abierto) y de los clúster de error, y es este el que realiza el almacenamiento de la información. Para que la información simplemente se anexe a la existente, se optó por el modo relative to end (valor por defecto). Como lo que se almacena es un string, previamente se convierte toda la información en una sola cadena de texto separando los elementos con delimitadores de texto. Finalmente, se cierra el archivo a través del VI *Close File+*. Este proceso se sintetiza en la Figura 3-40.

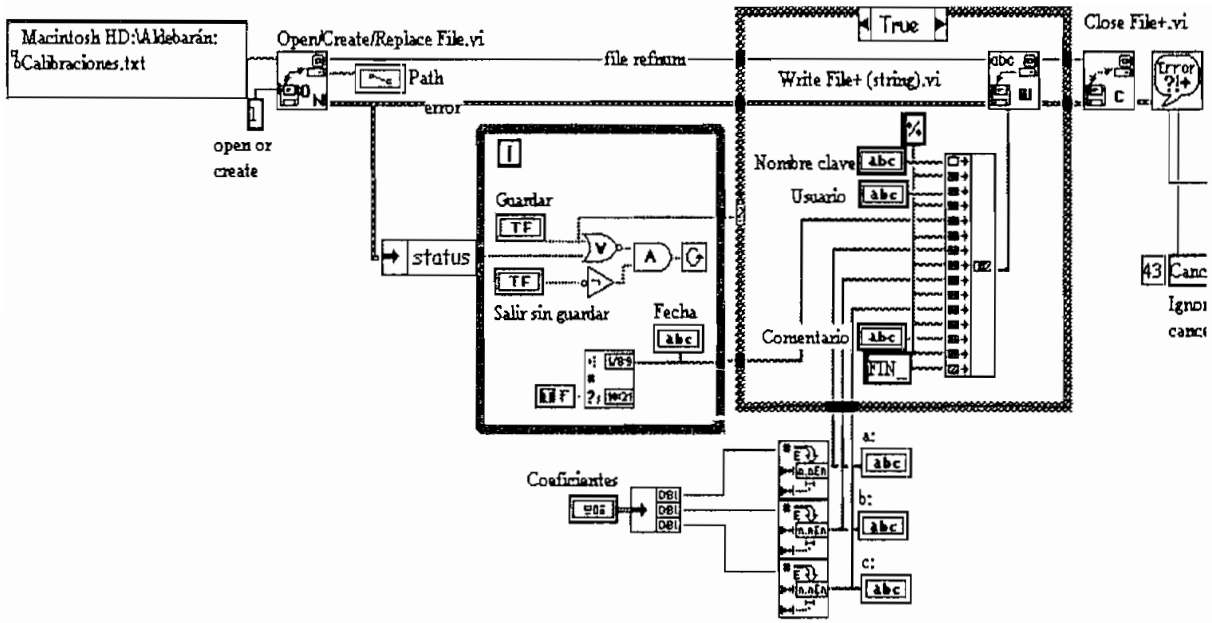


Figura 3-40 Diagrama el VI de almacenamiento de la calibración

3.3.4. CONVERSIÓN DE ESCALA DE TIEMPO A MASA

Una vez que se obtienen los coeficientes de la ecuación de calibración usada, es necesario despejar la variable (m/z) para pasar el espectro de la escala de tiempo a la escala de masas.

Antes de ejecutar el proceso de conversión, es necesario calcular el punto inicial a partir del cual se va a pasar de la escala de tiempo a la escala de masa, esto se lo realiza en dos pasos: primero eliminando los valores negativos de la escala de tiempo (que aparecen debido a la posición del trigger) ya que generarían valores negativos de masa; y el segundo paso, verificando a partir de que punto el valor en la escala del tiempo genera un valor positivo de masa ya que también se pueden generar valores negativos debido a la regresión que se haya aplicado.

Cuando se ha usado una ecuación de calibración de hasta de dos coeficientes, el despeje de la variable (m/z) es directo, pero para el caso de que se esté usando tres coeficientes se tiene una ecuación de segundo grado, por lo que es necesario aplicar algún método numérico de cálculo de raíces. El método que se usa es el algoritmo iterativo de punto fijo de primer orden con una tolerancia de 1E-7 (Ver Anexo C).

Se demostró durante la realización y pruebas que un método iterativo directo de conversión de escala, en el que para cada punto se resuelve el procedimiento para hallar la raíz, da buenos resultados con rapidez y que no es necesario recurrir a aproximaciones que introduzcan errores adicionales.

Para lograr esta rapidez de conversión, se utiliza el hecho de que los algoritmos para la búsqueda de raíces son muy sensibles al punto inicial de búsqueda. Entonces, el uso del valor inmediato anterior obtenido, como inicio para el proceso de determinar la raíz siguiente, acelera el proceso secuencial de conversión de escala, ya que reduce el número de iteraciones por punto, todo este proceso se resume en la Figura 3-41.

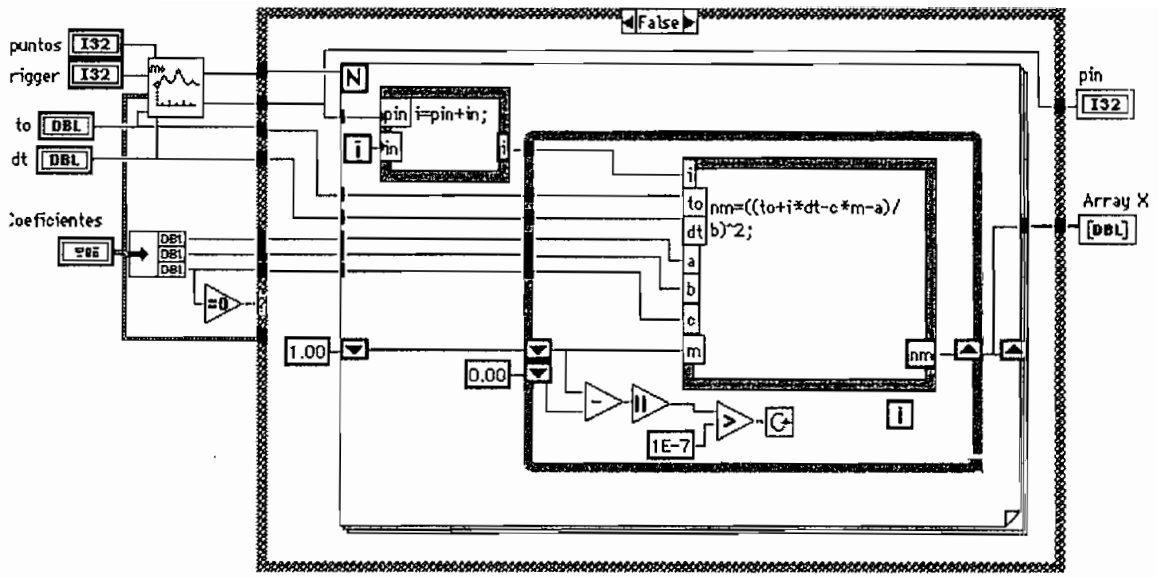


Figura 3-41 Proceso del método iterativo usado en la conversión de escala de tiempo a masa

Un inconveniente adicional durante la calibración, es que en la escala de masa no es posible usar el mismo tipo de gráfico empleado en la escala de tiempo (*Waveform Graph*: un valor inicial (to), un intervalo horizontal constante (dt) y un arreglo de valores de Y (Array Y)). Esta imposibilidad se debe a que en la escala de masa ya no se tiene un intervalo horizontal constante y por cada punto del arreglo de los valores de Y (los cuales no varían en la transición), se genera un valor de X, que no sigue una escala lineal. Así, lo que se logra es generar un vector (X_i, Y_i), que se grafica por medio de la función *Graph XY*.

Debido a este hecho de usar diferentes tipos de gráficos, se tuvo la necesidad de utilizar una nueva pantalla correspondiente a la escala de masas (pantalla MASA), en la que se tiene la misma capacidad de manipulación del espectro de la que se tiene en el tiempo, es decir, el usuario puede hacer acercamientos, definir, redefinir, almacenar y leer picos y regiones, a excepción de la operación de calibración (Figura 3-42).

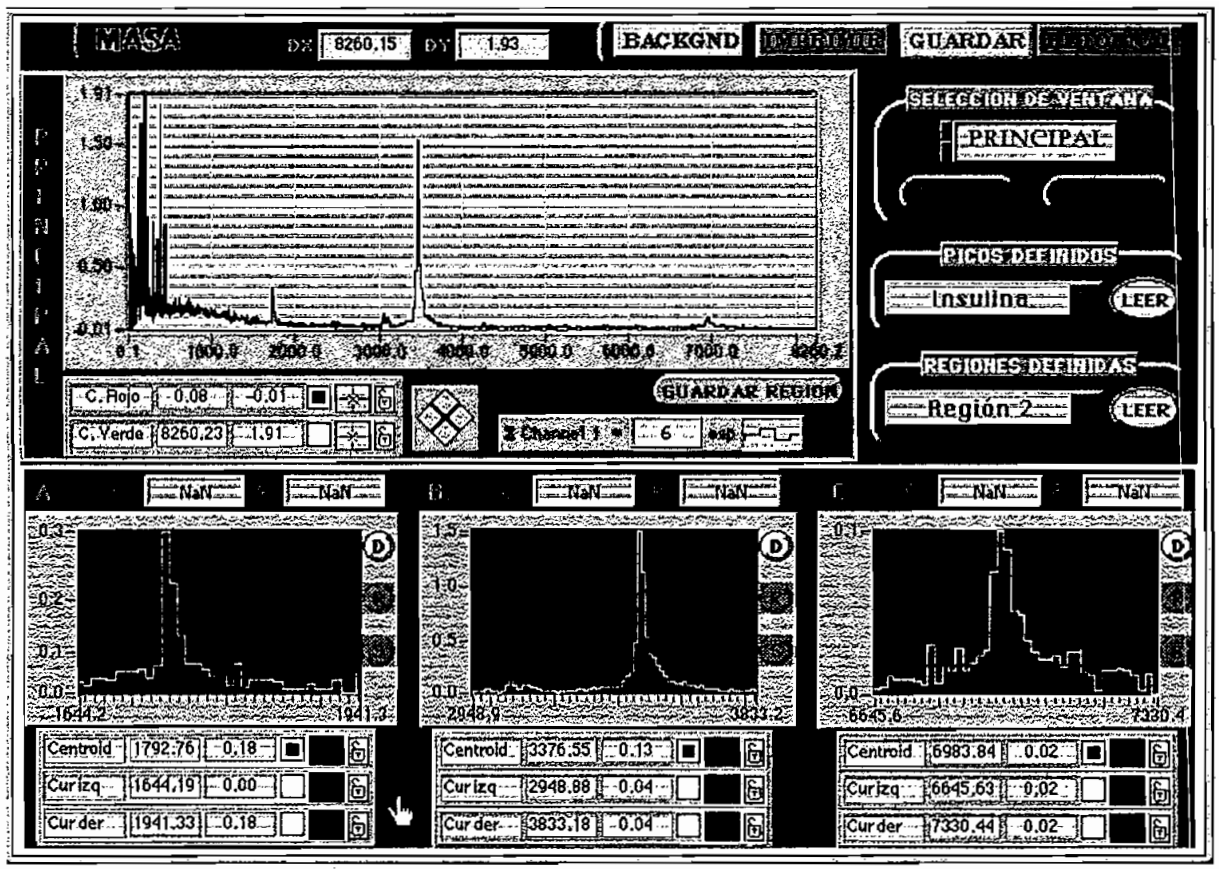


Figura 3-42 Pantalla MASA

Cabe señalar que los picos y regiones almacenadas en la escala de tiempo, también pueden leerse en esta pantalla, y si se realizan nuevos almacenamientos, estos simplemente se anexan a los existentes.

Además, con el fin de que el usuario no pierda tiempo o la continuidad en su trabajo, las mismas regiones que se presentan en las ventanas secundarias de la escala de tiempo se presentan en la escala de masa, así como también los valores de activación y desactivación de los controles, y si se han definido picos sus valores de centroide en masa y resolución. Para lo cual es necesario primero, transferir la información correspondiente a cada ventana secundaria de un VI a otro, como se aprecia en la Figura 3-43.

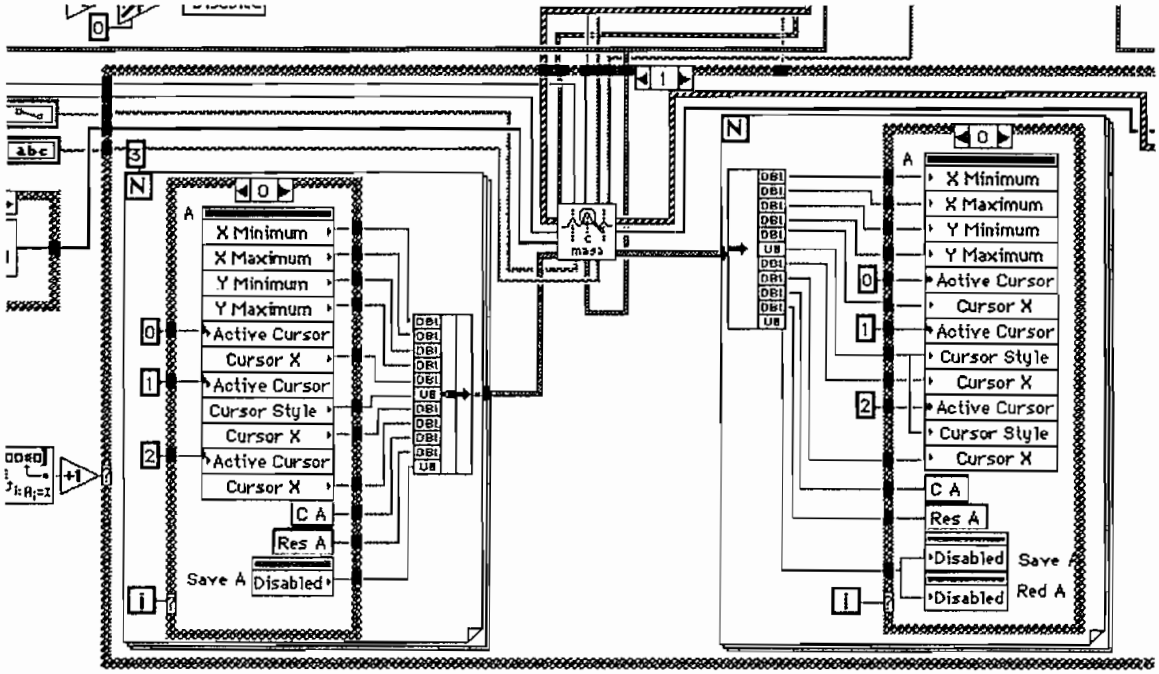


Figura 3-43 (Lado izquierdo) Diagrama del proceso de la recolección y paso de la información de la ventana A del VI de la escala de Tiempo al VI de la escala de Masa; (Lado derecho) Diagrama del proceso del envío de la información proveniente de la escala de masa hacia la ventana A en la escala de Tiempo

Como siguiente paso, de toda la información transferida, se toman los datos que se encuentran relacionados con la escala horizontal: los valores horizontales mínimos y máximos de las ventanas, la posición de los cursores y los valores de centroide; y, se los pasa a la escala de masa (Figura 3-44).

Y como paso final, toda la información se envía a sus correspondientes ventanas y controles, por medio de sus atributos (Figura 3-44).

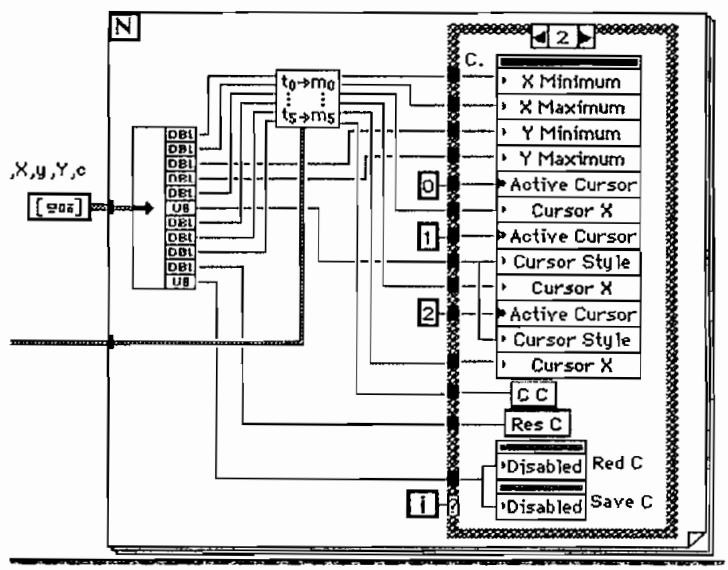


Figura 3-44 Diagrama del proceso del envío de la información hacia la ventana C en la escala de Masa

También, cabe resaltar el hecho de que todo proceso que involucre algún tipo de cálculo en relación con el eje horizontal en la escala de masa, como por ejemplo la definición de un pico y el cálculo respectivo de su centroide, requiere primero del paso de los valores correspondientes a la escala de tiempo (por medio de los coeficientes de calibración), donde se realiza el proceso, para luego reconvertir los valores a la escala de masa, como se aprecia en la Figura 3-45. Esto se hace, porque las operaciones y análisis de los espectros están generalmente definidos para la escala de tiempo. Además, esto es necesario para que los picos y regiones definidas tanto en tiempo como en masa puedan ser almacenados y tratados de igual forma.

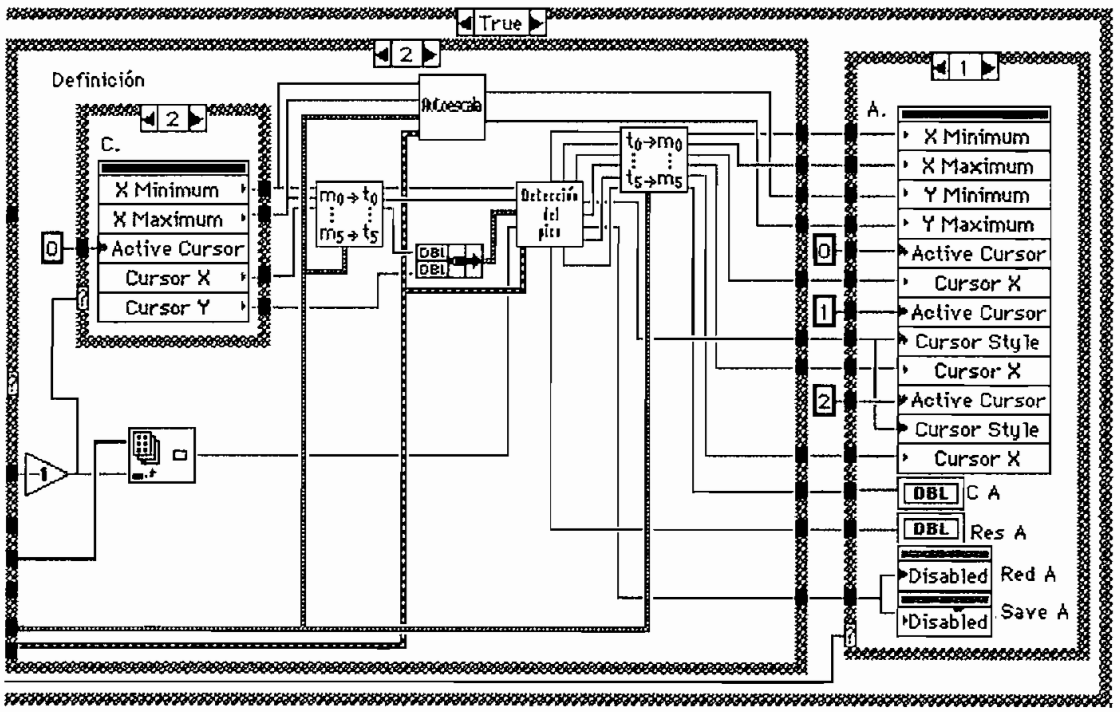


Figura 3-45 Diagrama del proceso de definición de un pico en la escala de Masa

Ahora bien, con la misma finalidad de que el usuario no pierda tiempo o la continuidad en su trabajo, las mismas regiones que se presentan en las ventanas secundarias de la escala de masa se presentan en la escala de tiempo, así como también los valores de activación y desactivación de los controles, y si se han definido picos sus valores de centroide en masa y resolución. Para lo cual es necesario primero, recolectar toda la información correspondiente de cada ventana secundaria. Luego, de los datos relacionados con la escala horizontal pasarlos a la escala de tiempo (Figura 3-46). Y por último, enviarlos a sus correspondientes ventanas, como se aprecia en la Figura 3-43.

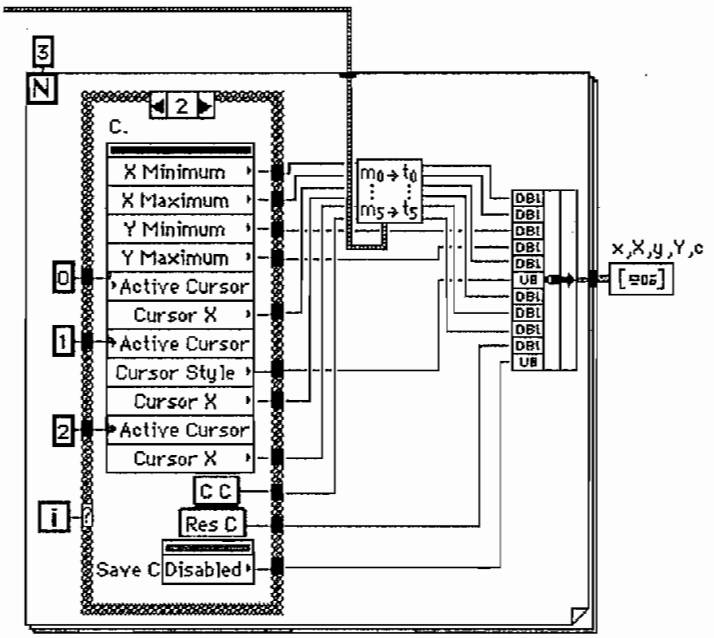


Figura 3-46 Diagrama del proceso de recolección de la información de la ventana C en la escala de masa

3.4. ADMINISTRACIÓN DE LA INFORMACIÓN ADQUIRIDA

Para la administración de la información se ha tomado en cuenta los siguientes detalles:

3.4.1. ALMACENAMIENTO

Debido a que a veces se desea almacenar los espectros recogidos para un posterior análisis o para generar reportes, se requiere que se grabe no solo el espectro sino también las características con toda la información relevante al análisis realizado.

La información que se archiva incluye el nombre del usuario, la fecha, los parámetros del osciloscopio, los coeficientes de calibración y los gráficos seleccionados con los distintos picos y regiones definidas si así se lo deseara.

El proceso de almacenamiento se lo puede realizar tanto desde la pantalla de ADQUISICION así como de las de análisis: TIEMPO y MASA, con la diferencia de que en la primera se pueden almacenar todos los gráficos adquiridos y en las otras solo el gráfico presente.

Para poder almacenar toda la información utilizando las librerías de LabVIEW, es primero necesario convertir toda la información en cadenas de texto, por lo que los datos numéricos se los convierte a un string de formato exponencial de 6 decimales. Entre cada dato se intercala un delimitador o identificador de texto con el fin de que al momento de recuperar toda la información estos separadores faciliten la reubicación de los datos. Para los valores numéricos de los gráficos se utiliza la función *Array To*

Spreadsheet String la cual emplea como delimitador un tab entre cada elemento del arreglo (Figura 3-47).

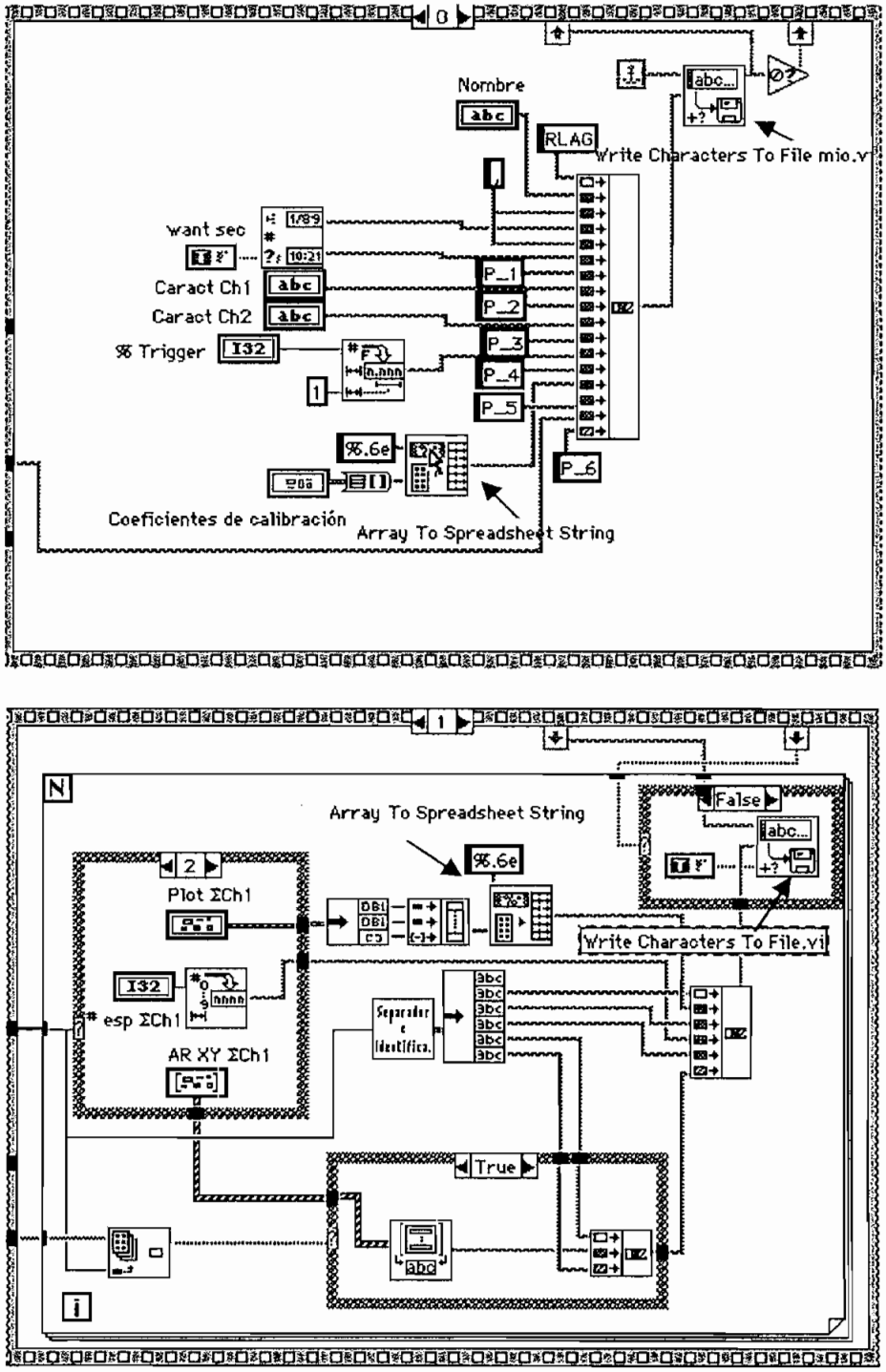


Figura 3-47 Diagrama del proceso de almacenamiento

Para el almacenamiento se utiliza el VI *Write Characters To File mio* (Figura 3-47 secuencia 0), el cual muestra una caja de diálogo en la que se presentan sólo los archivos con extensión msr, misma que ha sido escogida para caracterizar los archivos generados por **Aldebarán**, y además anexa al nombre del archivo introducido por el

usuario la misma extensión. En conjunción con este VI se utiliza el VI *Write Characters To File* en el que se utiliza la función *append*, la cual permite anexar una cadena de texto a un archivo existente (Figura 3-47 secuencia 1). El almacenamiento se lo realiza en esta forma ya que si se convirtiera toda la información en una sola cadena de texto para de ahí recién grabar, se estaría saturando el uso de memoria, mientras que así simplemente se crean varios bloques de texto y se los anexa simplemente al archivo inicialmente creado.

Con el fin de que la información correspondiente a los gráficos almacenados pueda ser usada desde otros programas, se detalla en la siguiente tabla las cadenas de texto que los limitan:

Gráfica	Delimitador inicial	Delimitador final
Canal 1	CH1&	A_1
Canal 2	CH2&	B_1
ΣCanal 1	CSUM1&	C_1
ΣCanal 2	CSUM2&	D_1

Tabla 3-3 Delimitadores de la información de los espectros

Donde los dos primeros valores del arreglo para cada gráfico corresponden a los valores de to (tiempo inicial en segundos) y dt (intervalo horizontal constante) y el resto corresponde a los valores de Y (voltaje).

3.4.2. LECTURA

En el momento de realizar la lectura desde un archivo, como toda la información almacenada se encuentra separada por delimitadores, la extracción y correcta ubicación de los datos es relativamente sencilla, señalando que los strings correspondientes a valores numéricos se los somete al proceso adicional de conversión a formato numérico exponencial de 6 decimales de doble precisión (DBL), por medio de la función *Spreadsheet String To Array*. Todo el proceso de reordenamiento de la información almacenada se muestra en la Figura 3-48.

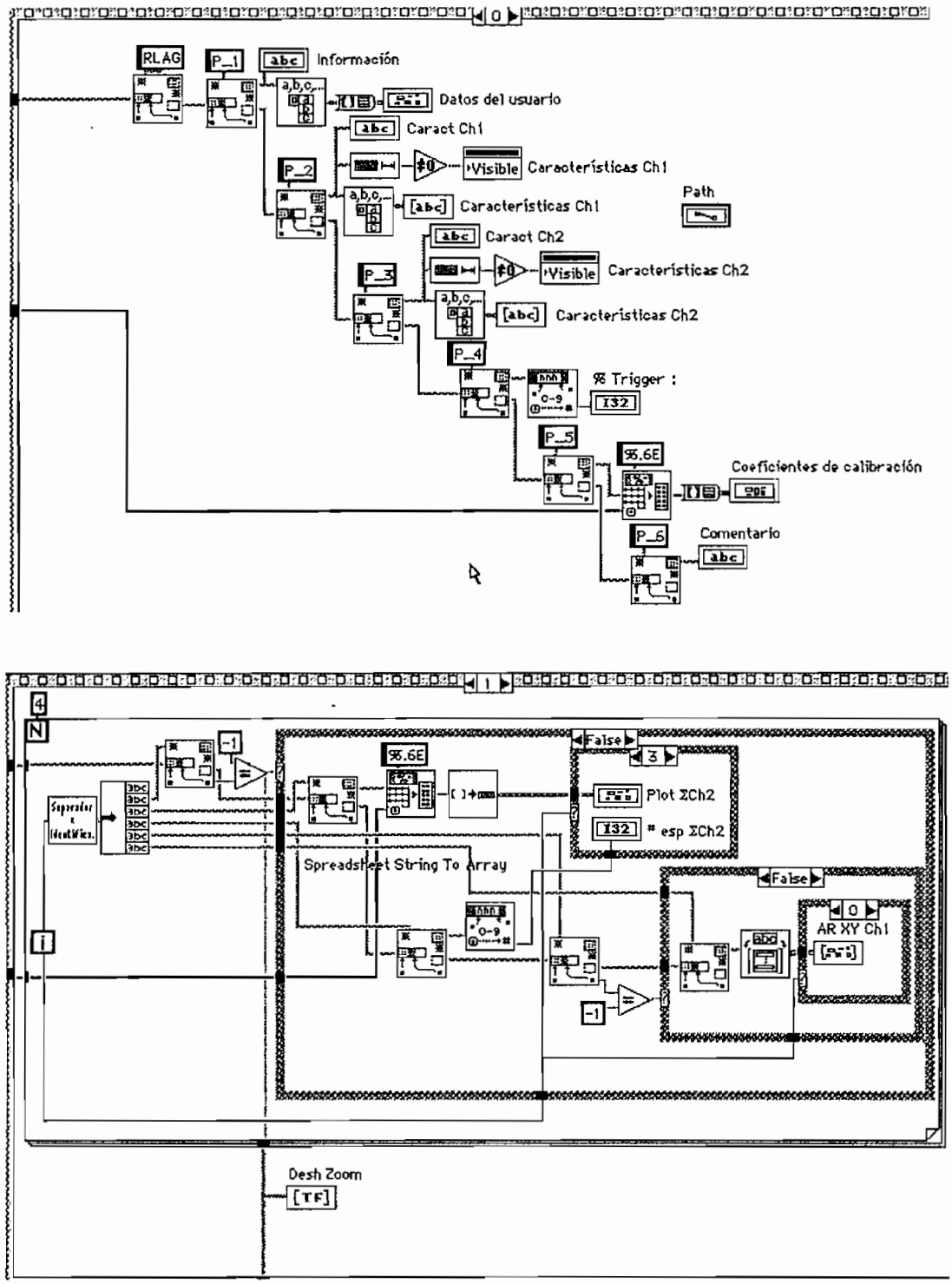


Figura 3-48 Diagrama del proceso de lectura

Una vez procesada la información se presenta al usuario las principales características del espectro que se almacenó, como se aprecia en la Figura 3-49.

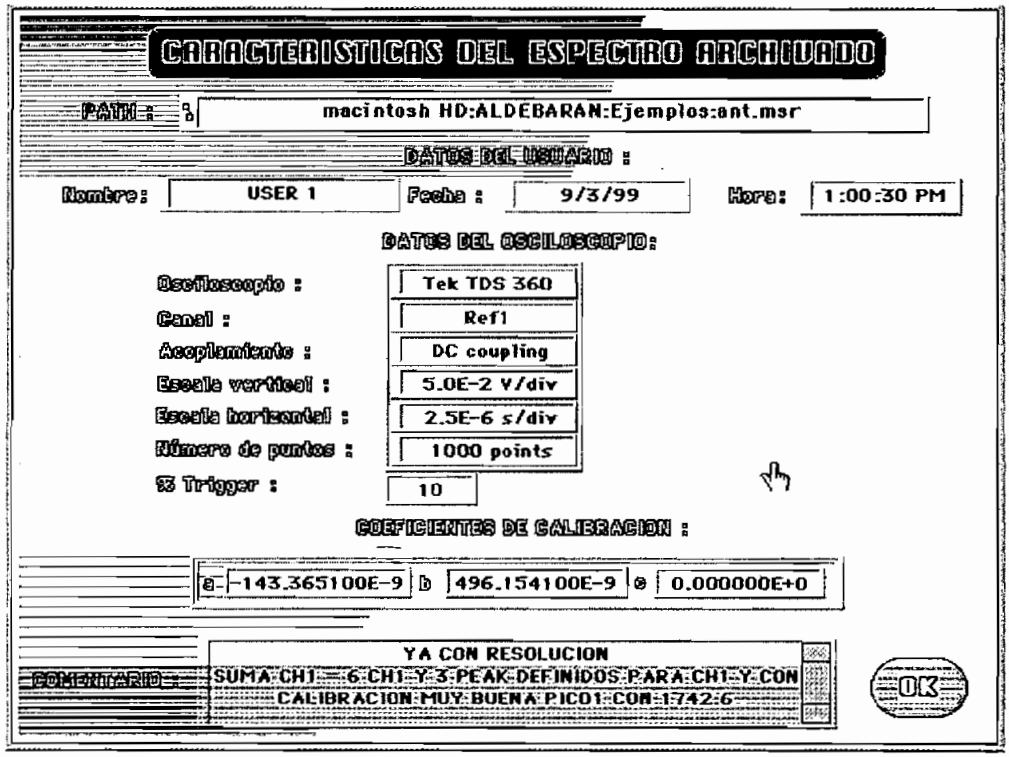


Figura 3-49 Pantalla de características del espectro almacenado

Al salir de esta pantalla los espectros almacenados se vuelven a visualizar en sus respectivas gráficas.

3.4.3. REPORTES

Se puede generar reportes impresos a partir de los resultados obtenidos en una sesión de trabajo. Se pueden reportar ya sea de las formas de onda presentes en la gráfica ESPECTRO o de las de la gráfica SUMA, en la escala de tiempo y/o en la escala de masa, esta última siempre y cuando se haya calibrado el espectro. En el reporte a más de la presentación del espectro, se pueden mostrar picos y/o regiones que se hayan definido previamente con su respectivo nombre, y en el caso de los picos con sus valores de centroide y resolución.

El proceso de impresión se lo puede realizar tanto desde la pantalla de ADQUISICION así como de las de análisis: TIEMPO y MASA, con la diferencia de que en la primera se pueden reportar todos los gráficos adquiridos y en las otras sólo el gráfico presente.

Independientemente de que si seleccionó en escala de tiempo o de masa, en los reportes impresos, los gráficos de los picos estarán siempre acompañados del centroide en valores de tiempo y masa, siempre que se haya calibrado.

Con el fin de tener formatos de impresión con diferentes tamaños se despliega al usuario dos opciones de agrupamiento: bajo y alto. En el primer caso, la primera hoja impresa contiene al espectro total más dos gráficos (picos o regiones seleccionadas) y

los demás se incluirán a partir de la siguiente página en grupos de tres, hasta completar el número que se haya seleccionado. En el segundo caso, la primera hoja impresa contiene al espectro total más cuatro gráficos y los demás se incluirán a partir de la segunda hoja en grupos de seis, hasta completar el número que se haya seleccionado.

Adicionalmente, a la presentación de los picos y regiones, se anexa la información correspondiente a los parámetros del osciloscopio, el nombre del usuario, la fecha y la hora de la adquisición y del momento de la impresión, los coeficientes de calibración, la dirección de archivo de registro de la sesión, el número de página y el número de espectros adquiridos. Esta información, está en inglés para unificar el formato que se dispone, un ejemplo de reporte es la siguiente hoja.

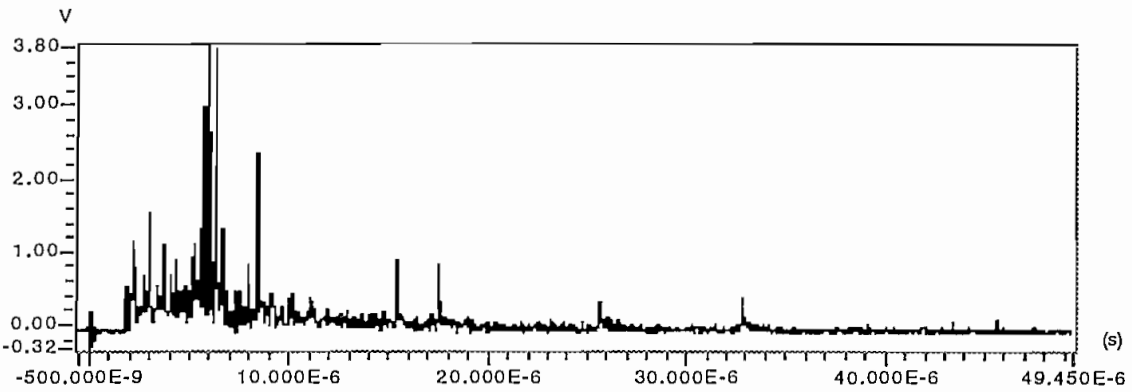
Debido a que para controlar programáticamente la generación de un reporte es necesario crear un VI con los controles que se desean se presenten en la hoja reportada, se tuvo que crear algunos VIs, concretamente cuatro, con el fin de satisfacer la necesidad de tener diferentes formatos de impresión. La apariencia de los filos de los controles se simplificó con el uso de la opción transparencia de la herramienta Coloring.

Además, debido a que para generar los reportes, ya sea en tiempo o en masa, se utiliza un mismo subVI, se manipuló la visibilidad de algunos controles a través del atributo *visible*, con el fin de que los elementos que aparezcan en la impresión concuerden con el modo de escala seleccionado, ya que por ejemplo, mientras en la escala de tiempo se utilizan los gráficos Waveform Graph en la escala de masa se utiliza los Graph XY. Así también si el número de gráficos a imprimirse es menor a la capacidad de los gráficos disponibles, los gráficos no utilizados también son ocultados.

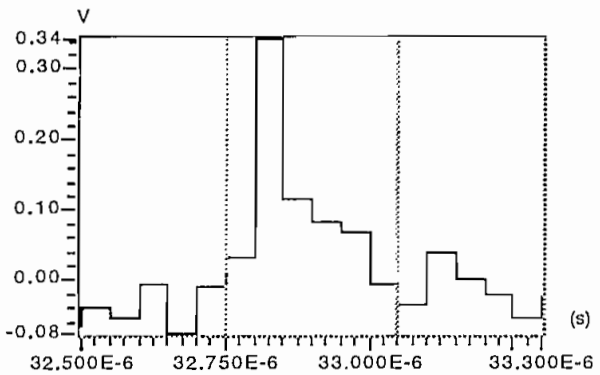
ALDEBARAN

Path: macintosh HD:ALDEBARAN:Ejemplos:ej reporte.msr

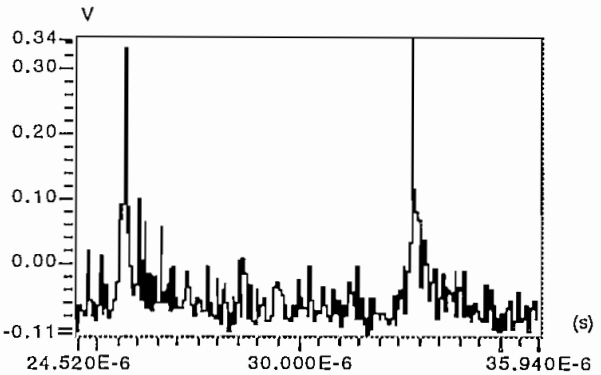
©: RA / CC



Complete spectrum



Insulina : C: 3.289E-5 (s) 5735.096 (Th) R: 251.38



Glucagón e Insulina

Acquisition :

USUARIO 1	6/9/00	11:36:07 AM	Tek TDS 360	Ch1	DC coupling	5.0E-2 V/div	2.5E-6 s/div	1000 points

Coef. de Calibracion: t = a + b*√(m/z)+c*(m/z) a: 3.748E-8 b: 4.338E-7 c: 0.000E+0 Trigger: 1 %

Now :

ROBERT 6/9/00 11:40:32 AM

3.5. CAJAS DE AYUDA

Es importante dotar al usuario de información pertinente de ayuda accesible desde el mismo programa. En este caso, mientras se ejecuta el programa, se pueden presionar las teclas *<Command - h>*, lo cual habilita la función *Show Help* (del menú *Help*) que despliega una caja de diálogo en la que se ofrece al usuario información de ayuda para controles e indicadores. Para desplegar la información de un objeto en la ventana de ayuda se debe colocar el cursor sobre dicho objeto.

Se ha tenido el cuidado de escribir cajas de ayuda para todos los botones, funciones y VIs que interactúan con el usuario en general. Esta explicación incluye una descripción de la función que cumple el elemento y que opciones tiene asociadas. Un ejemplo se indica en la Figura 3-50.

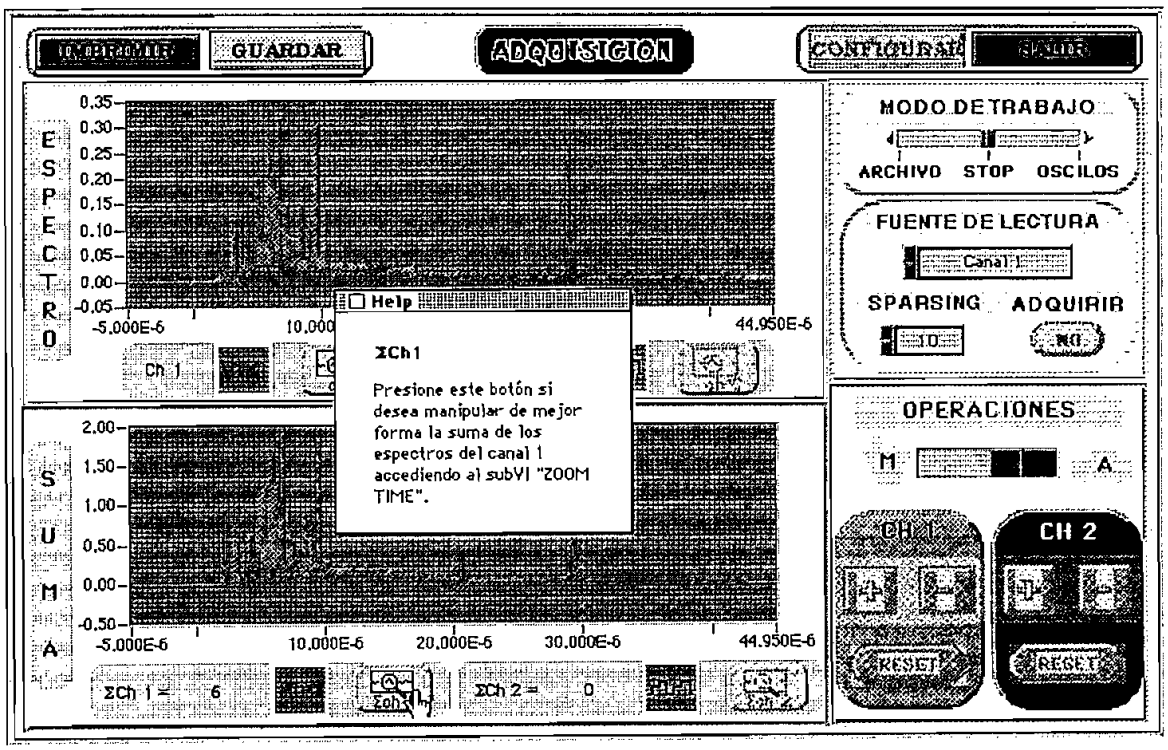


Figura 3-50 Ejemplo de una caja de diálogo

3.6. CARACTERÍSTICAS ADICIONALES DEL SOFTWARE

- Si se tienen picos almacenados para un canal y se adquiere un nuevo espectro bajo las mismas condiciones de la escala de tiempo, con el fin de eliminar la necesidad de volver a definirlos, el programa automáticamente recalcula las características afectadas que los definen, tales como: límites verticales, valores de centroide y resolución. Esta ocurre tanto para cada uno de los canales como para sus respectivas sumas.

- Con el fin de facilitar el manejo del programa, se ha asociado a casi todos los botones de aceptación (OK) el uso de la tecla <return>. Además, en caso de que no

se desee usar el mouse como medio de interacción entre el usuario y el programa, se puede usar el tabulador para cambiar entre los elementos en pantalla.

- En los gráficos de masa que son del tipo Graph XY, hubo la necesidad de realizar un generador de autoescala del gráfico, ya que cuando se utiliza la propia en el momento de autoescalar verticalmente lo hacen con referencia a todo el espectro y no con respecto a la región definida.

- Aunque la precisión usada en los elementos numéricos (controles e indicadores) no es una característica propia del programa, cabe señalar que esta afecta solamente al despliegue del valor, ya que los cálculos internos dependen de la representación que posee el elemento, en la siguiente tabla se describe los rangos para cada una de las representaciones:

Precisión	Single (SGL)	Double (DBL)	Extended (EXT)
Número positivo máximo	3.4E38	1.7E308	1.1E4932
Número positivo mínimo	1.5E-45	5.0E-324	1.9E-4951
Número negativo mínimo	-1.5E-45	-5.0E-324	-1.9E-4951
Número negativo máximo	-3.4E38	-1.7E308	-1.1E4932

Tabla 3-4 Límite de rangos positivo y negativo para cada representación numérica

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

En este capítulo se hace una descripción de las pruebas realizadas para evaluar el funcionamiento del programa **Aldebarán**, se detallan los resultados obtenidos, y finalmente, se hace un análisis de los mismos.

La presentación de resultados se ha organizado de acuerdo con la división utilizada en el capítulo anterior, esto es:

- Control del osciloscopio
- Adquisición y transferencia de los espectros del osciloscopio al computador
- Análisis de los espectros
  - Presentación visual de los espectros
  - Manipulación de los espectros
  - Solución matemática de la ecuación de calibración
  - Calibración de espectros: conversión de escala de tiempo a masa
- Administración de la información adquirida
  - Almacenamiento de espectros y sus características
  - Lectura de espectros y sus características
  - Generación de reportes

4.1. CONTROL DEL OSCILOSCOPIO

El objeto de esta prueba fue el de verificar que el sistema permite controlar desde el computador ambos osciloscopios digitales, de acuerdo con los requerimientos. Para esto se manipularon todos los parámetros desde los paneles virtuales de configuración (ver Figuras 4-1 y 4-2).

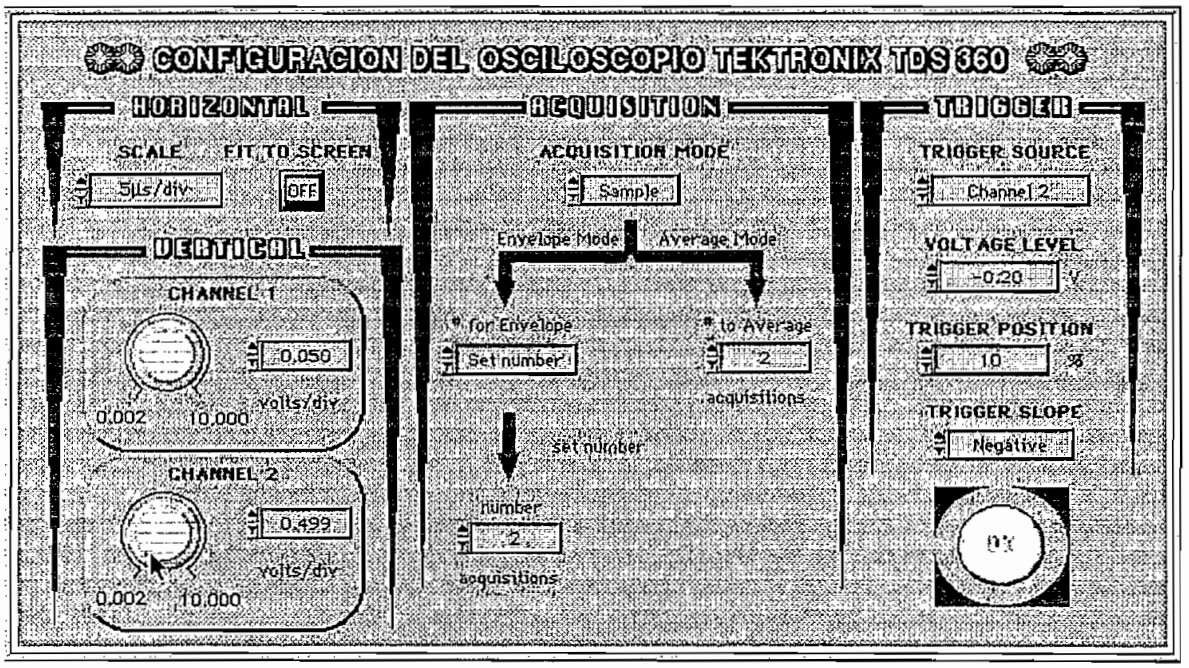


Figura 4-1 Panel virtual de configuración del osciloscopio Tektronix TDS 360

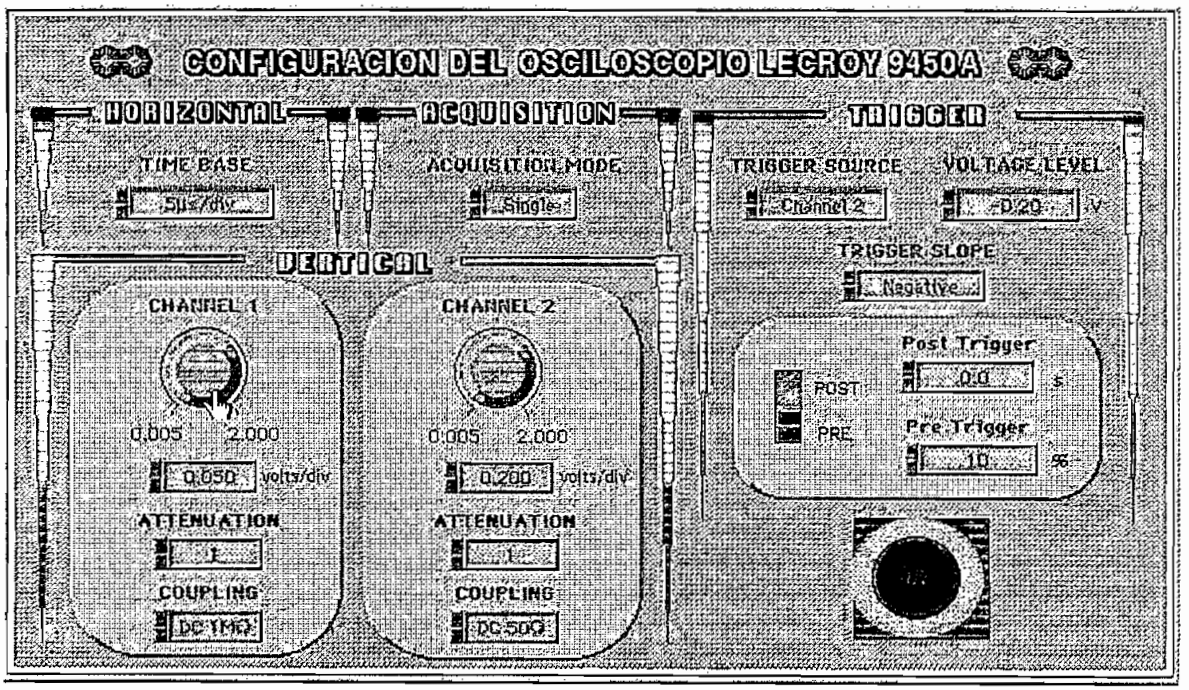


Figura 4-2 Panel virtual de configuración del osciloscopio LeCroy 9450A

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Desde que se ingresa a la pantalla de configuración, el computador envía los parámetros por defecto de los controles al osciloscopio, lo cual se refleja en una respuesta inmediata

del mismo. Los valores por defecto actúan solo al inicio de cada sesión de trabajo ya que, para el resto de ocasiones que se ingresa a esta misma pantalla para reconfigurar el osciloscopio, se mantienen los últimos valores utilizados en la configuración.

Como resultado se observó que cualquier parámetro modificado en los controles virtuales de configuración se ve reflejado inmediatamente en el instrumento. Esto gracias a que cada subVI utilizado en la configuración envía por si mismo sus valores hacia el GPIB (por medio del VI INSTR Write, propio de LabVIEW), por lo que no es necesario que al modificar un parámetro particular se deba usar un control especial para su aceptación y envío del valor.

El proceso de identificación interna que realiza el programa permite detectar automáticamente cual es el osciloscopio conectado al computador y, dependiendo de esto, acceder a su respectivo panel de configuración virtual. Con esto se crea una facilidad de detección automática que elimina la necesidad que el usuario tenga que hacerlo en forma manual, eliminando así una fuente potencial de error.

Los valores que se envían no solo son de aquellos controles presentes en este panel, sino también los de aquellos controles cuya manipulación directa no es necesaria para esta aplicación.

Para el caso del osciloscopio LeCroy, una vez que el computador toma control (botón Remote en el osciloscopio encendido) no se pueden modificar los parámetros desde la consola del osciloscopio puesto que permanecen bloqueados hasta sacarlos de este estado (botón Remote apagado). Si bien se puede deshabilitar el estado remoto mientras se realiza la comunicación en forma manual, esto es momentáneo puesto que el valor del instr handle (identificador del dispositivo y de la configuración de la comunicación) no se altera, por lo que el vínculo de comunicación no se rompe y el botón Remote se vuelve a encender.

En el caso del osciloscopio Tektronix, pese a que se lo esté controlando remotamente, los parámetros de los controles pueden ser modificados desde la consola del osciloscopio ya que no existe bloqueo alguno. Estos cambios no afectan a la información de una forma de onda previamente capturada, y si se adquiere una nueva forma de onda lo hará en base a los nuevos parámetros. Este osciloscopio carece de un señalizador de estado remoto y local.

Otra característica de este osciloscopio es que detecta automáticamente la atenuación de la punta de prueba (siempre y cuando sea de la serie Tektronix); valor que es solicitado por el programa con el fin de fijar el rango de la escala vertical, operación válida para ambos canales. Al conectar cualquier otra punta de prueba, el osciloscopio asume que el valor de atenuación es uno, por lo que se debe tener cuidado de tomar en cuenta el escalamiento necesario, si fuera el caso, al considerar las lecturas de voltaje obtenidas bajo estas circunstancias.

Antes de realizar el control del osciloscopio, es necesario realizar los siguientes pasos:

1. Asegurarse que la interfaz GPIB entre el computador y el osciloscopio a manipular esté conectada.

2. Cerciorarse que el osciloscopio está encendido.
3. Verificar que la dirección GPIB del osciloscopio sea la número 4.

Con el fin de ver como actúa el programa ante posibles errores del usuario, se realizaron las siguientes pruebas adicionales: iniciar la comunicación antes de encender el osciloscopio, y apagarlo mientras se está en dicho modo. Esto dio como resultado conflictos de comunicación y se tuvo que reiniciar el programa para eliminarlos, puesto que el *Controlador* GPIB, al no tener respuesta de un *Oyente*, genera una señal de error, la cual bloque cualquier nuevo intento de comunicación.

4.2. ADQUISICIÓN Y TRANSFERENCIA DE LOS ESPECTROS

El objetivo de estas pruebas es verificar el correcto funcionamiento de la adquisición y transferencia de las formas de onda, así como también del proceso de sumar espectros (manual y automáticamente), con su respectiva presentación visual. Para lo cual se realizaron las siguientes tareas:

4.2.1. PRUEBA 1

Adquirir formas de onda en todos lo modos de adquisición de ambos osciloscopios.

RESULTADOS

Para esto se tomó la señal cuadrada de un generador de funciones. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

OSCILOSCOPIO TEKTRONIX

MODO SAMPLE

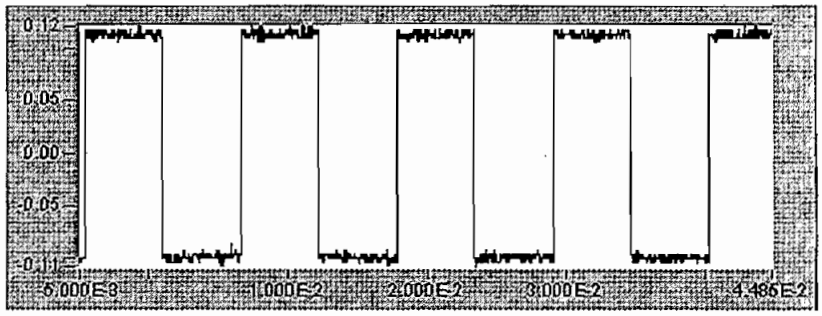


Figura 4-3 Forma de onda adquirida en el modo SAMPLE

En este modo, la forma de onda que se despliega corresponde al primer valor muestreado que fue tomado durante el intervalo de adquisición.

MODO ENVELOPE

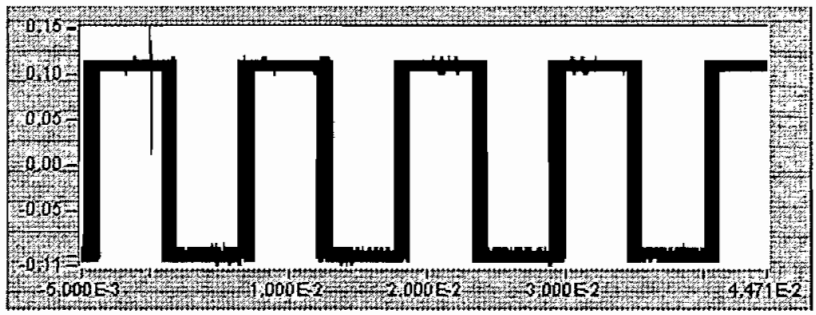


Figura 4-4 Forma de onda adquirida en el modo ENVELOPE

En este modo, la forma de onda resultante que se despliega corresponde a la envolvente que se forma por varias adquisiciones separadas de formas de onda. El número de adquisiciones va de 2 a 256. Para este caso se fijó en 8 adquisiciones.

MODO AVERAGE

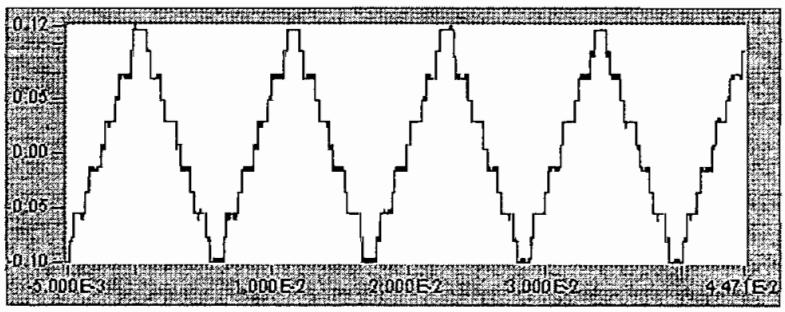


Figura 4-5 Forma de onda adquirida en el modo AVERAGE

En este modo, la forma de onda resultante que se despliega corresponde al promedio que se forma por varias adquisiciones separadas de formas de onda. El número de adquisiciones va de 2 a 256. Para este caso se fijó en 10 adquisiciones.

MODO PEAK DETECT

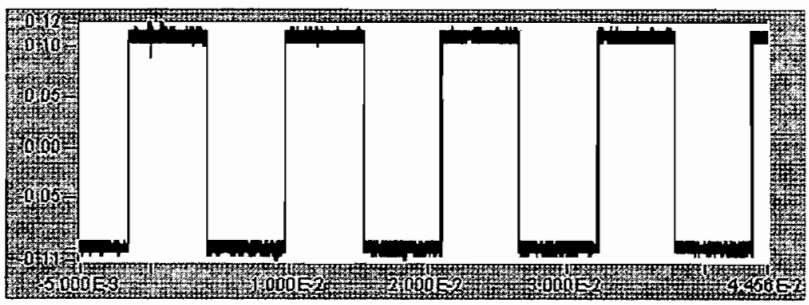


Figura 4-6 Forma de onda adquirida en el modo PEAK DETECT

En este modo, la forma de onda que se despliega corresponde al rango alto y bajo de las muestras tomadas en una adquisición.

OSCILOSCOPIO LECROY

MODO SINGLE

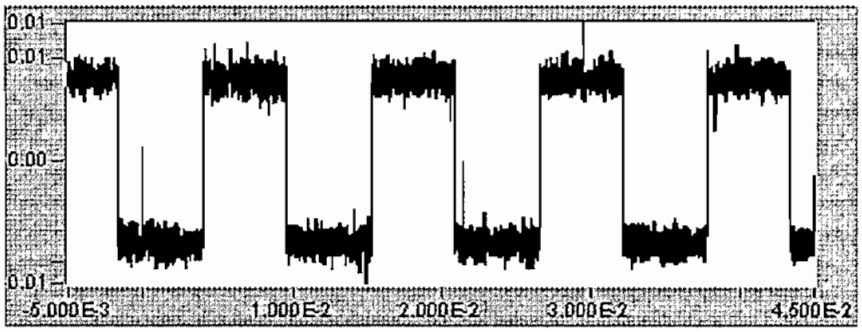


Figura 4-7 Forma de onda adquirida en el modo SINGLE

En este modo, la forma de onda que se despliega corresponde al valor muestreado que se adquiere al recibir un trigger válido.

MODO NORM

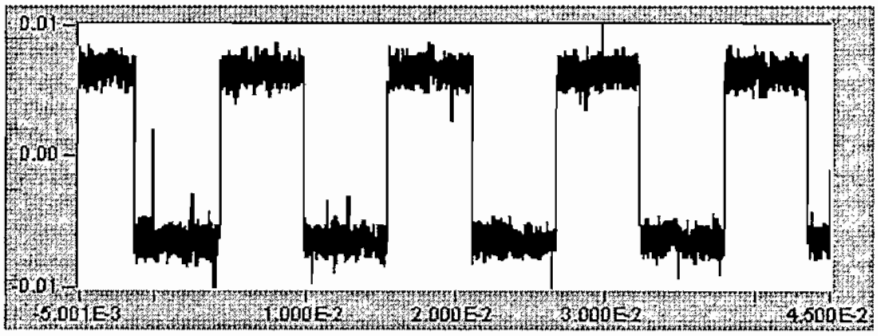


Figura 4-8 Forma de onda adquirida en el modo NORM

En este modo el osciloscopio digitaliza continuamente la señal de entrada. Cuando un trigger válido es recibido, la forma de onda adquirida es desplegada en pantalla, la digitalización empieza de nuevo y el trigger del circuito es rearmado.

MODO AUTO

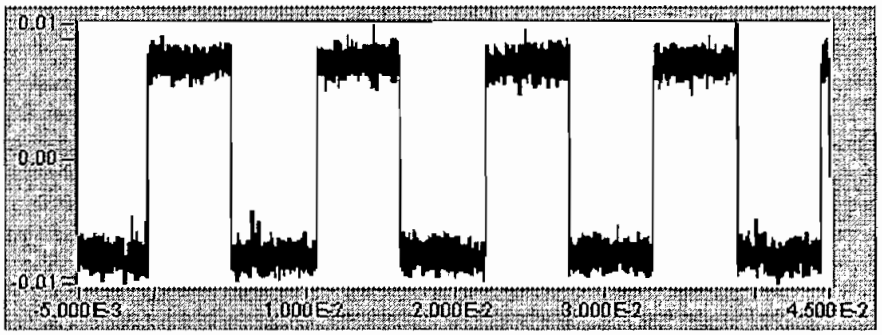


Figura 4-9 Forma de onda adquirida en el modo AUTO

Este modo se asemeja al anterior, excepto que este automáticamente genera un trigger interno siempre que el trigger seleccionado esté perdido por más de 500 mseg, y forza a desplegar la forma de onda.

ANÁLISIS

De estos resultados se puede resaltar el hecho de que pese a que el modo de adquisición requerido para la aplicación de adquisición de los espectros es el de "adquiera uno y pare la adquisición hasta que se rearme el trigger" (Tektronix - Modo Sample, LeCroy - Modo Single), también se puede trabajar en los otros modos, lo que permite que el programa sea útil a cualquier experimento que involucre el uso del osciloscopio, tomando en cuenta el detalle de inversión de la onda que se realiza.

4.2.2. PRUEBA 2

Adquirir una misma cantidad de espectros y adicionarlos en forma manual y automática.

RESULTADOS

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

SUMA AUTOMÁTICA

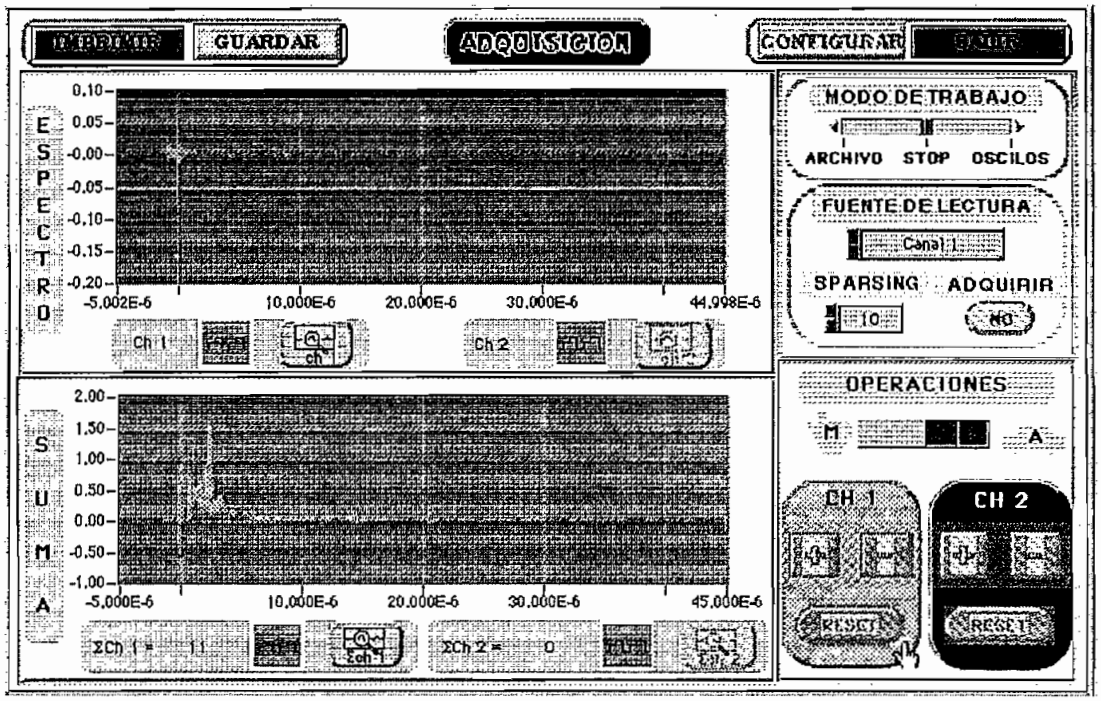


Figura 4-10 Espectro obtenido como resultado de 11 adiciones en modo de suma automática (gráfico SUMA). Además, se presenta en el gráfico ESPECTRO el último espectro adquirido y adicionado

SUMA MANUAL

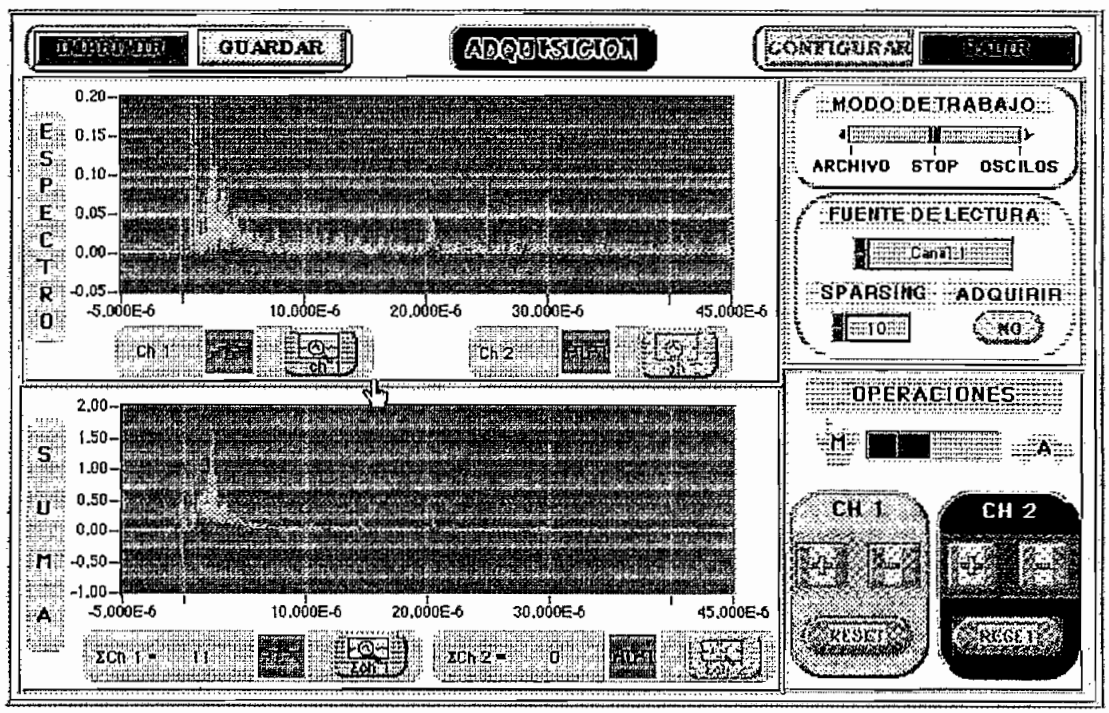


Figura 4-11 Espectro obtenido como resultado de 11 adiciones en modo de suma manual (gráfico SUMA). Además, se presenta en el gráfico ESPECTRO el último espectro adquirido y adicionado

ANÁLISIS

Al realizar la suma en el MODO AUTOMATICO cada espectro adquirido se añade, aún si el espectro no es significativo. En el MODO MANUAL en cambio, el usuario puede elegir si el espectro se añade o se ignora. Por lo que es más recomendable operar en este último modo, debido a que es el usuario quien a través de su experiencia puede determinar con claridad que espectro conviene o no sumar, ya que no todos los espectros que se adquieren son significativos. Un claro ejemplo de un espectro no significativo se aprecia en la Figura 4-10.

En el MODO MANUAL se tiene la ventaja además, de que al adicionar el espectro adquirido se puede observar como afecta este en el resultado, y si no es de la conveniencia requerida se lo puede sustraer matemáticamente.

En esta prueba también se experimentó con la función de RESET, la cual permitió el reinicio de la suma en cualquiera de los modos de adición.

4.2.3. PRUEBA 3

Realizar la lectura de formas de onda de los dos canales:

RESULTADOS

Para esta prueba se conectó una señal triangular al canal 1 y una señal cuadrada al canal 2. Como señal de trigger se utilizó el mismo canal 1. Para los dos osciloscopios se utilizaron diferentes valores de amplitud de las señales. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

OSCILOSCOPIO TEKTRONIX

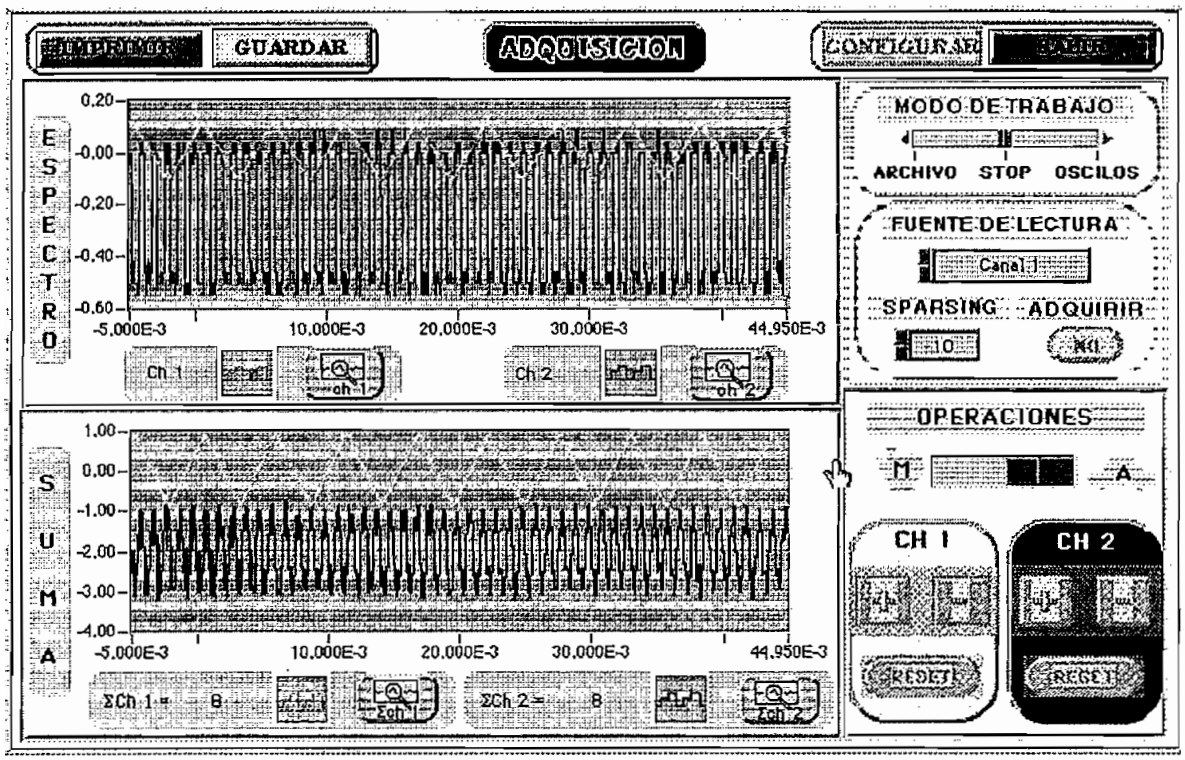


Figura 4-12 Lectura de los dos canales del osciloscopio Tektronix

OSCILOSCOPIO LECROY

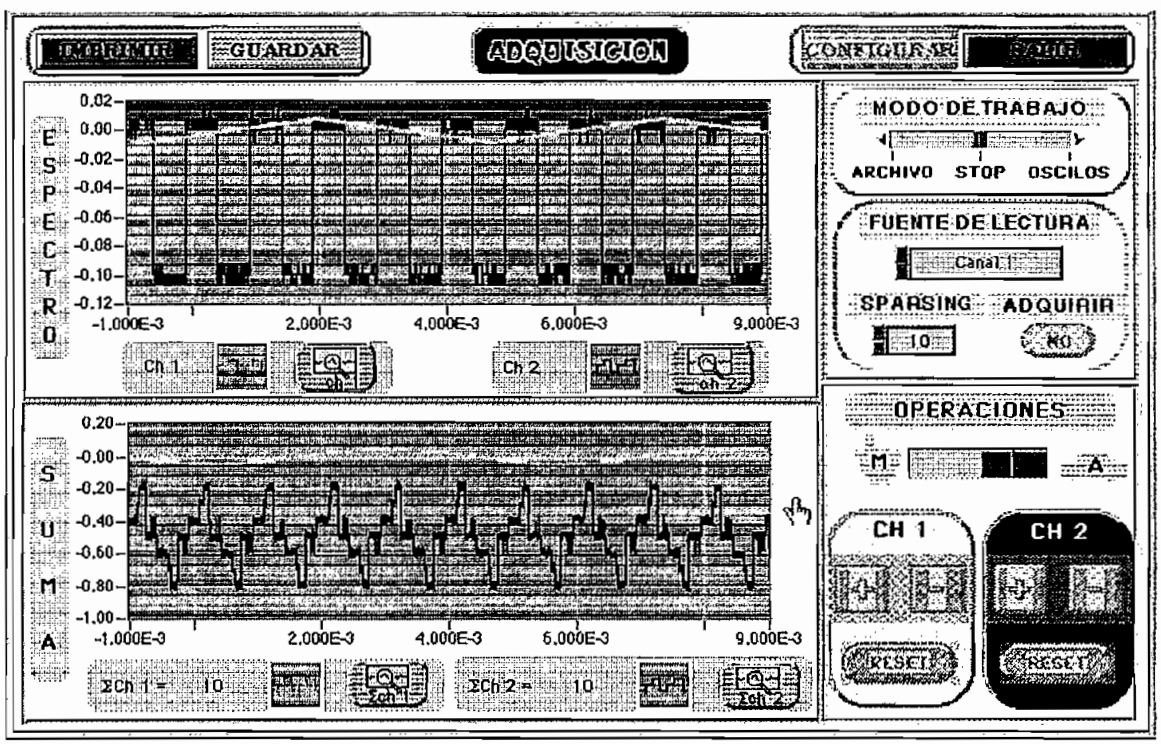


Figura 4-13 Lectura de los dos canales del osciloscopio LeCroy

ANÁLISIS

Cuando se adquieren dos canales a la vez, las formas de onda se presentan sobrepuestos en los gráficos con diferentes colores lo que permite identificarlas fácilmente, como se aprecia en las figuras anteriores.

En esta misma prueba también se verificó el correcto funcionamiento de la suma para ambos canales a la vez.

4.2.4. PRUEBA 4

Con el objeto de establecer el tiempo de demora en la transferencia de un espectro desde los dos osciloscopios digitales con su respectiva adición automática en el computador, se hizo la adquisición secuencial de varios espectros con una frecuencia de disparo de 1 kHz y se midió el tiempo total para acumular 30 espectros.

RESULTADOS

Los resultados de esta prueba se detallan en la siguiente tabla:

OSCILOSCOPIO	LONGITUD DEL REGISTRO	TIEMPO EN ADQUIRIR 30 ESPECTROS (s)	TIEMPO EN ADQUIRIR 1 ESPECTRO (s)
TEKTRONIX	1000	60	2
LECROY[1]	4000	45	1.5

[1] se trabajo en la escala de tiempo de 1ms (40000 puntos) con sparsing de 10.

Tabla 4-1 Tiempo que tarda el programa en adquirir 30 espectros a una frecuencia de disparo de 1 kHz para los dos osciloscopios digitales

ANÁLISIS

Estos tiempos de demora en la transferencia corresponden a los tiempos muertos del sistema de adquisición de datos para cada osciloscopio. Esto significa que los espectros que se generen durante este intervalo no se registrarán. Por lo que se recomienda que la frecuencia de disparo del láser para el osciloscopio Tektronix sea menor a 0.5 Hz y para LeCroy menor 0.67 Hz, cuando se trabaje con un solo canal. Cuando se trabaje con los dos canales esta frecuencia deberá ser menor.

Otro resultado de esta comparación es que pese a que el osciloscopio LeCroy transfiere un mayor número de puntos en una relación de 4 a 1 con respecto a Tektronix, su tiempo muerto es inferior. Esto se debe particularmente a las características internas de la interfaz GPIB propia de cada osciloscopio.

4.3. MANIPULACIÓN DE LOS ESPECTROS

Con el fin de verificar el correcto funcionamiento de la manipulación del espectro, en lo referente a las funciones de zoom, definición de picos y regiones, se realizaron las siguientes pruebas:

4.3.1. PRUEBA 1

Realizar acercamientos de regiones de interés en un espectro, especialmente en las que se involucren picos bien definidos.

RESULTADOS

El espectro utilizado para la comprobación del funcionamiento, se indica en la siguiente figura:

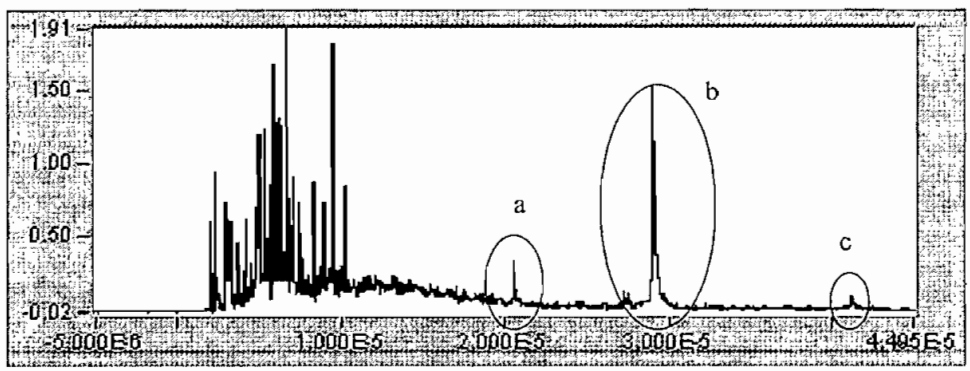
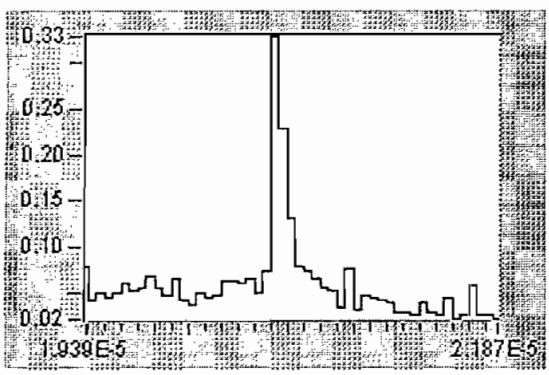
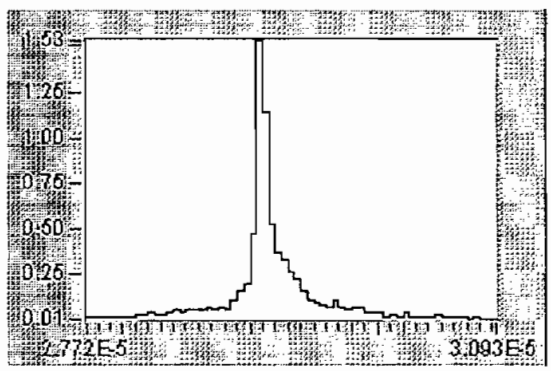


Figura 4-14 Espectro sobre el cual se realizó el acercamiento de algunas regiones de interés. Los círculos señalan dichas zonas.

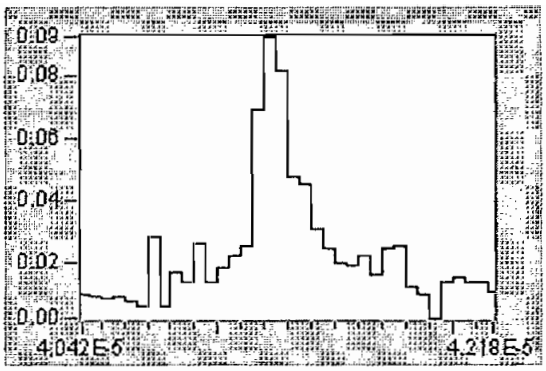
Los resultados de estas operaciones de acercamientos se observan en las siguientes figuras:



(a)



(b)



(c)

Figura 4-15 Definición de varios acercamientos realizados sobre el espectro de la Figura 4-14. (a) Zoom de la región a; (b) Zoom de la región b; (c) Zoom de la región c

ANÁLISIS

El proceso de acercamiento en forma programática es muy preciso y permite realizar buenas apreciaciones del espectro.

4.3.2. PRUEBA 2

Realizar la definición y redefinición de un mismo pico.

RESULTADOS

El espectro utilizado para la comprobación de esta parte del software es el mismo de la Figura 4-14, y para la definición y redefinición del pico se utilizó la región b marcada sobre el mismo gráfico. Los resultados se aprecian en la figura siguiente:

PICO DEFINIDO

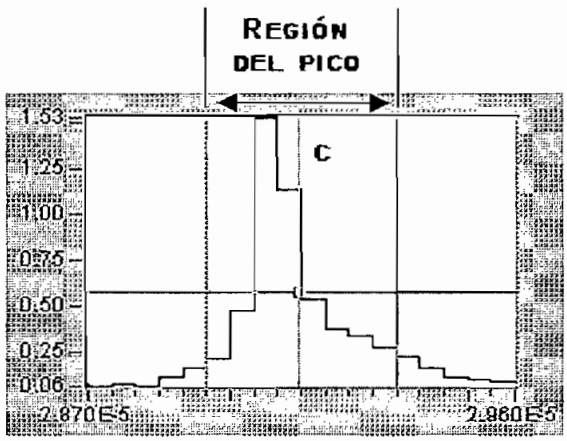


Figura 4-16 Región del pico determinada al ejecutar la operación de definición. La posición del cursor c señala la posición del centroide.

PICO REDEFINIDO

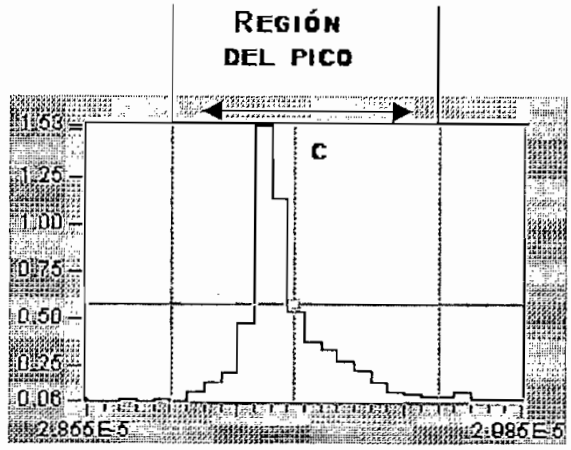


Figura 4-17 Región del pico determinada al ejecutar la operación de redefinición. Para esto se desplazó los cursores que limitan al pico definido en la Figura 4-16 hacia nuevas posiciones. La posición del cursor c señala la posición del centroide.

ANÁLISIS

De estos resultados se aprecia que, si bien la operación de definición *automática de los* picos permite obtener una región apropiada que represente al pico como tal, la opción de redefinición del pico permite al usuario determinar y definir de mejor forma al pico.

El uso de la opción de redefinición es a veces necesario, ya que como la definición automática del pico es un proceso estadístico, en el que los valores de *ho* y *hb* en el que se basa dicho proceso y que son ingresados por el usuario, así como las posibles irregularidades que presente el pico pueden guiar a una mala definición y determinación de la región del pico. Las Figuras 4-16 y 4-17 son un ejemplo de definición y redefinición de un mismo pico.

4.3.3. PRUEBA 3

Observar como afectan los valores de ho y hb en la definición de un pico.

RESULTADOS

El espectro utilizado para la comprobación de esta parte del software es el de la Figura 4-14, y para la definición de un mismo pico para diferentes valores de ho y hb se utilizó la región a marcada sobre la gráfica.

Los resultados gráficos y matemáticos que se obtuvieron son:

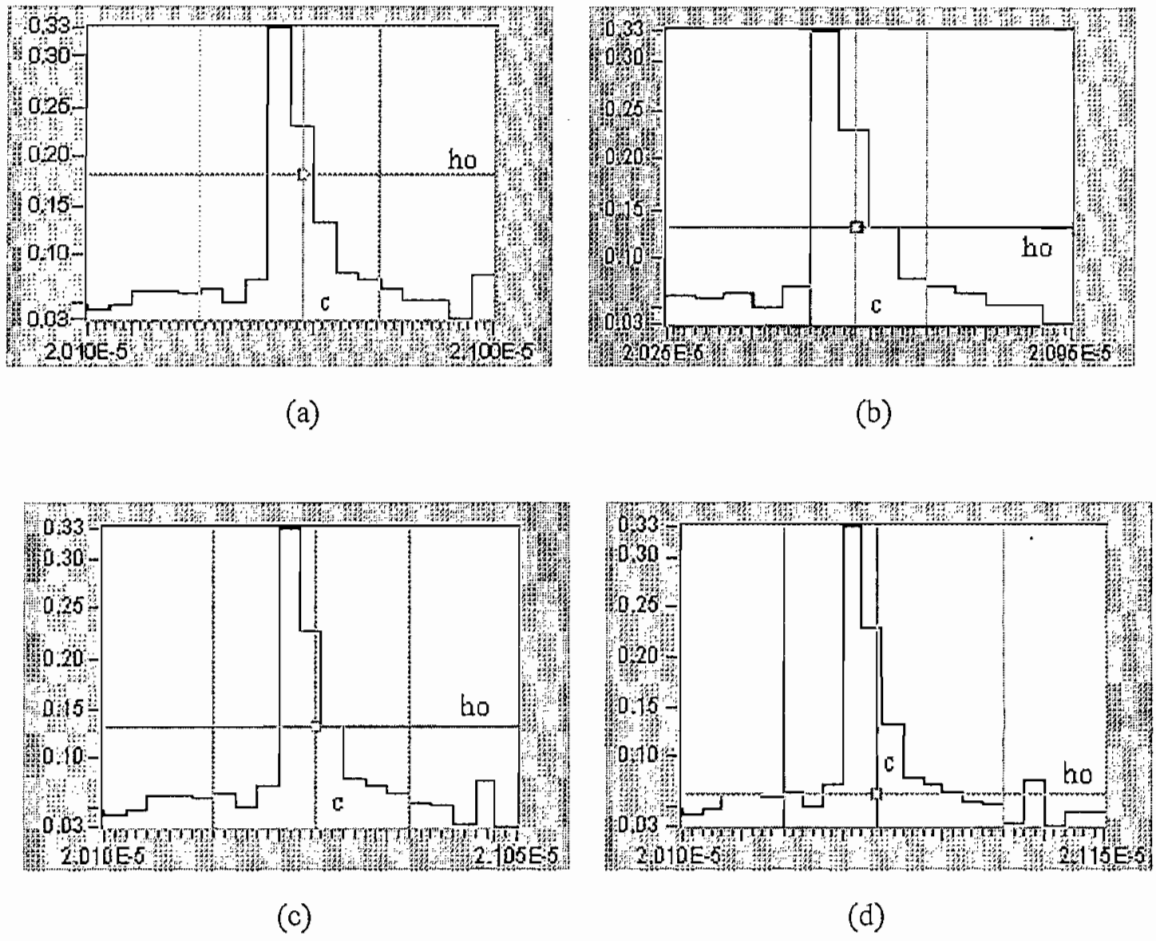


Figura 4-18 Definición de un pico para diferentes valores de ho y hb.

Gráfica	ho (V)	hb (%)	Cur izq (µs)	Cur der (µs)	Ancho (µs)	Centroide (µs)	Resolución
a	0.185	10	20.35	20.75	0.40	20.5820	89.1933
b	0.132	70	20.50	20.70	0.20	20.5802	89.1854
c	0.132	10	20.35	20.80	0.45	20.5869	89.2147
d	0.064	10	20.35	20.90	0.55	20.5892	89.2246

Tabla 4-2 Valores de ho y hb bajo los cuales se determinaron los picos de la Figura 4-18. Con sus respectivos valores de los cursores que delimitan la región del pico, centroide y resolución.

ANÁLISIS

Comparando los resultados se observa que pese a tener semejantes valores de centroide y de resolución en las cuatro gráficas de la Figura 4-18, las áreas que abarcan el pico son diferentes. De lo que se concluye que es el usuario quien, a través de su visión, en

primer término, y de su experiencia en el manejo de este tipo de espectros, como segundo término, quien podrá decidir cuando un pico está bien definido. Y los resultados numéricos solo servirán como una referencia.

Estas pequeñas diferencias en los valores de centroide pueden afectar el proceso de calibración, ya que por lo general se utilizan picos de masa conocida (calibrantes) para efectuar dicho proceso.

Otro hecho a resaltar es que a medida que los valores de ho y hb se incrementan, el ancho del pico tiende a ser más angosto.

4.4. CALIBRACIÓN DE ESPECTROS

Para la verificación del correcto funcionamiento de todas las soluciones matemáticas a la ecuación de calibración que posee el programa **Aldebarán**, y el proceso de conversión de escala o calibración propiamente dicha, se realizaron las siguientes pruebas:

4.4.1. PRUEBA 1

Adquirir varios espectros de una muestra que contenga al menos cuatro calibrantes y asumir a uno de estos como la sustancia de masa desconocida, con el fin de tener una referencia para la comparación con la masa que se tiene al realizar cada una de las calibraciones que posee el programa.

RESULTADOS

El espectro analizado corresponde a la adición de 40 espectros, cuyo resultado se muestra en la Figura 4-19.

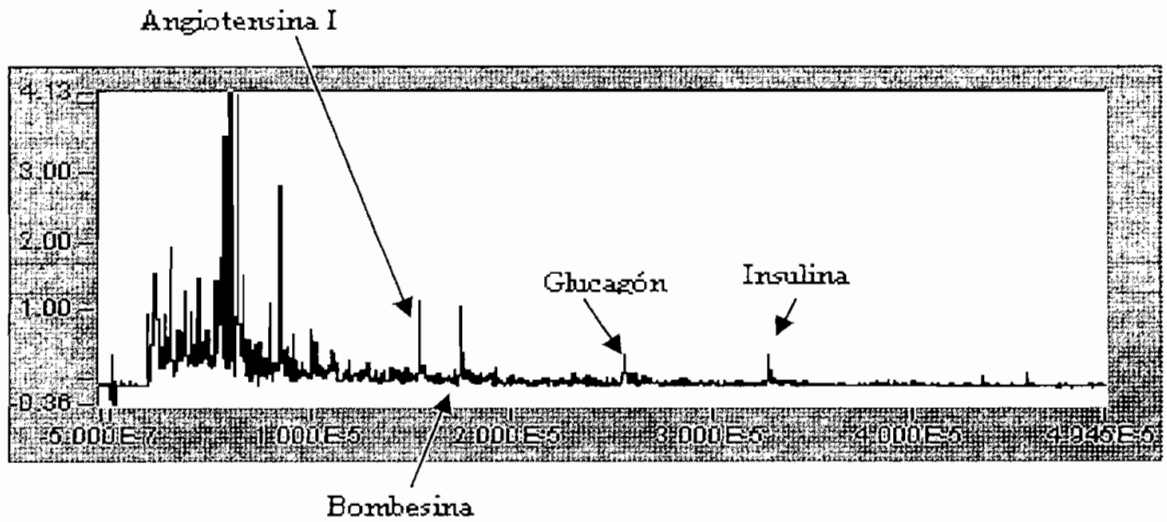


Figura 4-19 Espectro de tiempo de una mezcla de angiotensina I, bombesina, glucagón e insulina (bovina)

La muestra utilizada contiene cuatro sustancias de masa conocida (calibrantes), a saber:

SUSTANCIA	MASA	CARGA
ANGIOTENSINA I	1296	1
BOMBESINA	1634	1
GLUCAGON	3483	1
INSULINA (BOVINA)	5734	1

Tabla 4-3 Lista de calibrantes introducidos en la muestra de la Figura 4-19

De estos calibrantes, la sustancia glucagón fue tomada como sustancia de masa desconocida. Se seleccionó esta sustancia para que el valor a comparar corresponda a una interpolación y no a una extrapolación.

Los resultados gráficos obtenidos en la conversión de escala de tiempo a masa, para los diferentes tipos de calibración, se indican a continuación:

CALIBRACIÓN BASICA DE UN COEFICIENTE

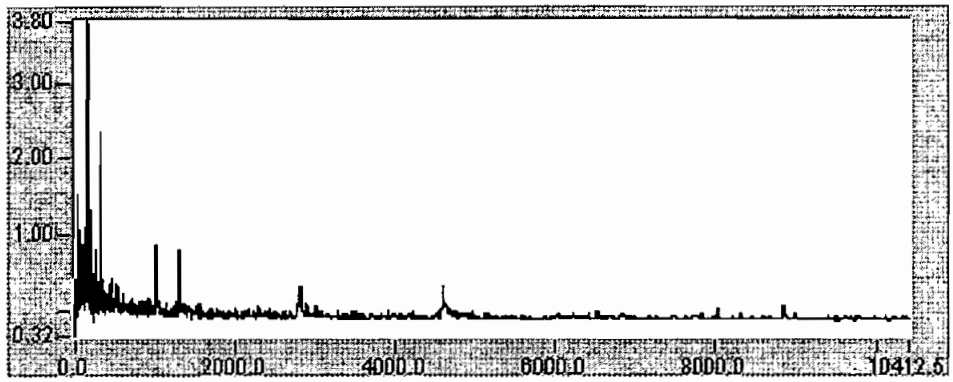


Figura 4-20 Espectro de masa correspondiente al espectro de tiempo de la Figura 4-19, utilizando la calibración básica de un coeficiente.

CALIBRACIÓN BASICA DE DOS COEFICIENTES

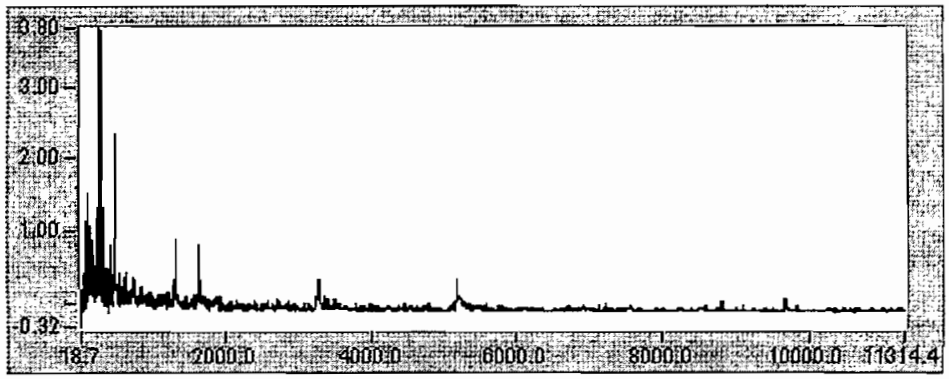
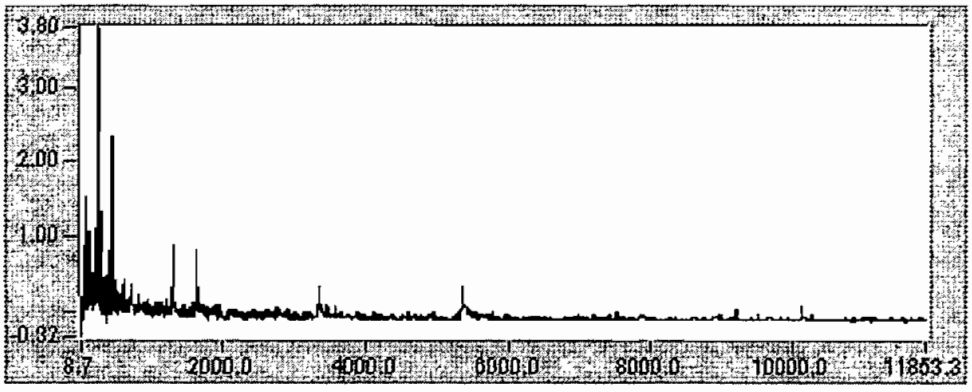
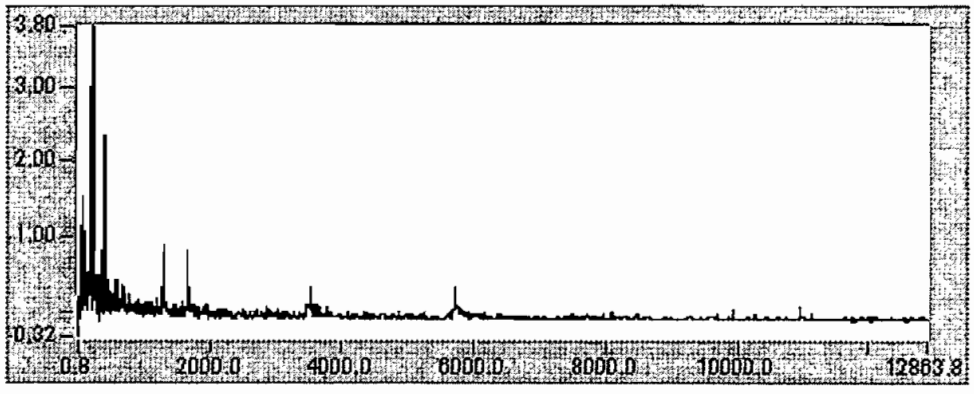


Figura 4-21 Espectro de masa correspondiente al espectro de tiempo de la Figura 4-19, utilizando la calibración básica de dos coeficientes

CALIBRACIÓN DE DOS PUNTOS

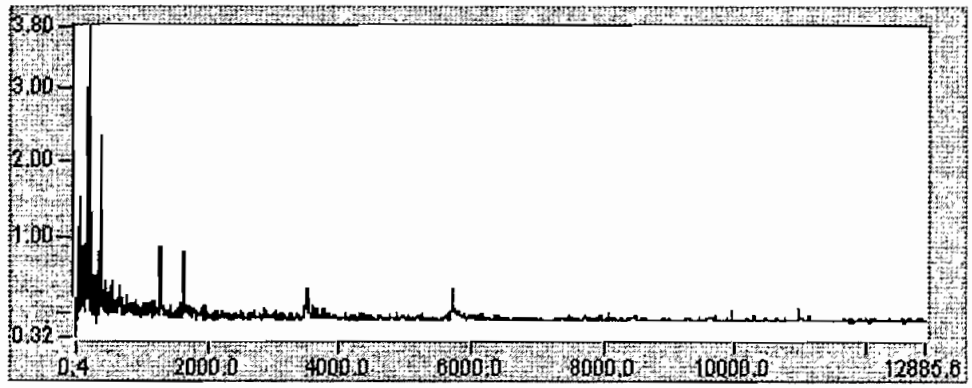


(a)



(b)

(c)



(d)

Figura 4-22 Espectro de masa correspondiente al espectro de tiempo de la Figura 4-19, utilizando la calibración de dos puntos. Usando como calibrantes las sustancias: a) angiotensina I y bombesina; b) angiotensina I e insulina; c) bombesina e insulina; d) angiotensina I, bombesina e insulina

CALIBRACIÓN DE TRES PUNTOS (3 O MÁS CALIBRANTES)

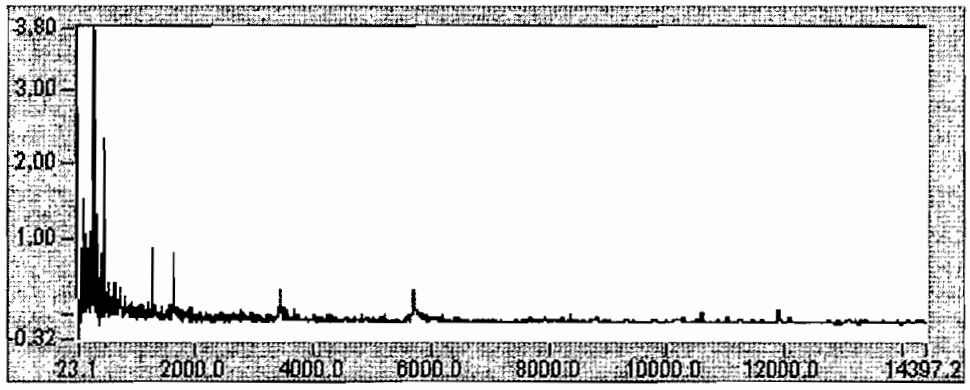


Figura 4-23 Espectro de masa correspondiente al espectro de tiempo de la Figura 4-19, utilizando la calibración de tres puntos (3 o más calibrantes)

CALIBRACIÓN TRES PUNTOS (3 O MENOS CALIBRANTES)

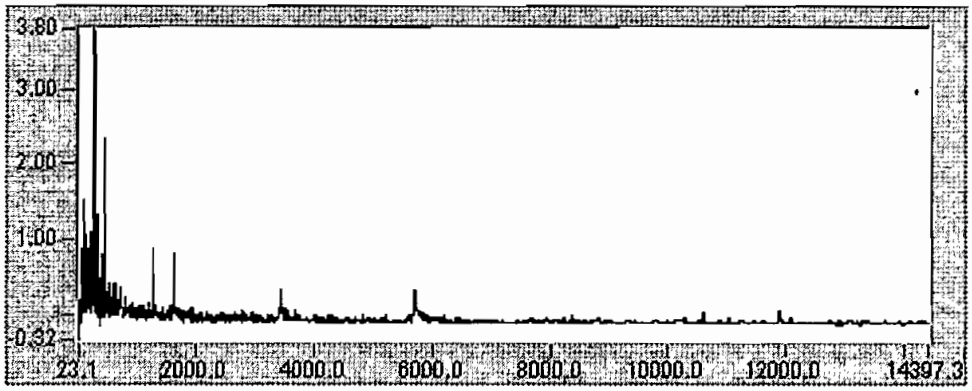


Figura 4-24 Espectro de masa correspondiente al espectro de tiempo de la Figura 4-19, utilizando la calibración de tres puntos (3 o menos calibrantes)

Los resultados en cuanto a: valores de los coeficientes obtenidos, valor de Mean Squared Error (M.S.E, en aquellos que se aplica algún tipo de regresión.), valor de la masa del glucagón asignada por cada calibración y porcentaje de error cometido en cada una de ellas, se muestran en la siguiente tabla:

Caso	Calibración	Calibrantes usados	a	b	c	M.S.E	Valor de la masa asignada por la calibración (Da)	Error Porcentual
A	Básica de 1 coeficiente	-	0	4.846E-7	0	-	2808.94	19.35
B	Básica de 2 coeficientes	B	-2.097E-6	4.846E-7	0	-	3286.38	5.65
C	De 2 puntos	A, B	-1.380E-6	4.668E-7	0	8.322E-40	3360.34	3.52
D	De 2 puntos	A, I	-3.928E-7	4.394E-7	0	2.869E-41	3521.02	1.09
E	De 2 puntos	B, I	-1.327E-7	4.360E-7	0	5.165E-41	3505.72	0.65
F	De 2 puntos	A, B, I	-2.856E-7	4.381E-7	0	2.718E-15	3513.15	0.87
G	De 3 puntos (3 o más calibrantes)	A, B, I	-2.511E-6	5.262E-7	-7.768E-10	1.913E-41	3440.39	1.22
H	De 3 puntos (3 o menos calibrantes)	A, B, I	-2.511E-6	5.262E-7	-7.768E-10	1.773E-25	3440.39	1.22

A - Angiotensina I; B – Bombesina; I - Insulina

Tabla 4-4 Resultados de las calibraciones aplicadas al espectro de la Figura 4-19

ANÁLISIS

Al examinar la tabla y comparar los porcentajes de error de todas las calibraciones, se observa que las calibraciones en las que los coeficientes se obtienen en base a parámetros externos, casos A y B, introducen un índice mayor de error. Esto se debe a la dificultad de medir con precisión el voltaje de aceleración y la longitud efectiva del tubo de vuelo, y además, en el supuesto que se lo logre estos valores pueden variar por efecto de la temperatura o por fluctuaciones de voltaje en el momento del experimento, por lo que este tipo de calibración no es muy recomendable.

Al comparar los casos A y B, se puede concluir que el coeficiente a no es tan insignificante, puesto que la incertidumbre en el instante inicial en el impacto del láser sobre la muestra, al cual representa este término, si es un factor que afecta en la calibración y su no inclusión introduce un valor muy alto de error.

En los resultados de la calibración de dos puntos se observa que cuando se determina la curva de calibración, es aconsejable que los calibrantes usados se encuentren cerca del intervalo de trabajo (caso E) y no es necesario que abarquen todo el espectro (caso D). Además, se debe evitar que la zona de interés este fuera de los valores usados como calibrantes (caso C).

Aunque en principio, mientras se trabaje con más calibrantes mejor será el ajuste, en este experimento no ocurrió así (comparando casos E y F), posiblemente debido a la falta de homogeneidad del pico de Angiotensina I que impide precisar el centroide del pico con buena aproximación.

De igual forma ocurre en el caso G que, en principio, al usar un mayor número de coeficientes el ajuste de la curva de calibración dará una mejor aproximación, esto no ocurre posiblemente debido a las mismas razones que en el caso anterior.

Para la calibración de tres puntos con 3 o menos calibrantes (caso H) se utilizó como calibración previa para el cálculo de la masa base, la que menor error dio de las anteriores (caso E). El resultado de esta calibración muestra que si bien converge en la dirección indicada, no lo hace en el valor apropiado. Además, se demuestra que esta calibración no sólo es aplicable para cuando se tiene una sustancia protonada para lo cual originalmente fue creado.

Al comparar el caso E y F se concluye que si bien el valor del M.S.E. es útil para indicarnos que tan bueno fue un ajuste, no lo es para indicarnos si la calibración es la más adecuada.

En esta misma prueba también se verificó el correcto funcionamiento del proceso de almacenamiento de la calibración, al ir almacenando cada una de las calibraciones realizadas y luego volviéndolas a utilizar para la conversión de la escala, dando como resultados los mismos valores de la tabla 4-4.

De lo que se observa en los resultados gráficos al realizar la conversión de escala, las únicas variaciones que existen es el paso de la escala de segundos a Daltons y la eliminación de la zona correspondiente al pre-trigger del espectro.

4.4.2. PRUEBA 2

Con el objeto de determinar un tiempo promedio de demora de conversión de la escala de tiempo a la escala de masa para cada una de las calibraciones de que dispone el programa, y con diferentes longitudes del registro, se adquirieron espectros con diferentes valores de sparsing y se procedió a aplicar cada una de las calibraciones obtenidas en el paso anterior.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente tabla:

Calibraciones	Tiempo de conversión (segundos)			
	1000 puntos	2000 puntos	4000 puntos	5000 puntos
Básica de un coeficiente	1.40E-2	2.80E-2	5.43E-2	6.90E-2
Básica de dos coeficientes	1.30E-2	2.80E-2	5.50E-2	6.70E-2
De dos puntos	1.40E-2	2.70E-2	5.62E-2	6.66E-2
De tres puntos (tres o más calibrantes)	4.60E-1	9.24E-1	1.84	1.98
De tres puntos (tres o menos calibrantes)	4.68E-1	9.19E-1	1.78	2.04

Tabla 4-5 Tiempos de conversión de escala para diferentes longitudes del registro y para cada una de las calibraciones.

ANÁLISIS

Cabe aclarar que la conversión de escala de tiempo a masa se la realiza una vez que se ha parado la adquisición de espectros, por lo que no se trata de un proceso en tiempo real y su duración está condicionada por la velocidad del procesador del computador. En este caso esta es de 66 MHz.

De los resultados obtenidos, se aprecia que las calibraciones de tres puntos son las que tienen el mayor tiempo de conversión. Esto es lógico, puesto que en estos casos se aplica un algoritmo iterativo.

La primera columna sirve de referencia para el osciloscopio Tektronix, puesto que la longitud de este es constante e igual a 1000 puntos.

Cuando se trabaja con un valor de longitud de 5000 puntos, caso LeCroy, el mensaje de falta de memoria enviado por el computador usado (Macintosh, RAM16 Mb) es casi continuo, pero se puede seguir trabajando sin problemas, Figura 4-25.

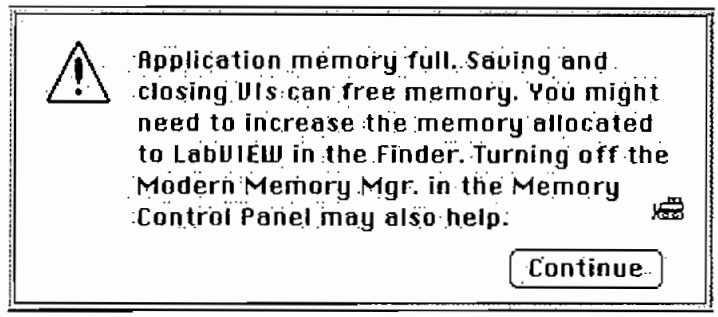


Figura 4-25 Mensaje de falta de memoria producido al trabajar con un número alto de puntos

4.5. ALMACENAMIENTO, LECTURA E IMPRESIÓN DE LA INFORMACIÓN ADQUIRIDA

Con el fin de comprobar el correcto funcionamiento de esta sección vital del software, se realizó el almacenamiento, la lectura de archivos y la generación de reportes.

4.5.1. PRUEBA 1 (ALMACENAMIENTO)

Con el fin de establecer el tamaño de los archivos creados por el programa **Aldebarán**, se realizó el almacenamiento de varias sesiones de trabajo.

En una sesión de trabajo se puede almacenar las formas de onda presentes tanto en la gráfica ESPECTRO como los de la gráfica SUMA, con los distintos picos y regiones definidas si así se lo deseara. La información que se archiva incluye siempre: el nombre del usuario, la fecha, los parámetros del osciloscopio, los coeficientes de calibración y el número de espectros sumados.

RESULTADOS

Para esta prueba se realizó la adquisición y la adición respectiva de varios espectros provenientes del canal 1. Luego se realizó la definición de picos tanto para el gráfico CANAL 1 como para el gráfico Σ CANAL 1, que corresponden al último espectro adquirido y a la suma de los espectros del canal 1, respectivamente. Todo esto con los dos osciloscopios. Y finalmente se almacenó parte o toda la información procesada. Las características de la información almacenada y el tamaño del archivo se muestran en la siguiente tabla:

Caso	Osciloscopio	Gráfico Canal 1		Gráfico Σ Canal 1			Tamaño del archivo Kb
		Gráfico almacenado	Número de picos almacenados	Gráfico almacenado	Número de espectros adicionados	Número de picos almacenados	
A	Tektronix	NO	-	SI	15	3	12.615
B	Tektronix	NO	-	SI	30	3	12.615
C	Tektronix	NO	-	SI	15	0	12.366
D	Tektronix	NO	-	SI	15	1	12.449
E	Tektronix	SI	3	SI	15	3	25.053
F	LeCroy	NO	-	SI	15	3	48.468
G	LeCroy	NO	-	SI	30	3	48.468
H	LeCroy	NO	-	SI	15	0	48.202
I	LeCroy	NO	-	SI	15	1	48.290
J	LeCroy	SI	3	SI	15	3	96.785

Para LeCroy se trabajo en la escala de tiempo de 10 μs y un valor de sparsing de 10, lo que equivale a la transferencia de 4000 puntos.

Tabla 4-6 Tamaño de archivos

ANÁLISIS

Al comparar entre el caso A y B o entre F y G, se aprecia que no existe variación en cuanto al tamaño del archivo creado debido a que no importa cuantos espectros se sumen, al fin y al cabo el número de puntos que representan al espectro final se mantienen.

Al comparar entre A y F, se observa que existe una relación aproximada de 1 a 4 en el tamaño de los archivos pese a que se tenga el mismo número de picos almacenados, esto debido al uso de diferentes osciloscopios, ya que mientras para Tektronix se almacenan 1000 puntos por gráfico para LeCroy son 4000 puntos por gráfico.

Al comparar entre C y D o entre H e I, se deduce que el espacio ocupado por cada pico almacenado es de aproximadamente entre 80 y 90 bytes, sin importar con que osciloscopio se trabaje, puesto que la diferencia está marcada por la longitud del nombre que se le de a cada pico.

Al comparar entre A y E o entre F y J, se observa que al adquirir el doble de características gráficas, esto es trabajando tanto con el último espectro como con su suma con el mismo número de picos definidos, el espacio utilizado se duplica, como era de esperarse.

4.5.2. PRUEBA 2 (LECTURA)

Con el fin de comprobar que los datos almacenados no se alteran y es posible seguir manipulándolos, se realizó la lectura de una sesión anterior.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Como se puede apreciar en la siguiente figura, el proceso de lectura permite seguir manipulando el espectro adquirido e incluso orientar al usuario a definir parámetros óptimos del osciloscopio o para seguir adicionando espectros.

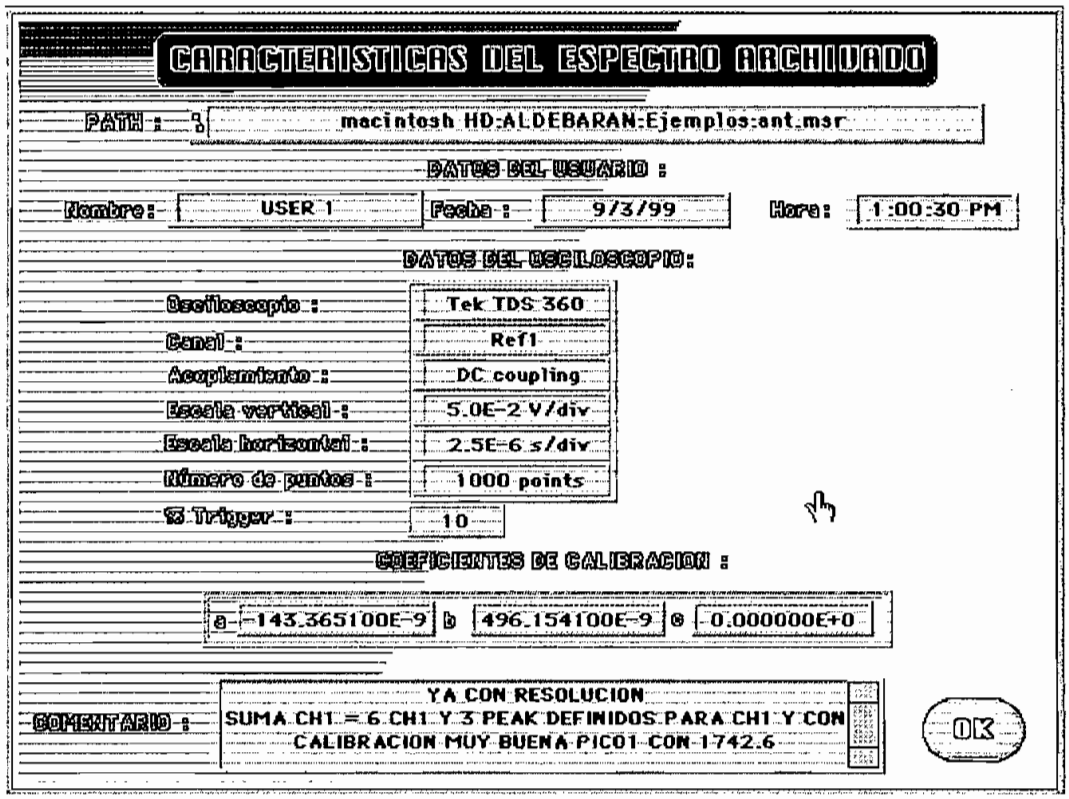


Figura 4-26 Pantalla de características bajo las cuales se adquirió el espectro almacenado

4.5.3. PRUEBA 3 (GENERACIÓN DE REPORTES)

Con el fin de comprobar que los datos procesados pueden ser imprimidos, se realizó la generación de reportes a partir de los resultados obtenidos en una sesión de trabajo.

RESULTADOS

El espectro analizado corresponde a la adición de 36 espectros. Se ha incluido a más del espectro adquirido un pico y una región. Y se trabajó con ambos tipos de agrupamiento de impresión (alto y bajo), así como en los dos tipos de escala horizontal (tiempo y masa).

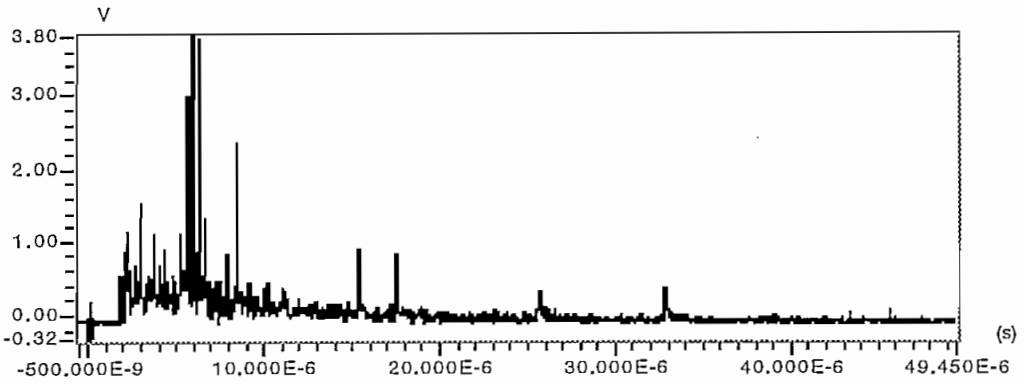
Para tener acceso al formato de reporte en la escala de masa se realizó una calibración previa.

Los resultados se indican a continuación:

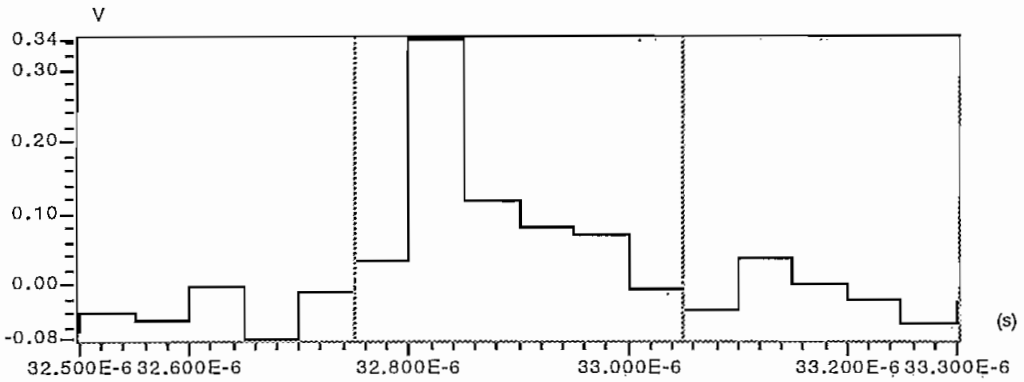
Path: macintosh HD:ALDEBARAN:Ejemplos:ej reporte.msr

ALDEBARAN

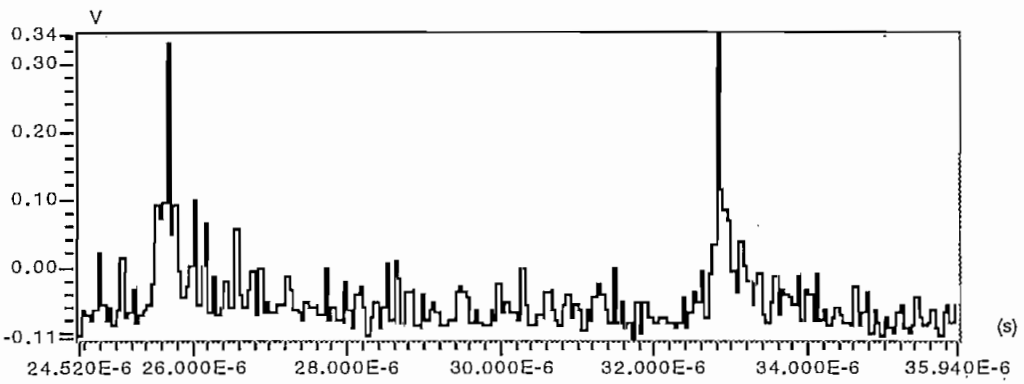
©: RA / CC



Complete spectrum



Insulina : C: 3.289E-5 (s) 5735.096 (Th) R: 251.38



Glucagón e Insulina

Acquisition :

USUARIO 1 6/9/00 11:36:07 AM Tek TDS 360 Ch1 DC coupling 5.0E-2 V/div 2.5E-6 s/div 1000 points

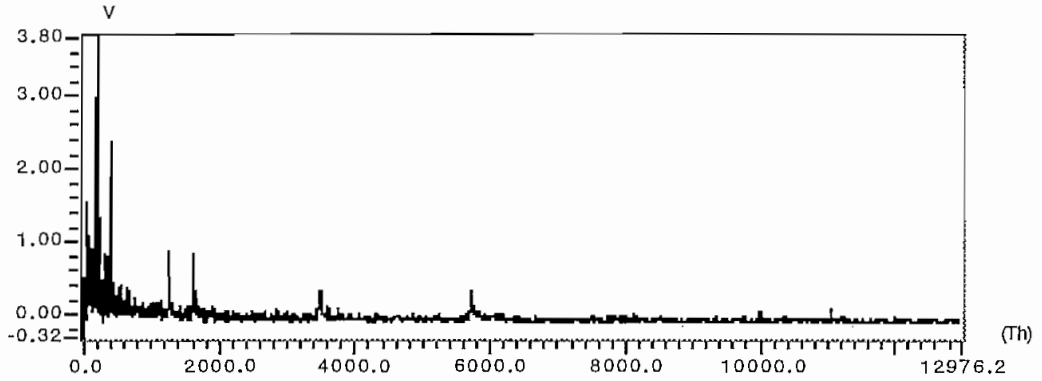
Coef. de Calibracion: t = a + b*√(m/z)+c*(m/z) a: 3.748E-8 b: 4.338E-7 c: 0.000E+0 Trigger: 1 %

Now :

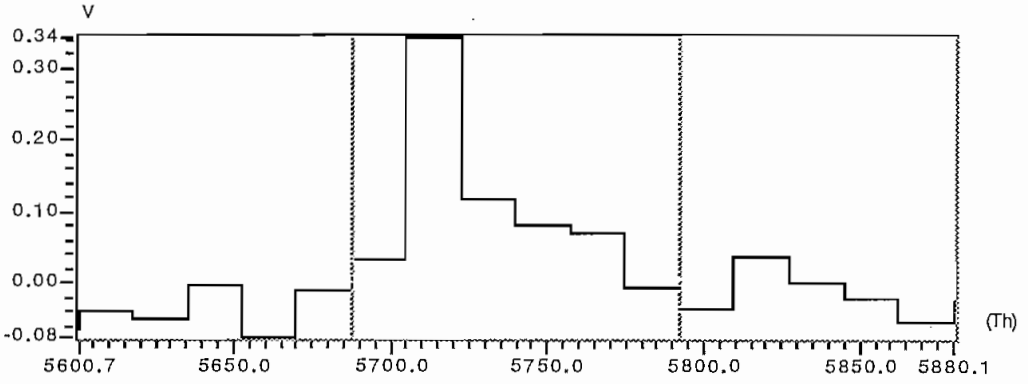
ROBERT 6/9/00 12:27:04 PM

ALDEBARAN

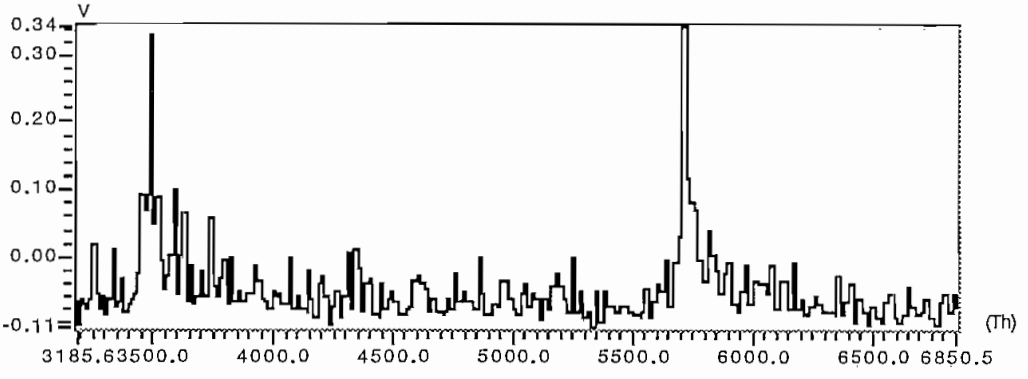
©: RA / CC



Complete spectrum



Insulina : C: 3.289E-5 (s) 5735.096 (Th) R: 251.38



Glucagón e Insulina

Acquisition :

USUARIO 1	6/9/00	11:36:07 AM	Tek TDS 360	Ch1	DC coupling	5.0E-2 V/div	2.5E-6 s/div	1000 points
Coef. de Calibracion:	t = a + b*√(m/z)+c*(m/z)	a: 3.748E-8	b: 4.338E-7	c: 0.000E+0		Trigger: 1 %		

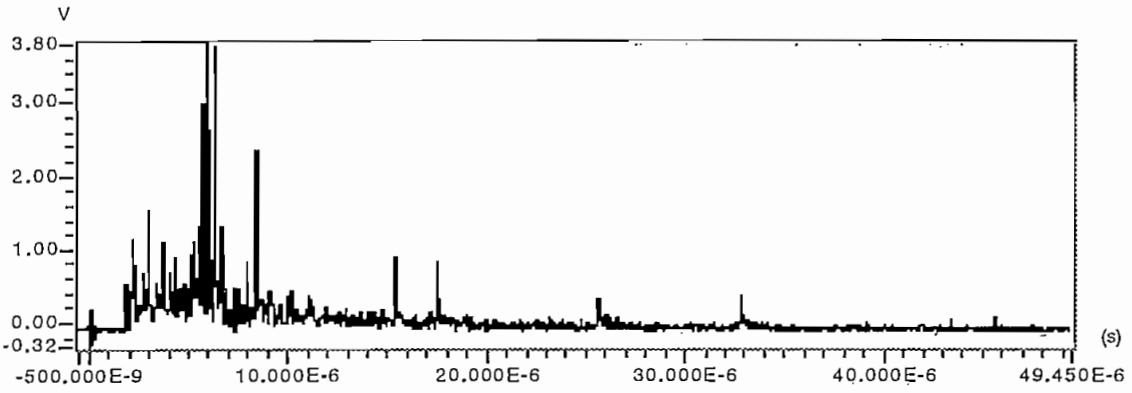
Now :

ROBERT 6/9/00 12:27:08 PM

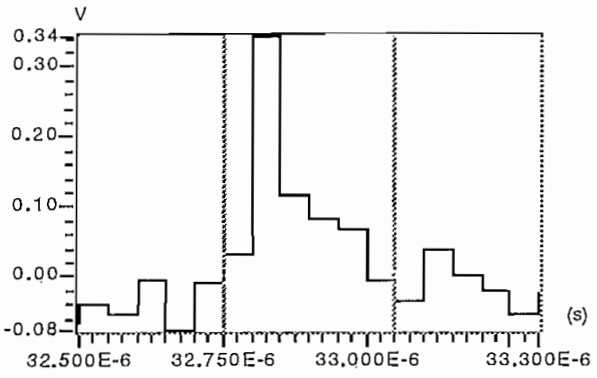
ALDEBARAN

Path: macintosh HD:ALDEBARAN:Ejemplos:ej reporte.msr

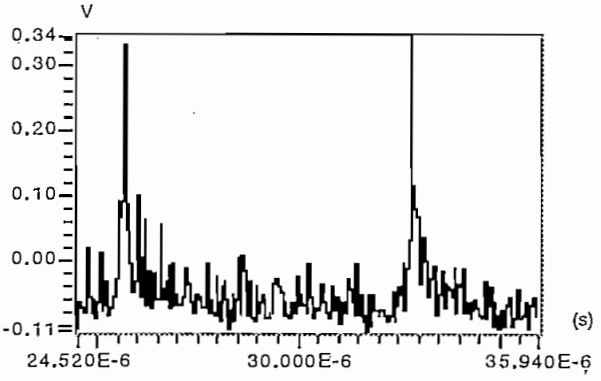
©: RA / CC



Complete spectrum



Insulina : C: 3.289E-5 (s) 5735.096 (Th) R: 251.38



Glucagón e Insulina

Acquisition :

USUARIO 1	6/9/00	11:36:07 AM	Tek TDS 360	Ch1	DC coupling	5.0E-2 V/div	2.5E-6 s/div	1000 points

Coef. de Calibracion: $t = a + b*\sqrt{(m/z)} + c*(m/z)$ a: 3.748E-8 b: 4.338E-7 c: 0.000E+0 Trigger: 1 %

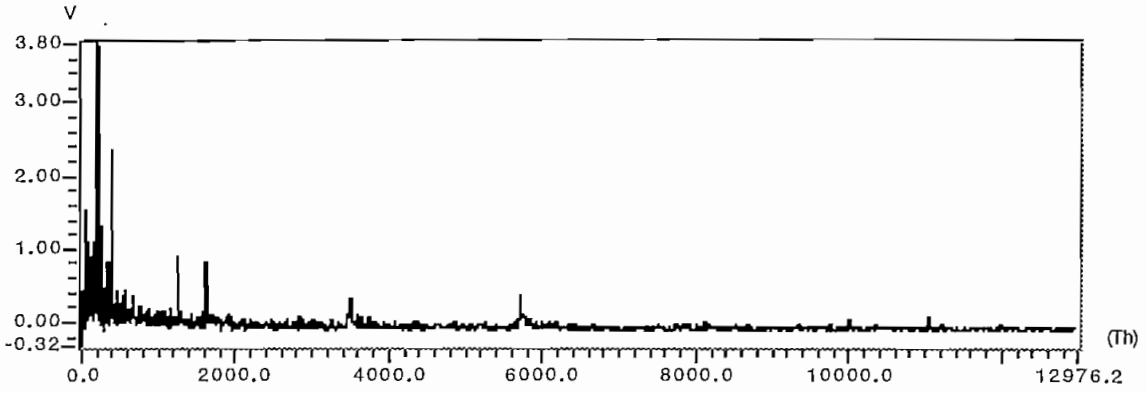
Now :

ROBERT 6/9/00 12:39:10 PM

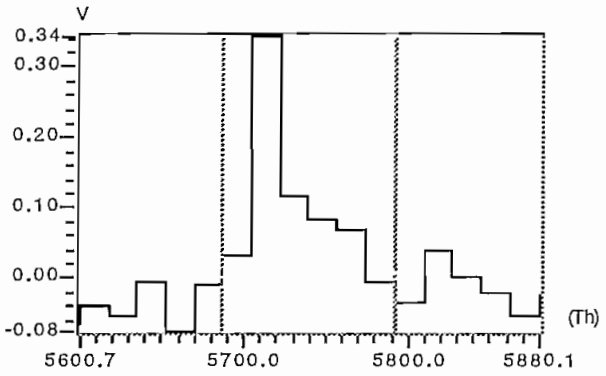
ALDEBARAN

Path: macintosh HD:ALDEBARAN:Ejemplos:e] reporte.msr

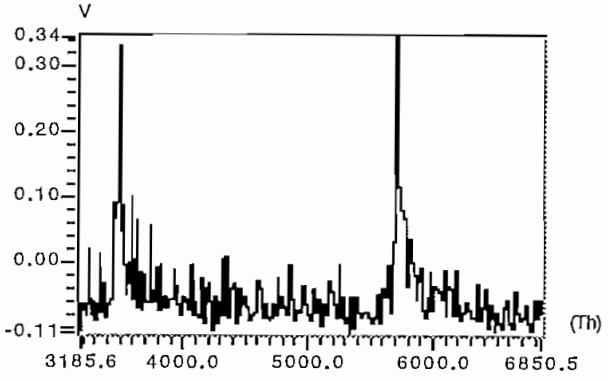
©: RA / CC



Complete spectrum



Insulina : C: 3.289E-5 (s) 5735.096 (Th) R: 251.38



Glucagón e Insulina

Acquisition :

USUARIO 1 6/9/00 11:36:07 AM Tek TDS 360 Ch1 DC coupling 5.0E-2 V/div 2.5E-6 s/div 1000 points

Coef. de Calibracion: t = a + b*√(m/z)+c*(m/z) a: 3.748E-8 b: 4.338E-7 c: 0.000E+0 Trigger: 1 %

Now :

ROBERT 6/9/00 12:39:18 PM

La siguiente tabla indica los formatos que se usaron en los diferentes reportes presentados:

Reporte	Escala horizontal	Agrupamiento
Reporte 1 (Pág. 122)	Tiempo	Bajo
Reporte 2 (Pág. 123)	Masa	Bajo
Reporte 3 (Pág. 124)	Tiempo	Alto
Reporte 4 (Pág. 125)	Masa	Alto

Tabla 4-7 Formatos usados en la generación de los reportes

ANÁLISIS

De estos resultados, se observa que en todos los reportes se muestra el espectro completo, y que los picos y regiones se presentan con su respectivo nombre, y en el caso de los picos con sus valores de centroide y resolución.

Además, independientemente de que si seleccionó en escala de tiempo o de masa, en los reportes impresos, se observa que los gráficos de los picos están siempre acompañados del valor del centroide en valores de tiempo y masa, siempre que se haya calibrado.

Adicionalmente, a la presentación de los gráficos, se anexa la información correspondiente al nombre del programa, los parámetros del osciloscopio bajo los cuales se adquirieron, el nombre del usuario, la fecha y la hora de adquisición y en momento de la impresión, los coeficientes de calibración, la dirección de archivo de registro de la sesión, el número de página y el número de espectros adquiridos. Toda la información se presenta en inglés.

La única diferencia entre los dos modos de agrupamiento es el número de gráficos por hoja y obviamente la diferencia de tamaños de las gráficas.

Un detalle durante la impresión es que, debido a la capacidad de la memoria del computador usado (Macintosh, RAM16 Mb) y de la impresora (Apple Láser, RAM 2 Mb), el proceso se demora y es conveniente salir de otras aplicaciones para que se ejecute la impresión.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La elaboración del presente trabajo y sus pruebas posteriores genera conclusiones y comentarios importantes que se exponen en este capítulo.

CONCLUSIONES

El sistema de adquisición de datos implementado, Aldebarán, permite controlar el osciloscopio y transferir los espectros hacia el computador, y también provee de herramientas matemáticas de análisis para los espectros de masa obtenidos desde un espectrómetro MALDI. Este sistema facilita significativamente el trabajo de los usuarios del espectrómetro.

Una conclusión importante es que el programa LabVIEW sí provee de un ambiente integrado en el que es posible desarrollar un sistema completo de instrumentación, incluyendo: adquisición, análisis, presentación y administración de la información adquirida desde el espectrómetro de masas a través del osciloscopio digital.

En el diseño y construcción del sistema se ha hecho uso de librerías de drivers GPIB, implementados en el LabVIEW, para instrumentos de la misma familia de los dos osciloscopios digitales utilizados con el espectrómetro de masas, por lo que sólo fue necesario hacer modificaciones importantes a algunos de los VIs que conforman a dichos drivers. Esto refuerza la conclusión anterior en el sentido de que este ambiente de desarrollo es ideal para solucionar este tipo de problemas.

Los valores digitalizados de la forma de onda que se presenta en la pantalla del osciloscopio corresponden a los mismos que se envían al computador, puesto que los valores que entrega el conversor A/D interno del osciloscopio son almacenados en una memoria interna de donde se envían tanto a la sección de visualización del osciloscopio como al computador. Esto quiere decir que cualquier error de cuantización es atribuible al osciloscopio mismo y no al computador o a LabVIEW que se limitan a procesar los datos ya digitalizados provenientes del osciloscopio.

En un osciloscopio digital, tener una longitud de registro más grande implica tener un mayor número de muestras (puntos) en un mismo espacio de tiempo. En el lenguaje de la espectrometría de masas esto equivale a tener una mayor resolución. Es decir, a la posibilidad de separar de mejor manera los picos correspondientes a masas muy cercanas o a un nivel de detalle más grande. La resolución final está dada por las condiciones básicas del instrumento y por la longitud de registro del osciloscopio usado.

Por tanto, como en el osciloscopio LeCroy se puede tener hasta 50000 muestras, mientras que en el Tektronix solamente 1000, los mejores niveles de resolución deben esperarse únicamente cuando se usa el primero. Sin embargo, las limitaciones de la memoria del computador obligaron a limitar el número de puntos enviados al mismo, lo que se ha logrado en este caso, utilizando un sparsing mínimo de 10.

El tiempo medio en transferir un espectro al computador cuando se usa el osciloscopio Tektronix es de aproximadamente 2 segundos (transferencia de 1000 puntos), y para el osciloscopio LeCroy de 1.5 segundos (transferencia de 4000 puntos). Cabe hacer notar que estos tiempos están determinados por la velocidad del procesador del computador, que en este caso es de 66 MHz. Los tiempos de demora en la transferencia de las ondas desde el osciloscopio al computador corresponden a los tiempos muertos del sistema de adquisición de datos para cada osciloscopio, lo que significa que durante estos tiempos los espectros que se produzcan no serán adquiridos por el osciloscopio.

Lo anterior permite concluir que el osciloscopio LeCroy, pese a transferir un mayor número de puntos en comparación con el osciloscopio Tektronix, tiene un tiempo muerto inferior. Esto se debe particularmente a las características internas de la interfaz GPIB propia de cada osciloscopio.

La precisión en la asignación de masa a una sustancia depende más de las características de la muestra analizada, del espectrómetro, así como de la habilidad del usuario en medir los parámetros bajo los cuales se opera el experimento y en definir apropiadamente los picos usados como calibrantes en dicha asignación. Los errores que se introducen en el proceso de conversión de escala de tiempo a masa comparados con los anteriores son mucho menores.

La conversión de escala de tiempo a masa no es un proceso en tiempo real y su duración está condicionada por la velocidad del procesador del computador (66 MHz). Durante las pruebas a las que se sometió al software se obtuvo un tiempo máximo de conversión de 2.04 s para un espectro de 5000 puntos, usando el proceso iterativo. Sin embargo, estos tiempos de conversión no son críticos para el proceso de análisis que típicamente toma tiempos mucho más largos.

El programa implementado no solo servirá en la parte de adquisición de datos desde el osciloscopio para el espectrómetro de masas, sino también para cualquier otro experimento que implique el uso del osciloscopio, aun más se permite la utilización de las múltiples posibilidades que ofrece el osciloscopio como es el manejo del trigger, la lectura de los dos canales a la vez, así como de los registros de memoria en el osciloscopio.

Debido a que LabVIEW es un programa multiplataforma, este programa es fácilmente exportable a otro tipo de sistema operativo como Windows 95, aunque cabe señalar el hecho de que la tarjeta NuBus-GPIB es exclusiva para Macintosh.

El sistema de adquisición de datos implementado, Aldebarán, se encuentra actualmente en uso en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Departamento de Física, por lo que se constituye en un valioso aporte a esta entidad y por ende a la misma Escuela Politécnica Nacional.

RECOMENDACIONES

De lo resultados obtenidos se recomienda que la frecuencia de disparo del láser para la generación de espectros, cuando se trabaje con un solo canal y con el osciloscopio Tektronix sea menor a 0.5 Hz y para LeCroy menor 0.67 Hz. Cuando se trabaje con los dos canales esta frecuencia deberá ser menor.

Debido a que el panel de conectores de los VIs solo tienen un máximo de 20 terminales, si un panel frontal contiene más de 20 controles e indicadores que se desean usar programáticamente para realizar la interfaz de comunicación con otros VIs, existe la necesidad de agrupar a algunos de ellos en un clúster y asignar al clúster un terminal del conector.

Para aprovechar la capacidad de muestreo del osciloscopio LeCroy, sin tener que minimizar el número de puntos digitalizados que se muestrean, es necesario incrementar la memoria RAM en por lo menos 16 Mb.

Es necesario ir almacenando los VIs creados en varias librerías (VI libraries .LLBs) a causa de que salvar los archivos toman mucho tiempo si el tamaño de nuestra librería incrementa. Una buena regla de manejo es evitar crear librerías de VIs mayores de 1 MB. Aun que no existe un límite real en el tamaño de una librería.

Debido a que no es posible asignar gráficos a los botones, se recomienda realizar el siguiente proceso: colocar la figura como fondo y sobre esta colocar el botón, al cual se lo vuelve transparente mediante la herramienta *Coloring*. Dando la apariencia final de haber insertado una gráfica en el botón.

Cuando se utiliza un *Multiple Selection Listbox* especialmente dentro de un subVI, es necesario inicializar el arreglo perteneciente a este control, puesto que tiene la característica de mantener los elementos seleccionados de esta caja de diálogo, lo que provoca que pese a que ciertas opciones sean deshabilitadas permanezcan aún como elementos seleccionados lo cual inducirá en errores.

Si bien por facilitar el acceso a un conjunto dado de valores y evitar hacer conexiones, el uso de variable globales facilitan esto, estas implican un mayor uso de la memoria, ya que cuando se lee se crea una copia de los datos almacenados en la variable global y si se manipulan largos arreglos y strings, el tiempo y la memoria que se necesita para

manipular puede ser considerable. Una técnica recomendable para minimizar el uso de memoria es el uso de los shift registers.

Otras recomendaciones para mejorar el manejo eficiente de memoria son:

- Dividir un VI en varios subVIs, a causa de que LabVIEW puede reclamar la memoria de datos del subVI cuando este no se esté ejecutando.
- En los paneles, no desplegar largos arreglos y strings a menos que sea necesario.
- Usar tipos de datos consistentes, en especial para arreglos, y mirar la coerción de los puntos cuando pasan los datos a subVIs; aunque LabVIEW cambia el tipo de datos, la salida es un nuevo buffer.
- No usar complicados tipos de jerarquía por ejemplo: arreglo de clústers conteniendo arreglos o strings largos, o clústers conteniendo largos arreglos o strings. Se podría terminar usando más memoria y afectando el desempeño.

BIBLIOGRAFÍA

[1] N. Medina, E. Ayala, E. Avalos, C. Costa V., "Construcción y prueba de un espectrómetro de tiempo de vuelo lineal que utiliza la técnica MALDI para la desorción y ionización de biomoléculas", Reporte EPN Premio Politécnica Nacional 1996, Quito-Ecuador.

[2] César Costa V., "Espectrometría de Masas: MALDI", Reporte interno Dpto. Física EPN, 1996, Quito-Ecuador.

[3] César Costa V., "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry, Reporte interno Dpto. Física EPN, 1997, Quito-Ecuador.

[4] César Costa V., "Un método sencillo para estimar las velocidades iniciales medias en MALDI (TOF)-MS", Memorias V encuentro de Física EPN, 1995, Quito-Ecuador.

[5] César Costa V., "Uso de Espectrómetros de tiempo de vuelo para estudiar la fragmentación metaestable en MALDI_MS", Memorias VI encuentro de Física EPN, 1997, Quito-Ecuador.

[6] Cristian Santacruz, "Estudio de la Operación de un Espectrómetro de Masas de Tiempo de Vuelo con Reflectrón y Extracción retardada mediante simulación", Tesis de grado de la Facultad de Ciencias EPN, Quito-Ecuador 1998.

[7] Franz Hillenkamp, Michael Karas, Ronal C. Beavis, Brian T. Chait, "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers, Analytical Chemistry, Vol. 63, No.24, Diciembre 15,1991.

[8] Galileo Electro-optics Corp., "HOT Microchannel Plates", DataSheet N° 9200 USA.

[9] LeCroy, "Digital Instrument Features".

[10] LeCroy, "Operator's Manual, Dual Channel Digital Oscilloscope Model 9450A", Nov. 1991.

[11] LeCroy, "Remote Control Manual, Dual Channel Digital Oscilloscope Model 9450A", Nov. 1991.

[12] National Instruments, "Catalogue Instrumentation 1998".

[13] National Instruments, "GPIB, Getting Started with Your NB-GPIB/TNT and the NI-488.2 Software for MacOs", 1997.

[14] National Instruments, "GPIB, NI-488.2 User Manual for MacOs", 1997.

[15] National Instruments, "LabVIEW, Analysis VI Reference Manual", 1994.

[16] National Instruments, "LabVIEW, Function Reference Manual", 1994.

[17] National Instruments, "LabVIEW, Instrument I/O Reference Manual", 1994.

[18] National Instruments, "LabVIEW, Tutorial for Macintosh", 1994.

[19] National Instruments, "LabVIEW, User Manual for Macintosh", 1994.

[20] Oscar Cerón, "Folleto de Métodos Numéricos", Facultad de Ingeniería Eléctrica, EPN, Quito-Ecuador.

[21] Robert J. Cotter, "Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Structural Analysis of Biological Molecules", Analytical Chemistry, Vol. 64, No.21, Noviembre 1,1992.

[22] Tektronix, "Programmer Manual, TDS 340,TDS 360 & TDS 380 Digital Real-Time Oscilloscopes", 1995.

[23] Tektronix, "User Manual, TDS 340,TDS 360 & TDS 380 Digital Real-Time Oscilloscopes", 1995.

[24] The American Society for Mass Spectrometry, "What is Mass Spectrometry?", 3ra ediciión, 1998.

Direcciones de internet:

[1] http://prowl.rockefeller.edu/methods/calibrat.htm (Calibración de espectros)

[2] http://www.serrano.net/agusbo/osc/osc_1.htm (Osciloscopio)

ANEXO A

Esta sección lista los instrumentos virtuales agrupados por la función que cumplen.

CONTROL DE LOS OSCILOSCOPIOS

ICONO	NOMBRE DEL VI	DESCRIPCIÓN
	Initialize	Este VI establece la sesión de comunicación con el instrumento basado en la información del control "instrument descriptor" e identifica si se trata del osciloscopio LeCroy 9450A o Tektronix TDS 360. Este VI debe correr antes de usar cualquiera de los otros "instrument driver VIs" de estos dos instrumentos. El subVI Instr Open utilizado por este VI crea un "instr handle" que es usado por el resto de los VIs de la librería VISA Transition para ejecutar operaciones en esta sesión.
	Close	Este VI cierra la interfaz de comunicación entre el computador y el osciloscopio con el que se enlazó.
OSCILOSCOPIO TEKTRONIX TDS 360		
	Config osc TKT TDS 360	Este VI realiza la configuración de los parámetros considerados más importantes del osciloscopio Tektronix TDS 360 desde el computador. Se configura la escala de tiempo, la compresión horizontal de la onda, la escala de voltaje de ambos canales, el modo de adquisición y el trigger. Si se desea agregar el control de algún otro parámetro no presente, simplemente se lo crea en el panel frontal y se lo conecta en el diagrama de bloques con alguno de los subVIs que conforman este VI, si es que tiene relación; caso contrario, se debe buscar cual de los drivers que posee el CD de LabVIEW lo puede controlar para importarlo al programa.
	Tek TDS 360 Config Chan	Este VI configura los parámetros verticales de un canal del osciloscopio Tektronix TDS 360 como: voltios/división, acoplamiento, offset, posición horizontal, inversión de la onda y el ancho de banda. Si el canal a ser configurado está apagado cuando se ejecute este VI, lo que primero hará es encenderlo. Además automáticamente detecta la atenuación de la punta de prueba siempre y cuando sea de la serie Tektronix.
	Tek TDS 360 Config Edge	Este VI selecciona y configura los parámetros del trigger en el osciloscopio Tektronix TDS 360, como son: el modo, la fuente, el acoplamiento, la pendiente, el nivel de voltaje y la posición horizontal (pre-trigger). La señal de trigger ocurre cuando una señal pasa a través de un nivel de voltaje y en una dirección previamente especificados.

	Tek TDS 360 Config Horiz	Este VI fija los parámetros horizontales del osciloscopio Tektronix TDS 360 como son: el tiempo por división, la posición horizontal de la onda en el display y la operación de compresión horizontal de la onda.
	Tek TDS 360 Config Acquisition	Este VI fija el modo de adquisición de las ondas y la condición bajo la cual el osciloscopio parará la adquisición.
OSCILOSCOPIO LECROY 9450A		
	Config osc LeC 9450A	Este VI realiza la configuración de los parámetros considerados más importantes del osciloscopio Lecroy 9450A desde el computador. Se configura la escala de tiempo, la escala de voltaje de ambos canales, el modo de adquisición y el trigger. Si se desea agregar el control de algún otro parámetro no presente, simplemente se lo crea en el panel frontal y se lo conecta en el diagrama de bloques con alguno de los subVIs que conforman este VI, si es que tiene relación; caso contrario, se debe buscar cual de los drivers que posee el CD de LabVIEW lo puede controlar para importarlo al programa.
	LeC 9450A Config Chan	Este VI configura los parámetros verticales de un canal del osciloscopio LeCroy 9450A, tales como: voltios/división, acoplamiento, offset y atenuación de la punta.
	LeC 9450A Config Edge	Este VI selecciona y configura los parámetros del trigger en el osciloscopio Lecroy 9450A, como son: el modo de adquisición, la fuente, el acoplamiento, la pendiente, el nivel de voltaje y el delay. Este osciloscopio tiene la capacidad de que el delay puede ser usado como pre o post-trigger.
	LeC 9450A Config Horiz	Este VI fija el modo del intervalo de muestreo, especifica la base de tiempo y controla el ancho de banda. El control de intervalo de muestreo (RIS) tiene efecto solamente si la base de tiempo es mayor que 5 ns y menor o igual a 5 us. Para una base de tiempo menor o igual a 5 ns, el intervalo de muestreo es automáticamente encendido. Para una base de tiempo mayor a 5 us, el intervalo de muestreo es automáticamente apagado. Pero debido a que en el modo de RIS la adquisición requiere de una serie de triggers semejantes, no se lo usará en el programa y la menor base de tiempo usada será 10 ns.

TRANSFERENCIA DE LOS ESPECTROS AL COMPUTADOR

ICONO	NOMBRE DEL VI	DESCRIPCIÓN
	Tek TDS 360 Read Waveform	Este VI lee la o las ondas seleccionadas del osciloscopio Tektronix TDS 360. Se puede leer la onda entera, o un segmento de la onda especificada por puntos o por los cursores verticales. El número de puntos máximo que pueden

		ser leídos son 1000. Además, se despliega los parámetros del osciloscopio bajo los cuales se realizó la adquisición. El formato de la onda es el de los gráficos "waveform graph", es decir, un clúster de tres elementos: t(0) : offset horizontal (s), está relacionado con el trigger dt : intervalo horizontal (s) entre los puntos Array : arreglo de los valores de voltaje (V). Debido a que se trabajan con voltajes negativos en el espectrómetro de masas, las ondas que llegan desde el osciloscopio son invertidas.
	LeC 9450A Read Waveform	Este VI lee la o las ondas seleccionadas del osciloscopio LeCroy 9450A. El número de puntos que pueden ser leídos depende de la capacidad de memoria del computador, por lo que con el control "sparsing" se puede minimizar el número de puntos enviados. El número de puntos depende de la escala de tiempo, el mínimo es 96 ptos y el máximo 50000 ptos. Además, se despliega los parámetros del osciloscopio bajo los cuales se realizó la adquisición. El formato de la onda es el de los gráficos "waveform graph", es decir, un clúster de tres elementos: t(0) : offset horizontal (s), está relacionado con el trigger dt : intervalo horizontal (s) entre los puntos Array : arreglo de los valores de voltaje (V). Debido a que se trabajan con voltajes negativos en el espectrómetro de masas, las ondas que llegan desde el osciloscopio son invertidas.
	Inic,Idn,Conf,Adq	Este VI contiene una serie de subVIs que permiten inicializar la interfaz de comunicación con el osciloscopio e identificarlo (LeCroy 9450A o Tektronix TDS 360). Una vez que se ha identificado el osciloscopio con el que se realiza la comunicación se puede acceder a la configuración de dicho dispositivo, además se sondea el estado del trigger y la señal de adquisición para realizar la lectura de las ondas con sus respectivas características.

ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS

PRESENTACIÓN VISUAL DE LOS ESPECTROS		
	Array of clusters waveform graph	Este VI permite formar un arreglo de clústers para enviar dos gráficos a un mismo waveform graph. Dependiendo de las características de la adquisición, a este arreglo se lo particiona o no. Además se determina el color del primer gráfico del arreglo.

SUMA DE ESPECTROS		
ICONO	**NOMBRE DEL VI**	**DESCRIPCIÓN**
	Suma	Este VI compara si las características en la escala de tiempo (to y dt) del espectro adquirido y de la suma han variado; si es falso, al detectar el comando de suma o resta se efectúa la operación (modo manual) y si está en modo automático y se ha adquirido un nuevo espectro, la operación de suma se efectúa sin ningún otro control. Las operaciones de suma y resta consisten en mantener los valores de to y dt del espectro y sumar o restar, respectivamente, los valores de voltaje (arreglo Y). La operación de resta es válida sólo en modo manual y se resta únicamente el último espectro adquirido. Si se ha cambiado las características en la escala de tiempo o si la señal de entrada de reset ha sido enviada desde el programa principal el valor de la suma se reinicia desde cero. Todo esto tanto para el canal 1 como el canal 2.
DEFINICIÓN DE PICOS		
	Detección del pico	Este VI permite detectar y definir un pico y calcular los valores de su centroide y resolución, en base al valor de porcentaje de background de la ventana en la cual se está analizando, la posición del cursor en forma horizontal y vertical ya que estos definen el punto a partir del cual se empieza a buscar el pico y el nivel de referencia, respectivamente. .
	Background	Este VI permite ingresar los valores de porcentaje que serán usados para el cálculo del "background" de las ventanas A, B y C.
	Cálculo hb	Este VI calcula el valor del "background" de la ventana seleccionada. El cálculo se lo realiza ordenando en forma ascendente el arreglo de los valores Y (voltaje) de todo el espectro, una vez realizado esto el valor del porcentaje permitirá ubicar al elemento del arreglo cuyo valor será tomado como valor de background.
	Cálculo ki y kd	Este VI define los límites izquierdo (ki) y derecho (kd) del pico.
	Nombre	Este VI permite ingresar el nombre de un pico o de una región en el momento que se lo define.
	Picos y Regiones	Debido a que en un solo arreglo se anexan las características del pico o de la región que se van definiendo, este VI permite separar en arreglos diferentes las características de los picos y las regiones definidas, así como sus nombres.

	Redef centroide y resolución	Una vez que se ha definido un pico en una ventana puede existir la necesidad de redefinirlo, para lo cual se utilizan los cursores: Cur izq y Cur der que lo delimitan. La nueva posición de los cursores definen el nuevo pico, y por medio de este VI se calculan sus nuevos valores de centroide y de resolución. Al igual que en el caso del VI Def centroide y resolución, el tamaño de la ventana es 5 puntos adicionales en cada extremo, para tener una mayor apreciación del pico sobre el espectro.
CÁLCULO DEL CENTROIDE Y RESOLUCIÓN		
	Def centroide y resolución	Una vez que se determina entre que puntos está comprendido el pico, se realiza el cálculo de los valores del centroide y de la resolución por medio de este VI. Además, se determina la posición de los cursores que definen la localización del pico en la ventana. El tamaño de la ventana es 5 puntos adicionales en cada extremo, para tener una mayor apreciación del pico sobre el espectro.
	Sub centroide y resolución	Este VI realiza el cálculo de los valores del centroide y de la resolución de un pico una vez que se ha definido el punto a partir del cual se inicia y su extensión.
	Cambio de centroide y resolución	Este VI realiza los cambios de los valores del centroide y la resolución de los picos definidos para los cuatro gráficos (canal 1, canal 2, Σ canal 1 y Σ canal 2), cuando se adquiere un nuevo espectro bajo las mismas condiciones de la escala de tiempo con el que se determinaron dichos picos.
	Sub cambio centroide y resolución	Este VI es usado para redefinir los valores del centroide y de la resolución de un pico previamente definido cuando las condiciones del espectro han variado, ya sea porque se ha adquirido uno nuevo o porque se le añadido un nuevo espectro. Además, se redefinen los límites superior e inferior de la ventana.
SOLUCIÓN MATEMÁTICA DE LA ECUACIÓN DE CALIBRACIÓN		
	Tipos de Calibración	Este VI permite seleccionar el tipo de calibración que se va a usar para pasar un espectro de la escala de tiempo a la escala de masa.
	Archivo	Este VI lee el contenido correspondiente a calibraciones de otras sesiones y almacenadas en el archivo cuyo path es: Macintosh HD:LabVIEW 3:examples:instr:calib.txt . La información es ordenada en un arreglo de dos dimensiones y enviada a un subVI para que el usuario pueda elegir que calibración desea usar.
	Calibraciones archivadas	Este VI permite seleccionar las calibraciones que se han ido almacenando en el transcurso de otras sesiones, así como borrarlas si es que ya no son de utilidad. Dando doble click en uno de los ítems se aprecia las características de la calibración escogida.

	Características	Este VI presenta las características bajo las cuales la calibración archivada se almacenó, tales como: nombre clave, nombre del usuario, fecha, coeficientes de calibración y comentario.
	Calibración Básica de un coeficiente	En esta calibración el parámetro de la ecuación se calcula a través de los valores del voltaje de aceleración usado y de las dimensiones geométricas del espectrómetro de masas que son entregadas por el usuario. Aquí no se requiere de haber definido ningún pico previamente. La ecuación de calibración usada es: $t = b * \sqrt{(m/z)}$
	Calibración Básica de dos coeficientes	En esta calibración se utiliza la misma forma y modo de calcular la ecuación de la calibración básica,con la adición de un término constante, para cuya determinación se requiere que se haya introducido por lo menos un calibrante. La ecuación de calibración usada es: $t = a + b * \sqrt{(m/z)}$
	Calibración de dos puntos (2 o más calibrantes)	La ecuación de calibración usada es: $t = a + b * \sqrt{(m/z)}$ Ambos coeficientes se determinan a partir de dos o más picos conocidos. Este método utiliza una regresión lineal para determinar la calibración.
	Calibración de tres puntos (3 o más calibrantes)	La ecuación de calibración usada es: $t = a + b * \sqrt{(m/z)} + c\ (m/z)$ Los coeficientes se determinan a partir de tres o más picos conocidos. Este método utiliza una regresión no lineal (regresión polinomial) para determinar la calibración.
	Calibración de tres puntos (3 o menos calibrantes)	Esta calibración aprovecha las características de los espectros de masas MALDI en los que se encuentran generalmente picos correspondientes a la misma substancia pero con diferente estado de carga. La identificación de estos picos para una sustancia problema permite utilizar un algoritmo que explote esta información. La ecuación de calibración usada es: $t = a + b * \sqrt{(m/z)} + c * (m/z)$.
	Carga	Este VI permite ingresar el valor de la carga del pico que forma parte de la serie de la sustancia multicargada.
	Masa base	Este VI permite ingresar el valor de la masa tomada como referencia de la serie de la sustancia multicargada, cuando se utiliza la calibración de tres puntos de 3 o menos calibrantes.
	Cálculo menor mse	Este VI permite calcular los coeficientes de calibración con el menor m.s.e. al realizar la regresión, en base al valor de la masa obtenida por algún otro método de calibración, la cual es considerada como masa base y variando en pasos de dm (masa base/1000).
	Relación entre m y z	Este VI calcula la relación entre la masa y la carga del calibrante seleccionado.
	Guardar Calibración	Este VI almacena en el archivo "Macintosh HD:LabVIEW 3:examples:instr:calib.txt" toda la información pertinente a la calibración que se está usando en el momento de llamar este VI, tal como: nombre clave, nombre del usuario, fecha, coeficientes de calibración y comentario. El path sólo se lo puede cambiar internamente, y si se realiza

		el cambio, este también deberá efectuarse en el path del VI: Archivo.
	Borrar fila arreglo de string 2-D	Este VI permite borrar una fila de un arreglo de strings de dos dimensiones.
CONVERSIÓN DE ESCALA		
	Cálculo punto inicial	Este VI permite calcular el punto a partir del cual se va a pasar de la escala de tiempo a la escala de masa, esto debido a que se generan valores negativos de masa para los puntos que se encuentran antes del trigger y aquellos que también son negativos debido a la regresión que se aplica.
	Escala tiempo -> Escala masa	Este VI permite pasar de la escala de tiempo a la escala de masa en base a los coeficientes de calibración.
	to..t5 → mo..m5	Este VI permite convertir hasta seis valores de tiempo a valores de masa en función de los coeficientes de calibración.
	to → mo	Este VI transforma el valor de tiempo al valor de masa en base de los coeficientes de calibración, usando el algoritmo de Newton, y con una tolerancia de 1e-7.
	Autoescala	Este VI es utilizado para determinar los valores mínimo y máximo de una región definida del espectro en una de las ventanas (cuando se trabaja en la escala de masa) y poder autoescalarlo con respecto a dichos valores.
	mo..m5 → to..t5	Este VI permite convertir hasta seis valores de masa a valores de tiempo en función de los coeficientes de calibración.

ADMINISTRACIÓN DE LA INFORMACIÓN DE LOS ESPECTROS

ALMACENAMIENTO		
	Guardar Todo	Este VI crea un archivo en el cual se guardarán el o los gráficos seleccionados del listbox, con sus respectivos picos y regiones definidas si así se deseará. También se archivarán los datos del usuario (nombre, fecha y hora), la configuración del osciloscopio durante la adquisición, el número de espectros adquiridos, los coeficientes de calibración y el comentario respectivo.

	Guardar Parte	Este VI crea un archivo en el cual se salvará el gráfico indicado, con sus respectivos picos y regiones definidas si así se deseará. También se archivarán los datos del usuario (nombre, fecha y hora), la configuración del osciloscopio durante la adquisición, el número de espectros adquiridos, los coeficientes de calibración y el comentario respectivo.
	Write Characters To File mio	Escribe una cadena de texto en un nuevo archivo o la anexa a un archivo existente. Este VI abre o crea los archivos de antemano y los cierra después. Este VI es similar al VI Write Characters To File propio de Labview con la variación de que en lugar de usar el subVI Open/Create/Replace File utiliza el subVI Open/Create/Replace File mio y se conecta como pattern el texto: *.msr . Esta variación permitirá que cuando se cree un nuevo archivo, en la caja de diálogo se presenten sólo los archivos de extensión msr y que cuando se lo grabe se anexe al nombre la misma extensión.
	Open/Create/Replace File mío	Abre, crea, o reemplaza un archivo existente, programáticamente o interactivamente usando una caja de diálogo. Este VI es similar al Open/Create/Replace File.vi propio de LabView con la variación de que cuando se crea el archivo se agrega la extensión msr.
	Array cluster → String	Este VI convierte un arreglo de clústers formado por 6 elementos numéricos y un elemento string, en una sola cadena de texto, separados por un tabulador entre los elementos numéricos y por el símbolo % entre estos últimos y el elemento de texto. Además para la separación de los clústers se usan los símbolos ;; .Los valores numéricos se convierten en formato exponencial con 6 decimales
LECTURA		
	Aux Lectura de datos	Este VI lee un archivo cuya extensión sea msr (extensión propia de los archivos del programa Aldebarán). Se requiere que el usuario localice el archivo dentro de un directorio específico.
	Lectura de datos	Este VI muestra en pantalla las principales características del archivo indicado en el path y bajo las cuales se realizó la adquisición de los espectros, tales como: los datos del usuario (nombre, fecha y hora), configuración del osciloscopio y coeficientes de calibración durante la adquisición, así como el comentario que se introdujo en el momento de salvar.
	Array → Waveform Graph	Este VI convierte un arreglo numérico en un clúster de tres elementos: donde los dos primeros elementos del arreglo inicial pasan a ser a los valores de to y dt, y el resto del arreglo corresponde a los valores de Y (voltaje). El objetivo es darle al arreglo inicial el formato de un "waveform graph".
	String → Array cluster	Este VI convierte una cadena de texto en un arreglo de clústers cada uno formado por: 6 elementos numéricos y un elemento de texto (opuesto al VI Array cluster → String). Los elementos numéricos se encuentran separados entre sí por un tabulador y por el símbolo de % entre estos últimos y el elemento de texto. Además la separación entre los clústers esta dada por los símbolos ;; .

	Extractor de strings	Este VI encuentra todas las cadenas de texto que se encuentran en el "string" seguidas por una coma y las coloca dentro de un arreglo.
	Separador e Identificador	Este VI sirve para colocar cadenas de texto que servirán como separadores e identificadores entre la información de los gráficos, del número de espectros y de los picos (regiones) definidas para cada canal, al momento de salvar y leer archivos, respectivamente.
REPORTES		
	Imprimir Todo	Desde este VI se selecciona el o los gráficos que se desean imprimir, con sus respectivos picos y/o regiones definidos previamente. Se determina el modo de la escala horizontal de los espectros: tiempo y/o masa. Y se determina el modo de agrupamiento de los gráficos: BAJO : 1ra hoja.- Espectro total + 2 gráficos 2da hoja en adelante.- 3 gráficos ALTO : 1ra hoja.- Espectro total + 4 gráficos 2da hoja en adelante.- 6 gráficos
	Imprimir Parte	Desde este VI se selecciona los picos y/o regiones que se desean imprimir del gráfico con el que se está trabajando en el momento de llamar este subVI. Se determina el modo de la escala horizontal de los espectros: tiempo y/o masa. Y se determina el modo de agrupamiento de los gráficos: BAJO : 1ra hoja.- Espectro total + 2 gráficos 2da hoja en adelante.- 3 gráficos ALTO : 1ra hoja.- Espectro total + 4 gráficos 2da hoja en adelante.- 6 gráficos
	Print Principal + 2 Plots	Este VI tiene la capacidad de imprimir el espectro completo y dos picos o regiones previamente determinadas, ya sea en tiempo o masa. Adicionalmente se anexa la siguiente información: el nombre del usuario, la fecha y la hora durante la adquisición y en el momento de la impresión, los parámetros del osciloscopio, los coeficientes de calibración, el path en el que se grabó la sesión, el número de página y el número de espectros adquiridos.
	Print 3 Plots	Este VI tiene la capacidad de imprimir tres picos o regiones previamente determinadas, ya sea en tiempo o masa. Adicionalmente se anexa la siguiente información: el nombre del usuario, la fecha y la hora durante la adquisición y en el momento de la impresión, los parámetros del osciloscopio, los coeficientes de calibración, el path en el que se grabó la sesión, el número de página y el número de espectros adquiridos.
	Print Principal + 4 Plots	Este VI tiene la capacidad de imprimir el espectro completo y cuatro picos o regiones previamente determinadas, ya sea en tiempo o masa. Adicionalmente se anexa la siguiente información: el nombre del usuario, la fecha y la hora durante la adquisición y en el momento de la impresión, los parámetros del osciloscopio, los coeficientes de calibración, el path en el que se grabó la sesión, el número de página y el número de espectros adquiridos.

	Print 6 Plots	Este VI tiene la capacidad de imprimir seis picos o regiones previamente determinadas, ya sea en tiempo o masa. Adicionalmente se anexa la siguiente información: el nombre del usuario, la fecha y la hora durante la adquisición y en el momento de la impresión, los parámetros del osciloscopio, los coeficientes de calibración, el path en el que se grabó la sesión, el número de página y el número de espectros adquiridos.
	Aux Imprimir	Este VI configura las características del gráfico a imprimir dependiendo si se trata de un pico o de una región, así como también si la escala es de tiempo o de masa.
	Sub Imprimir	Este VI direcciona el formato de la impresión y establece el número de páginas que se realizarán.
	Selección	Desde este VI se realiza la selección de los picos y/o regiones que se desean imprimir.

MISCELÁNEOS

ICONO	NOMBRE DEL VI	DESCRIPCIÓN
	Carátula	Carátula.
	Registro	Este VI es usado como registro de información del usuario, a la vez que limita su acceso a personas no autorizadas.
	Item	Este VI permite direccionar cual es la operación que el usuario desea realizar y en que ventana se la va a efectuar.
	Adquisición	Este VI es el principal ya que desde aquí se establece el modo de trabajo, la fuente de la onda a ser leída, el modo de suma, la configuración del osciloscopio.
	Masa	Este VI permite magnificar una área especificada del espectro en la escala de masa. Además se pueden definir, salvar y leer picos y regiones. Manejar la información ya sea para almacenarla o para generar reportes.
	Tiempo	Este VI permite magnificar una área especificada del espectro en la escala de tiempo. Además se pueden definir, salvar y leer picos y regiones. Realizar calibraciones y almacenarlas. Manejar la información ya sea para almacenarla o para generar reportes.

ANEXO B

EL MEAN SQUARED ERROR (M.S.E.)

Es una medida relativa de los valores residuales entre los valores de la curva esperada y los valores realmente observados, su valor se obtiene usando la fórmula:

$$MSE = \frac{1}{n}\sum_{i=0}^{n-1}(f_i - y_i)^2$$

donde

f_i	i-ésimo valor de la secuencia que representa los valores ajustados
y_i	i-ésimo valor de la secuencia que representa los valores observados
n	es el número de puntos observados

El valor ideal de MSE es cero.

EL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN

Es una medida de la "dependencia" existente entre las dos variables que intervienen en una distribución bidimensional, su valor se determina por medio de la fórmula:

$$r = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sum(x-\bar{x})^2\sum(y-\bar{y})^2}$$

donde

$\bar{x}$	es el valor medio de la secuencia de los valores de x
$\bar{y}$	es el valor medio de la secuencia de los valores de y

El coeficiente de correlación toma valores entre: $-1 \leq r \leq 1$, en donde un valor de cero, $r = 0$, implica que no existe ninguna relación entre las dos variables, y a medida que r se aproxima a la unidad, sea positiva o negativa, las dos variables están más correlacionadas.

ANEXO C

MÉTODO ITERATIVO DE PUNTO FIJO DE PRIMER ORDEN

Se trata de determinar la solución de una ecuación de la forma:

$$g(x) = x$$

El proceso iterativo consiste en ir evaluando x varias veces hasta tener una buen aproximación a la raíz, basándose en la ecuación $g(x) = x$. Así:

- Valor inicial: x_0

- Aproximaciones:
  $x_1 = g(x_0)$
  $x_2 = g(x_1)$
  $x_3 = g(x_2)$
  .
  .
  .
  $x_i = g(x_{i-1})$

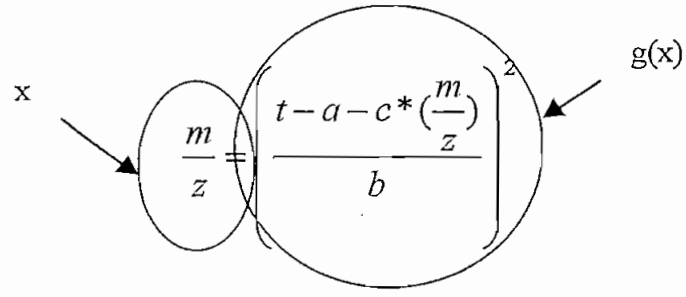
  donde i = 1, 2, ... hasta que se cumpla con la condición de tolerancia

- Condición de tolerancia:

$$|x_i - x_{i-1}| < Ea$$

  donde Ea es el error absoluto.

Para este caso la ecuación utilizada es:



y el valor de Ea = 1E-7.

El valor inicial usado para el cálculo de la primera raíz es $x_0 = 1$.