

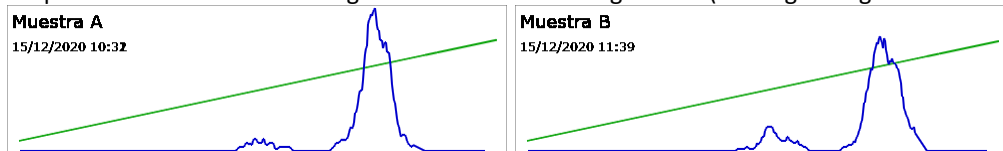
Utilización de programa para el análisis de picos (*ImageJ*)

(Las instrucciones para instalar *ImageJ* están en la página siguiente)

Uso de *ImageJ* para analizar los resultados de un cromatograma

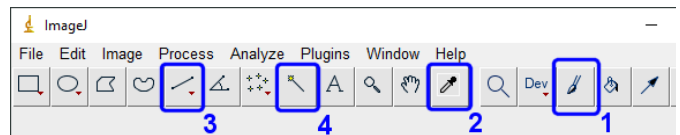
Puedes ver un vídeo que reproduce este proceso en <http://biomodel.uah.es/lab/cromat/glucHb/video.htm>

1. Abre el programa *ImageJ*.
2. Prepara un archivo de imagen con tus cromatogramas (se sugiere grabarlo en formato PNG) Ejemplo:

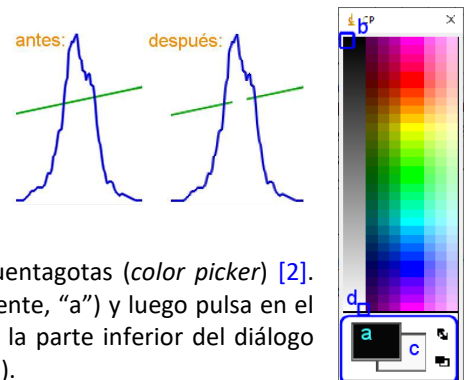


3. Desde *ImageJ*, abre el archivo descargado: **File > Open**

4. Si el cromatograma está cruzado por una línea que queremos ignorar (por ej., la línea verde que representa el gradiente de pH usado para la elución), necesitamos borrar una parte para que no sirva de delimitador de áreas. Un posible modo de hacer esto es el siguiente:



- En la barra de herramientas, localiza la herramienta de pincel (*paintbrush*) [1]. Haz doble clic sobre ella y, en el diálogo que aparece, selecciona **Color > White**. Acepta (OK)
- Con el ratón, pinta a través de la línea que quieres borrar (no es necesario borrarla por completo, basta con una brecha para que se conecten las áreas de ambos lados)

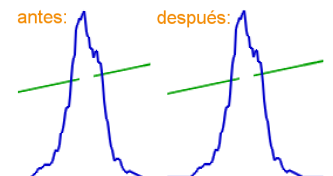


5. Para recuperar el color negro como color de dibujo:

- En la barra de herramientas, haz doble clic sobre la herramienta de cuentagotas (*color picker*) [2]. Pulsa en el primer rectángulo de la parte inferior del diálogo (color de frente, "a") y luego pulsa en el negro (zona superior izquierda, "b"). Pulsa en el segundo rectángulo de la parte inferior del diálogo (color de fondo, "c") y luego pulsa en el blanco (zona inferior derecha, "d").

6. Ahora hay que delimitar cada pico trazando líneas que lo cierren.

- Selecciona la herramienta de líneas [3] y traza líneas de base que conecten el comienzo y el final de cada pico. Cada vez que dibujes una línea,
- en el menú, **Edit > Draw** para fijarla.
- Si quedase algún hueco, se puede cerrar con líneas adicionales en vertical o diagonal.
- Repite para todos los picos.



7. Para medir las áreas:

- Selecciona en la barra de herramientas la varita mágica [4].
- Pulsa con el ratón dentro de uno de los picos, según las zonas previamente delimitadas con las líneas que has trazado.
- En el menú, pulsa en **Analyze > Measure**. Aparecerá una nueva ventana con una tabla en la que se irán anotando las áreas medidas (en píxeles al cuadrado).
- Repite el proceso con cada pico: (1) pulsar con la varita, (2) **Analyze**, (3) **Measure**
- Completadas las medidas, en la ventana de resultados elige **Edit > Copy**. Ve a tu cuaderno de laboratorio u hoja de cálculo y pega los resultados. No olvides anotar a qué muestra y pico corresponde cada valor. (Los valores *Mean*, *Min*, *Max* puedes ignorarlos, pues corresponden a la intensidad de color de la región marcada y en este caso no tienen significado)

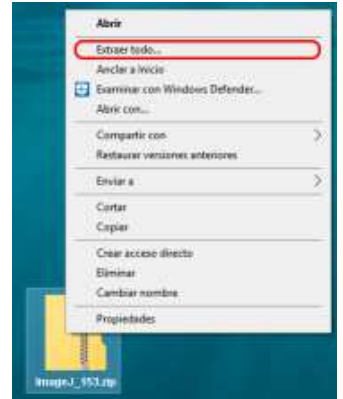
8. Calcula el porcentaje que supone el área de cada pico con respecto a la suma de todas las áreas que forman cada cromatograma.

Instalación de ImageJ

Puedes ver un vídeo que reproduce este proceso en <http://biomodel.uah.es/lab/acetato/video.htm>

Este programa es gratuito, de código abierto y en el dominio público. Puede instalarse en Windows, MacOS o Linux. Aunque necesita Java para funcionar, si no tienes ya instalado Java puedes descargar un paquete de *ImageJ* con Java ya incluido:

- Ve a <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> para conseguir **ImageJ**. Es recomendable elegir la versión que lleva integrado Java, marcada **ImageJ bundled with Java**, que es un paquete en archivo zip.
- **Extrae todos** los archivos contenidos en el archivo zip a una carpeta en la ubicación que prefieras. Luego saca un **acceso directo** (por ej., al escritorio) del archivo del programa (por ej., en Windows es ImageJ.exe)
- **ImageJ** usa varias ventanas pequeñas, no se puede maximizar.
- Si al abrir el programa no ves correctamente los menús o botones, prueba a cambiar la configuración así:
 - Menú Edit > Options > Appearance > GUI scale (afecta a la barra de botones)
 - Menú Edit > Options > Appearance > Menu font size (afecta a los submenús desplegados)



Instalación en MacOS

Si la primera vez que ejecutas ImageJ se muestra un mensaje "*ImageJ no se puede abrir porque el desarrollador no puede verificarse*", haz clic derecho en ImageJ.app y selecciona **Abrir** en el menú desplegable.

Si usas MacOS 10.12 (Sierra) o posterior, ve al menú **Imagen > Mostrar información**. Si la ruta ImageJ home comienza con `"/ privado"` y en el menú **Complementos** no se ve ninguno instalado, arrastra ImageJ.app a otra carpeta para que funcione correctamente.

(Fuente: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/install/osx.html>)

Preparación del archivo de resultados de la electroforesis

Necesitas un archivo de imagen (obtenido escaneando la tira de acetato o quizá fotografiándola). Es importante que la imagen de la tira esté perfectamente horizontal, no inclinada.

Los formatos de archivo recomendados son JPEG, PNG y TIFF. También son compatibles con **ImageJ** GIF, DICOM, BMP, PGM y FITS.