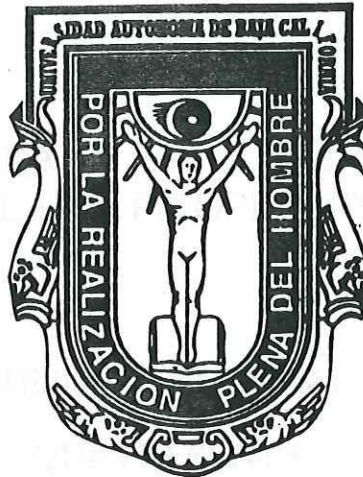


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**FLUOROMETRO PARA EL ESTUDIO DE FLUORESCENCIA
DE CLOROFILA EN FITOPLACTON MARINO**

Tesis Profesional

Que para obtener el titulo de:

FÍSICO

Presenta:

MIGUEL ANGEL GARCÍA GARCÍA

Ensenada, B.C. Enero, 2000.

DEDICATORIA

A mi mamá, María de Los Angeles García González por su amor y apoyo incondicional que me brinda en cada momento de mi vida.

A mis abuelos Nicolás García M. Y María González M. Quienes desde siempre me han ayudado.

Al Sol y la Luna.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Enrique Mitrani Abenchuchan por su paciencia y apoyo.

A mi sinodal Dr. Helmut Maske Rubach por las aportaciones, asesorías y sugerencias en la realización de mi tesis.

A mi sinodal M.C. Alberto Leopoldo Morán Y Solares por su buena disposición y colaboración en mi tesis.

A la Facultad de Ciencias, y a todos mis maestros por haberme permitido desarrollarme como estudiante.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, en especial al Departamento de Electrónica y Telecomunicaciones, Ing. Ramón Muraoka, Rene Torres, y al técnico Isaac Fimbres, Guadalupe Pacheco, por su disposición y asesoramiento en la realización de mi tesis.

A mis hermanos Giovanna García G. Y Leobardo García G. por su apoyo y respeto.

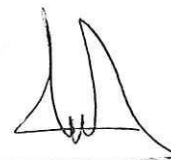
A mis amigos y compañeros físicos Julio C. López, Eri Mena, Adriana Arroyo, Roberto Guerrero, Joel Antunez, por su amistad, a través de mi carrera universitaria.

A mis hermanos scouts, Julio Alonso Soto, Zarina Medina R., Alejandro Méndez, Rogelio Cano, Francisco Guillen.

Resumen de la tesis de Miguel Angel García García como requisito parcial para la obtención de la licenciatura en FISICA. Ensenada, Baja California. México. Enero 2000.

Fluorómetro para el estudio de fluorescencia
de clorofila en fitoplacton marino

Resumen aprobado



Dr. Enrique Mitrani A.

El presente trabajo consiste en el diseño y desarrollo de un fluorómetro con excitación modulada y alta resolución temporal para el estudio de fluorescencia de clorofila en fitoplacton marino. Su fuente de iluminación está constituida por diodos emisores de luz azul alimentados por fuentes de corriente.

La captura de datos se realiza a través de una tarjeta de adquisición programable de alta velocidad (1Mhz), y la conmutación de sus fuentes de iluminación es controlada por un microcontrolador 8031.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Capítulo 1 La fluorescencia de la clorofila. | 3 |
| 1.1 Estudio de la fotosíntesis por fluorescencia | 3 |
| 1.2 La fluorescencia y el estudio de la fotosíntesis en fitoplacton marino. | 10 |
| 1.3 Técnicas de medición de fluorescencia para caracterización de la fotosíntesis. | 14 |
| Capítulo 2 Descripción del fluorómetro propuesto. | 16 |
| 2.1 Sistema de encendido. | 17 |
| 2.1.1 El sistema de alimentación de los DEL. | 19 |
| 2.1.2 Interruptores de encendido. | 20 |
| 2.1.3 El microcontrolador 8051. | 22 |
| 2.1.4 Arreglo lógico. | 24 |
| 2.2 Sistema de Seguridad. | 24 |
| 2.2.1 El amplificador integrador. | 25 |
| 2.2.2 El comparador con histéresis. | 26 |
| 2.3 Sistema de adquisición. | 29 |
| 2.3.1 El fotomultiplicador. | 30 |
| 2.3.2 El amplificador de transimpedancia. | 30 |
| 2.3.3 Tarjeta "Flash12". | 31 |
| Capítulo 3 Programación. | 33 |

| | | |
|-------------------------|---|----|
| 3.1 | Programación del microcontrolador. | 33 |
| 3.2 | Programación de la tarjeta “Flash12”. | 35 |
| Capítulo 4 Resultados | | 37 |
| Capítulo 5 Conclusiones | | 48 |
| Bibliografía | | 50 |
| Apéndice A | Secuencia de encendido. | 52 |
| Apéndice B | Mapas de Karnaugh. | 54 |
| Apéndice C | Disquete con los programas de control. | |
| | C.1 Programa de control de la computadora personal. | |
| | C.2 Programa de control del microcontrolador 8031. | |

| | |
|---|----|
| Figuras | |
| Figura 2.1.- Diagrama en bloques del fluorómetro propuesto. | 17 |
| Figura 2.2.- Sistema de encendido. | 18 |
| Figura 2.3.- Fuente de alimentación. | 19 |
| Figura 2.4.- Interruptores de encendido. | 21 |
| Figura 2.5.- Señal de encendido. | 23 |
| Figura 2.6.- El amplificador integrador. | 25 |
| Figura 2.7.- Con V_{ent} constante se obtiene un rampa lineal. | 26 |
| Figura 2.8.- Histéresis del comparador. | 27 |
| Figura 2.9.- Comparador con histéresis. | 28 |
| Figura 2.10.- Onda triangular. | 29 |
| Figura 2.11.- Amplificador de transimpedancia. | 31 |
| Figura 3.1 .- Variables modificables desde la PC, Retardo 2 y Amplitud. | 34 |
| Figura 4.1.- Espectro DEL azul a través de un filtro rojo. | 37 |
| Figura 4.2.- Dos diferentes pruebas. | 38 |
| Figura 4.3.- Detección de luz roja en el diodo. | 38 |
| Figura 4.4- Caso a y c figura 4.5. | 40 |
| Figura 4.5 Experimento que apoya las hipótesis b y c descritas anteriormente. | 41 |
| Figura 4.6.- Reducción de luz indeseable. | 42 |
| Figura 4.7.- Ruido debido a la tarjeta defectuosa. | 42 |
| Figura 4.8.- Periodo de muestreo 5 μ s. | 43 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.9.- Resolución de la tarjeta de adquisición a $1 \mu\text{s}$. | 43 |
| Figura 4.10.- Ruido causado por el amplificador de transimpedancia | 44 |
| Figura 4.11.- Oscilaciones de L1 figura 2.4 | 45 |
| Figura 4.12.- Nueva configuración en la bobina inductora | 45 |
| Figura 4.13 .- Nuevos valores de L1, R4 y C1 figura 4.12. | 46 |
| Figura A.1.- Mapa de Karnaugh del interruptor A_i y B. | 53 |
| Figura A.2.- Ciclo de encendido. | 53 |
| Figura A.3.- Señal A_i. | 54 |
| Figura A.4.- Señal B. | 55 |
| Figura A.5.- Señal Xe. | 55 |

Tablas

Tabla I.- Características del fotomultiplicador Hamamatsu H5783. 30

Tabla II.- Diferentes experimentos que apoyan la hipótesis c. 39

Introducción

Los tejidos fotosintéticos oxigénicos de las plantas emiten fluorescencia roja cuando son expuestos a luz visible o UV-A. La fluorescencia emitida es variable y depende de las condiciones fisiológicas del aparato fotosintético. La fluorescencia nos permite estudiar la respuesta del aparato fotosintético a factores ambientales como luz UV o limitación de nutrientes, calcular la sección transversal de absorción de las antenas pigmento-asociado con el fotosistema 2 (PS2), o la determinación del tiempo máximo de retorno del electrón Q (Kolber & Falkowski, 1993).

Los tejidos absorben la luz a través de las moléculas de clorofila, y cuando éstas absorben un quantum (fotón o excitón) entran a un estado excitado, subiendo los electrones de su capa periférica a un nivel más elevado con 'spin' no paralelo. Los electrones retornan a su estado base liberando energía por diferentes vías: calor, fluorescencia o en el caso de fotosíntesis por medio de la separación de cargas eléctricas. Como la desexcitación es directa sin cambio de spin (' intersystem crossing') los tiempos involucrados en la fluorescencia son relativamente cortos (alrededor de 10^{-8} S.), en relación a la foto-fosforescencia donde los

electrones excitados pasan por un estado intermedio.

Para medir la fluorescencia se necesita una fuente de luz que produzca una irradiancia de excitación a las longitudes de onda donde absorbe la molécula fluorescente. También se necesita un detector de fotones que mida en las longitudes de onda de la emisión de la fluorescencia. La excitación puede ser una fuente de luz constante o se puede modular la luz para obtener información sobre la respuesta dinámica del sistema fotosintético.

El presente trabajo consiste en el diseño y construcción de un fluorómetro de alta resolución temporal ($<1 \mu\text{s.}$) en la adquisición de datos y en la conmutación de sus fuentes de iluminación constituidas por diodos emisores de luz azul.

Capítulo 1 La fluorescencia de la clorofila.

1.1 Estudio de la fotosíntesis por fluorescencia.

La fotosíntesis oxigénica es el proceso por el cual las plantas sintetizan compuestos orgánicos a partir de dióxido de carbono en presencia de la luz. La gran mayoría de la materia orgánica en la tierra está derivada de la fotosíntesis oxigénica. El proceso de fotosíntesis se puede separar en dos partes: A) La reacción luminosa que incluye la separación de moléculas de agua hasta la formación de gradientes de protones y la reducción de ciertas moléculas que sirven como potencial reductora en diferentes procesos de biosíntesis. B) La reacción térmica u oscura donde el potencial de energía que representa el gradiente de protones y el potencial reductora son utilizados para la síntesis de moléculas orgánicas (cabe mencionar aquí que todo el material de este capítulo se encuentra ampliamente desarrollado en las siguientes referencias: Kolber & Falkowski, 1997; Hall & Rao, 1994; Falkowski & Raven, 1997; Kooten & Snel, 1990; Bolhár & Öquist, 1993).

El aparato fotosintético en todos los organismos fotosintéticos tiene una estructura funcional típica: los fotones son absorbidos por pigmentos colocados en complejos proteicos altamente estructurados llamados antenas.

Los pigmentos en estas antenas son clorofilas o carotinoides. Una de las funciones de los pigmentos es capturar fotones para la reacción luminosa de la fotosíntesis, otros pigmentos sirven como sumidero de la energía. Los fotones absorbidos representan paquetes con un potencial de energía definida. Una vez absorbidos, estos paquetes de energía son llamados excitones. Los excitones dentro de una antena brincan de un pigmento a otro pigmento por un mecanismo llamado resonancia de Foerster, que es suficientemente rápido para asegurar una muy alta eficiencia de transferencia (>90 %). Eventualmente los excitones son capturados por una molécula de clorofila "a" en los centros de reacción 1 ó 2. En el centro de reacción 2 es donde la energía de excitones puede provocar la separación de cargas, i.e. la energía en forma de moléculas excitadas con elevados orbitales de electrones es transformada en una reacción ionizante donde las moléculas de agua son separadas en oxígeno, electrón y protón. La reacción ionizante termina con la separación local de cargas donde el electrón está

ligado con el primer aceptor de electrones, Q. Es importante notar que cada separación de cargas es el resultado de un fotón absorbido que, inicialmente transformado en un excitón, actúa sobre el centro de reacción del fotosistema 2 PSII.

Los complejos proteicos de pigmentos llamados antenas son colocados en las membranas tilacoides que forman vesículas cerradas dentro de la célula (en procariotes) o dentro de los cloroplastos (en eucariotes). Típicamente cada centro de reacción está asociado con aproximadamente 300 moléculas de clorofila "a" y la misma cantidad de xantofilas. En una membrana tilacoide existen típicamente más de un tipo de antena con características químicas y espectrales distintas. Diferentes grupos de algas tienen diferentes tipos de antenas. La asociación entre antena y centro de reacción es solamente estadística y no se conserva espacialmente, ya que las tilacoides son membranas de lípidos suficientemente fluidas para permitir movimientos espaciales de los complejos pigmentos/proteínas y otros complejos de proteínas relacionadas. El movimiento espacial de las antenas pigmentos cambian la probabilidad de la transferencia del excitón y de esta manera de dirigir más o menos energía a un centro de reacción.

La razón principal de la existencia de antenas se explica por el bajo flujo de fotones de luz natural aunada a la pequeña sección transversal efectiva de absorción de los centros de reacción. Estadísticamente, a plena luz del día un centro de reacción sólo puede absorber un fotón por segundo, lo que resultaría en una tasa de fotosíntesis muy baja.

Un ejemplo numérico explica la relación entre la irradiancia natural y la tasa de absorción:

Clorofila "a": peso molecular, $PM = 600 \text{ mg moléculas mol}^{-1}$.

absorción específica a 440nm (azul), $a^* = 0.015 \text{ m}^2 \text{ mg}^{-1}$

concentración de clorofila, $C = 1 \text{ mg m}^{-3}$

Número de Avogadro = $6 \cdot 10^{23} \text{ moléculas mol}^{-1}$

Sección transversal molecular de clorofila: $a_{\text{mol}} = PM a^* / Av = 1.5 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ molécula}^{-1}$

Irradiancia: $E = 2 \cdot 10^{20} \text{ fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

Fotones absorbidos por molécula de clorofila = $a_{\text{mol}} E = 3 \text{ fotones molécula}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Los fotones adicionales absorbidos por antenas aumentan el flujo de

energía hacia el centro de reacción, incrementando así las tasas de fotosíntesis. Obviamente, es una ventaja que los organismos sean capaces de controlar la sección transversal efectiva de las antenas-pigmento o la eficiencia de transferencia de energía de la antena al centro de reacción. De esta manera, se mantiene una velocidad óptima de separación de cargas en el centro de reacción.

No toda la energía absorbida por las antenas es utilizada para la fotosíntesis: una parte se pierde por calor y otra se puede perder por fluorescencia. Bajo condiciones fisiológicas en sistemas fotosintéticos funcionales, el único pigmento que fluoresce efectivamente es la clorofila "a" (aquí no se considera el caso de ficobiliproteínas). La probabilidad de que un excitón provoque la emisión de un fotón fluorescente es inversamente proporcional al estado de reducción del primer aceptor de electrones 'Q'.

Este aceptor oxidado manda el electrón a su cadena de transporte. La Q reducida inhibe la separación de cargas en este fotosistema 2, hasta ser nuevamente oxidada. Si el tiempo del estado reducido de Q, i.e. el tiempo de residencia del electrón en Q, es constante, el porcentaje de los Q's reducidos

dependerá del flujo de excitones hacia los fotosistemas. Por lo tanto, el porcentaje de los Q's reducidos estaría relacionado directamente a la tasa de la separación de cargas, o la reacción luminosa de la fotosíntesis

Con el Q reducido, el fotosistema tiene que desexcitar la energía del excitón por otras vías, calor o fluorescencia y por consecuencia la probabilidad de emisión de un fotón de fluorescencia depende del promedio del estado de reducción de Q. Si todos los Q son oxidados a muy baja irradiancia o después de un periodo de oscuridad, existe todavía una baja probabilidad de emisión de fluorescencia F_0 o fluorescencia muerta. Bajo estas condiciones la eficiencia cuántica de fluorescencia es mínima y la eficiencia cuántica de fotosíntesis es a su vez máxima. Con elevada iluminación, si todos los Q's son reducidos, la fluorescencia es máxima (F_m), y la eficiencia cuántica de fotosíntesis es cero. La fluorescencia entre F_0 y F_m es proporcional al estado de reducción de Q, y ésta es la base de la interpretación fisiológica de la fluorescencia.

Cuando el aparato fotosintético recibe luz después de un periodo de oscuridad, deben esperarse eficiencias cuánticas de la emisión de fluorescencia mínimas. Entonces Q es oxidado y así la fotosíntesis puede

proceder a máxima eficiencia y, por lo tanto, la fluorescencia para una irradiancia y muestra dados tendrán el valor mínimo F_0 . Experimentalmente, estas condiciones pueden ser observadas cuando se tiene un nivel de irradiación muy bajo o bajo destellos de luz muy cortos (destello prueba) que proveen así pocos fotones al aparato fotosintético haciendo que el estado de reducción de Q no cambie durante la irradiación. El valor máximo ϕ_f es observado después de que el aparato fotosintético ha recibido muchos fotones. Entonces todos los Q son reducidos y los pigmentos solamente pueden ser desenergetizados mediante producción de calor y la emisión de fluorescencia máxima (F_m). La luz que cambia el estado de reducción de Q se llama luz actínica. En un sistema experimental se puede exponer la muestra a luz actínica durante tiempos cortos si la irradiancia es suficientemente alta.

1.2 La fluorescencia y el estudio de la fotosíntesis en fitoplacton marino.

Las moléculas de la clorofila "a" en diferentes solventes orgánicos fluorescen con una eficiencia cuántica del 20 a 30 %. La eficiencia cuántica depende de la temperatura, sin embargo puede ser considerada como una constante de cada pigmento y solventes dados. En biología oceanográfica la concentración de clorofila "a" es comúnmente cuantificada extrayendo esta clorofila con un solvente orgánico y midiendo la fluorescencia con un fluorómetro calibrado.

La clorofila "a" in vivo, en el aparato fotosintético, tiene una eficiencia cuántica entre 0.5 y 3% y aunque llega a alcanzar un 10% bajo condiciones transitorias. La eficiencia generalmente, depende del estado de la fisiología del organismo.

Esta dependencia representa un problema cuando la fluorescencia in vivo es usada para cuantificar la clorofila "a" sin extracción en muestras de agua usando la clorofila "a" como indicador de la biomasa fitoplanctonica. Se puede reducir la variación de la eficiencia cuántica, i.e. la fluorescencia y la concentración de clorofila "a", por pre-tratamiento de las muestras, por

ejemplo, agregando un herbicida a la muestra. Para la determinación de la biomasa, la variabilidad de la eficiencia cuántica de la fluorescencia in vivo presenta problemas. Sin embargo esta misma variabilidad y su dependencia de la fisiología celular puede ser una ventaja en investigaciones fisiológicas, pues permite usar la fluorescencia in vivo para probar la fisiología de la planta.

Un protocolo simple para medir F_0 y F_m en muestras de fitoplancton implica el almacenamiento de la muestra en la obscuridad por un tiempo $T_{d1} > 1$ min. suficiente para oxidar todos los Q's. Después se aplica un destello prueba con un flujo de fotones E_1 suficientemente bajo o suficientemente corto para evitar la reducción de Q durante el destello, con un periodo T_{e1} . La fluorescencia emitida durante este destello nos da el valor de F_0 . Después de un retardo de duración T_{d2} de aproximadamente $10 \mu s$, es aplicado otro destello actínico con un flujo fotónico E_2 y duración T_{e2} . Por último, después de un retardo ($T_{d3} \sim 10 \mu s$) se aplica otro destello prueba ($E_3 \times T_{e3}$) para obtener F_m . La energía aplicada E_1 y E_3 puede ser aproximadamente igual a $1 \text{ mmoles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y E_2 aprox. igual a $20 \text{ mmoles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

La eficiencia fotosintética potencial es calculada simplemente como $\phi_p = (F_m - F_0) / F_m$. El concepto es confundido con el complejo proceso de aclimatación en el aparato fotosintético. Para cada escala de tiempo, existen uno o más procesos que reordenan el aparato para hacer óptimo el uso del nivel de irradiancia para prevenir daños a altos niveles de irradiación o maximizar la fotosíntesis cuando estos niveles son bajos. Estos procesos, provocan la desexcitación inducida del excitón (ciclo xantofilo), una menor transferencia de los excitones de la antena-pigmento al centro de reacción, cambios en la velocidad de re-oxidación de Q, reordenamiento espacial de pigmentos para reducir la sección transversal de absorción y la degradación química de pigmentos.

Algunos de estos procesos pueden ser controlados parcialmente por un ciclo diurno endógeno. Por razones prácticas el valor ϕ_p calculado anteriormente se aplica a plantas con $T_{dl} \sim 0.5$ horas. Los biólogos también se interesan en el valor de estados ϕ_p bajo estados de aclimatación agudos.

En estos casos, las plantas son adaptadas a la obscuridad apenas el tiempo suficiente para oxidar a Q ($T_{dl} \sim 2$ min.) y entonces se realiza el mismo protocolo calculando $\phi_p' = (F_m' - F_0') / F_m'$. La diferencia entre ϕ_p' y

ϕ_p es una medida de la extinción no-fotoquímica del aparato fotosintético.

El protocolo de experimentación básico anteriormente basado en una secuencia de pulsos prueba-actínico-prueba puede ser modificado para obtener información más detallada:

A) El tiempo de retardo T_{d2} , puede ser variado entre 10 μ s y 100 ms. A mayor T_{d2} , más Q podrán ser oxidados durante el periodo entre el destello prueba y el segundo destello prueba. Así mismo, haciendo que F_m decrezca a partir de la cinética de reoxidación de Q, puede determinarse el tiempo máximo de retorno del electrón Q. Este tiempo máximo está fuertemente relacionado a la razón fotosintética máxima.

B) La irradiancia ($E_2 \times T_{e2}$) del destello actínico en el protocolo anterior es suficiente para reducir Q completamente y, por lo tanto, maximizar F_m . Cuando T_{e2} se mantiene constante y se reduce el flujo fotónico E_2 , F_m disminuye pues Q no ha sido reducido completamente. La relación entre $E_2 \times T_{e2}$ y F_m puede ser descrita por la teoría de blancos y es posible calcular la sección transversal de absorción de las antenas pigmento asociadas con el fotosistema 2 (PS2).

C) La muestra puede ser pretratada antes de la secuencia básica destello--actínico--destello, midiendo así la respuesta del aparato fotosintético a factores ambientales como luz UV o limitación de nutrientes.

1.3 Técnicas de medición de fluorescencia para caracterización de la fotosíntesis.

En general hay dos tipos de fluorómetros disponibles en el mercado: de resolución temporal y de amplitud modulada. El primero sólo graba la fluorescencia inducida, midiendo F_0 y F_m con el protocolo de experimentación básico Pulso prueba—Pulso actínico—Pulso prueba. La capacidad de éstos fluorómetros para calcular la eficiencia depende de la precisión para calcular F_0 , lo cual constituye siempre una fuente potencial de error, un segundo problema puede ser una fuente de iluminación insuficiente para reducir todos los Q al obtener F_m .

El segundo tipo de fluorómetro permite la medición de fluorescencia continua de un tejido fotosintético expuesto a la luz de cualquier longitud de onda. esto es logrado usando una fuente débil de luz modulada en conjunto con un sistema fluorescente, el cual monitorea solamente la fluorescencia

emitida a la frecuencia y fase de la luz modulada. Para obtener la fluorescencia inducida es necesario una segunda fuente de luz y para reducir completamente todos los Q se requiere una tercera fuente.

Capítulo 2 Descripción del fluorómetro.

Como la fluorescencia en la molécula de clorofila es producida en periodos muy cortos, se requiere que el fluorómetro por desarrollar tenga una alta resolución temporal ($<1\mu\text{s}$).

PS2 tiene una fluorescencia significativa a 682 nm. Por esta razón el sistema de adquisición debe contar con filtros que sólo permitan el paso de luz alrededor de esta longitud de onda. Por otra parte, también es necesario que la fuente de iluminación emita en el espectro máximo de absorción de la clorofila "a", que es alrededor de 440 nm.

Para el cálculo y análisis de los resultados obtenidos la fuente de iluminación debe tener unidades de iluminación cuantificables en duración y amplitud, así como altas velocidades de conmutación.

El fluorómetro propuesto se desarrolló en base a las características y límites de la tarjeta de adquisición. Está dividido en 3 sistemas y un programa principal que se encarga del control de los sistemas de adquisición y encendido. En la figura 2.1 podemos observar su diagrama de bloques.

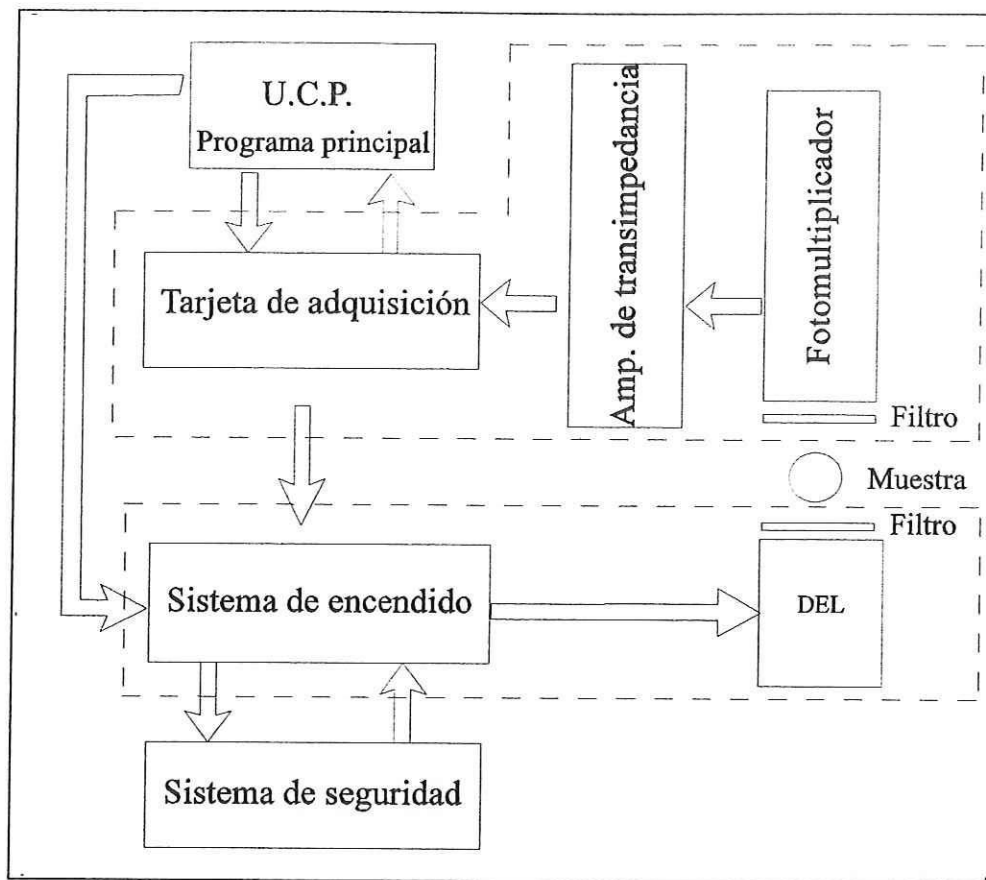


Figura 2.1.- Diagrama en bloques del fluorómetro propuesto.

2.1 Sistema de encendido.

El sistema de encendido está compuesto por un microcontrolador, un arreglo lógico (GAL22V10) (fig. 2.2), las fuentes de iluminación, las fuentes de corriente que alimentan los DEL (Diodo Emisor de Luz), una bobina inductora necesaria para mantener una corriente constante, y un par de

transistores necesarios para precargar el sistema antes de encender los DEL (fig. 2.4 cap. 2.1.2).

Los dos interruptores de corriente en el sistema permiten a la bobina inductora precargar y encender la fuente de iluminación (figura 2.4). A su vez, estos interruptores están controlados por un microcontrolador y un sistema de seguridad (fig. 2.2).

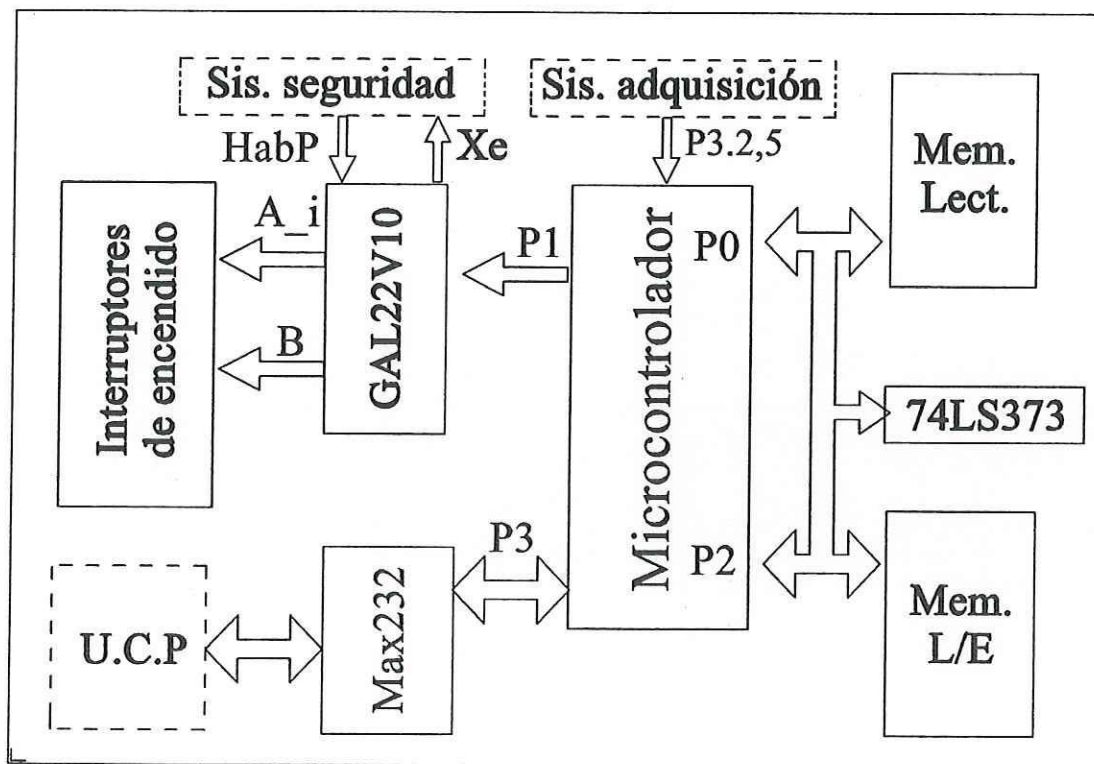


Figura 2.2.- Sistema de encendido.

2.1.1 El sistema de alimentación de los DEL.

Hay dos formas de alimentar las fuentes de iluminación: por medio de una fuente de voltaje y por medio de una fuente de corriente (figura 2.3). La fuente de voltaje tiene una resistencia interna pequeña y el voltaje en la carga es constante; cualquier variación en la resistencia de carga, hará variar la corriente de carga. En una fuente de corriente la resistencia interna es mucho mayor que la de carga. De esta manera, en la ecuación e.1 la corriente de carga no tiene cambios considerables.

$$(e.1) \quad I_L = (V_S / (R_S + R_L))$$

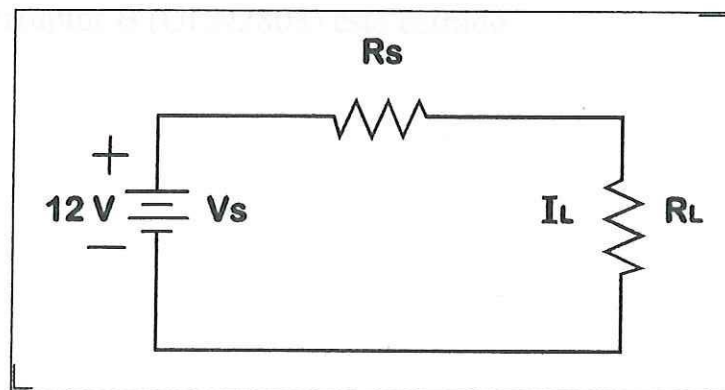


Figura 2.3.- Fuente de alimentación.

Es indispensable que nuestra fuente de iluminación se alimente por una fuente de corriente, ya que los DEL son diodos PN polarizados directamente, y la cantidad de luz emitida depende de la corriente, Cualquier

variación en la corriente produce cambios considerables en su brillantez.

2.1.2 Interruptores de encendido.

El circuito de la figura 2.4 permite una alta velocidad de conmutación de los DEL al mismo tiempo que garantiza la estabilidad de la corriente que los alimenta.

La fuente de corriente (LM317) en conjunto con la bobina L1 hace que al cerrar el interruptor A_i (NPN 327ZTX) se establezca una corriente constante en el punto “a” con una tensión residual inferior a 0.5 volts. En estas condiciones, no circula corriente por los diodos emisores de luz aún cuando el interruptor B (ULN2803) esté cerrado.

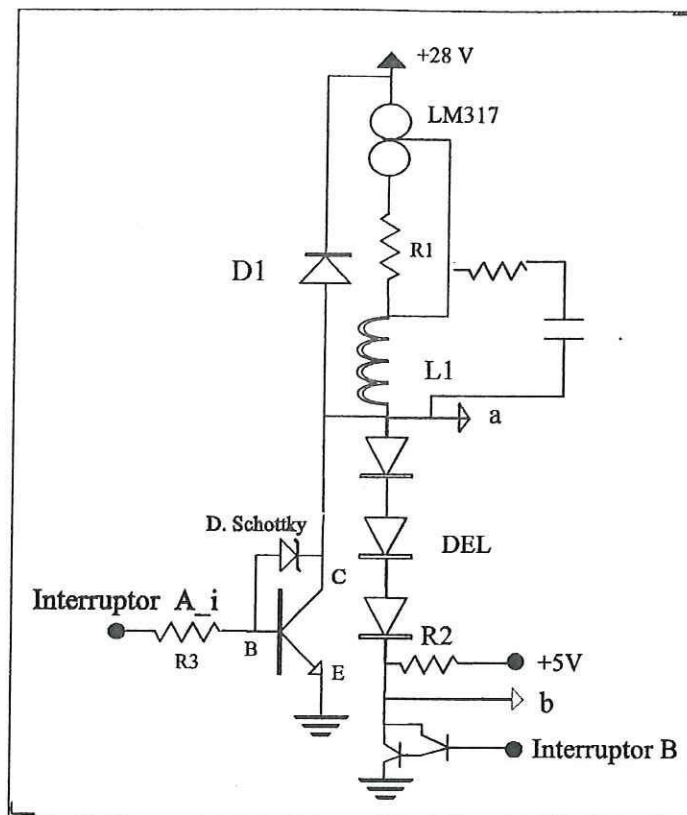


Figura 2.4- Interruptores de encendido

Una vez establecida esta corriente y cerrado el interruptor B, el encendido/apagado de los DEL se logra abriendo/cerrando el interruptor A_i. La resistencia R₂ permite que en los periodos en que los DEL deban estar apagados, el interruptor B se polarice ligeramente positivo y se contrarreste así la tensión residual en el punto “a” que de otra manera, induciría una iluminación mínima de los diodos.

Finalmente, el diodo D1 permite disipar la corriente inducida por L1 cuando se abren los interruptores A_i y B para llevar el circuito a su estado

de reposo. La secuencia de encendido se encuentra en el apéndice A.

2.1.3 El microcontrolador 8031.

El microcontrolador 8031 tiene su propio procesador, 4 puertos paralelos de entrada/salida, de 8 bits cada uno, y un puerto de comunicación serial para poder comunicarse con el mundo exterior. También cuenta con memorias de lectura y escritura (figura 2.2), temporizadores y contadores además de otras funciones (Intel,1987).

Para realizar el fluorómetro fue necesario un microcontrolador que realizara el ciclo de trabajo de las fuentes de iluminación, por la razón de que una vez que a la tarjeta de adquisición (capítulo 2.3.3) se le ordena capturar datos, el manejador de la tarjeta toma el control de la UCP hasta que esta termina de capturar datos, impidiendo el control de las fuentes de iluminación por la UCP.

El microcontrolador es configurado con otros dispositivos electrónicos como el Max232 para comunicación serial con la C.P. que hacen del microcontrolador un sistema de control de 8 bits entrada/salida (figura 2.2).

El microcontrolador recibe el ciclo de trabajo por los bits P3.5 (reloj)

y P3.2 (dato) provenientes de los canales digitales de la tarjeta analógica canal digital 1 (reloj) y 2 (dato). El ciclo es recibido por el microcontrolador cuando el programa principal manda las señales de la figura 2.5. Estas dos señales también en el programa del microcontrolador sincronizan al encendido de diodos con la lectura de datos.

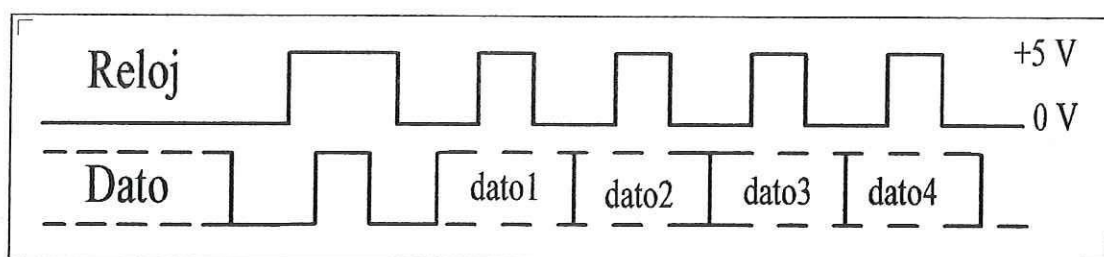


Figura 2.5.- Señal de encendido

El microcontrolador emite 7 señales negadas $CE0_N$, $CE1_N$, ..., $CE6_N$ por el puerto P1 (figura 2.2), con las cuales controla las líneas de diodos que se requieren habilitar, emitiendo un 0 la línea de diodos queda habilitada mientras que con un 1 se deshabilita. El microcontrolador también emite las señales $HabSis_n$ y $Hab2_n$, que son necesarias para precargar el sistema, con $Hab2_n = 0$ habilita el paso de corriente por el interruptor B mientras que $HabSis_n = 0$ habilita el paso de corriente por el interruptor A_i , estas 9 señales provenientes del microcontrolador más una proveniente del sistema de seguridad ($HabP$) entran en un arreglo lógico (GAL22V10).

2.1.4 Arreglo lógico.

Las diez señales que entran al arreglo lógico son configuradas para permitir tener un sistema de seguridad en el sistema de iluminación. Del arreglo lógico salen las 7 señales que controlan los interruptores A_i , la señal que controla el interruptor B y la señal Xe que controla el sistema de seguridad (figura 2.2). En el apéndice B se encuentran los mapas de Karnaugh y sus ecuaciones.

2.2 Sistema de Seguridad.

Un error de programación en el microcontrolador causaría daños al sistema de iluminación, principalmente los DEL ya que éstos son encendidos con una corriente muy superior (80 mA.) a su corriente de trabajo (20 mA). Un error de tiempo en el encendido de los DEL los fundiría o dañaría severamente.

El sistema de seguridad está compuesto por un amplificador operacionales (LM308) y un comparador (LM311).

2.2.1 El amplificador integrador.

El funcionamiento del circuito es el siguiente: el amp. op. LM308 es configurado como un circuito integrador (figura 2.6) el cual produce una salida de rampa bien definida para una entrada constante (figura 2.7), V_{Ent} representa un voltaje constante durante un tiempo T . A causa del voltaje V_R al que se encuentra la entrada no inversora, la corriente de entrada es

$$(e.2) \quad I_{Ent} = (V_{Ent} - V_R) / R_0$$

la ley del capacitor establece que

$$(e.3) \quad C = Q / V$$

o bien $(e.4) \quad V = Q / C$

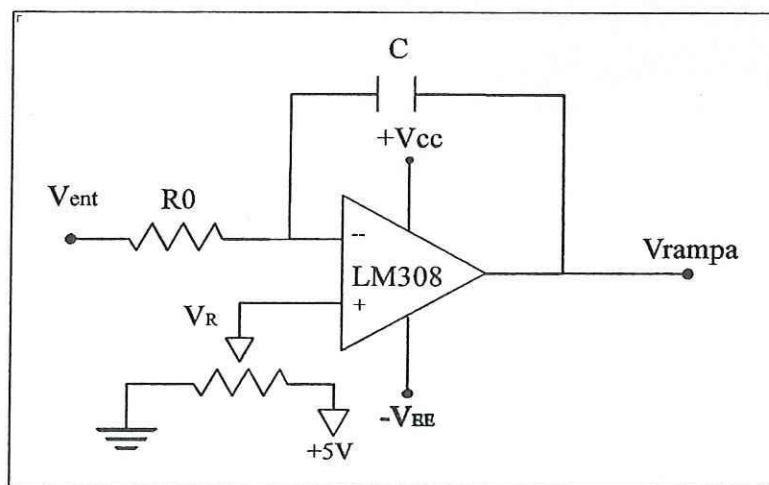


Figura 2.6 El amplificador integrador

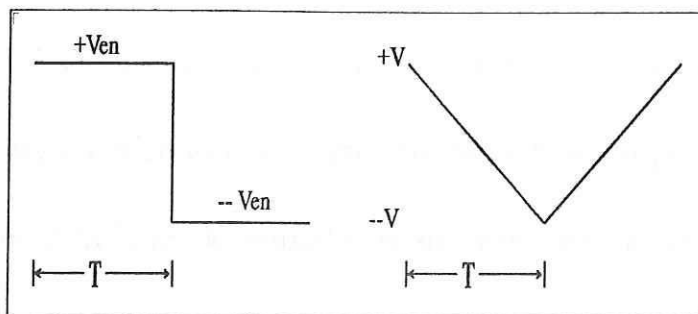


Figura 2.7.- Con V_{ent} constante se obtiene un rampa lineal

Casi toda la corriente fluye por el capacitor y como es constante, la carga Q y el consecuente voltaje se incrementan linealmente. En virtud de la inversión de fase del amplificador operacional, el voltaje de salida será una rampa negativa si $V_{Ent} > V_R$ y una rampa positiva si $V_{Ent} < V_R$. Para obtener el voltaje de salida (V_{rampa}) dividimos la ec. e.4. por T . Como la carga es constante, ésta es la corriente I_{Ent} y V_{rampa} queda dada como

$$(e.5) \quad V = -V_{rampa} = (I_{Ent} \cdot T) / C$$

2.2.2 El comparador con histéresis.

El amp op. LM311 es configurado como un disparador no inversor (figura 2.9), es decir es un detector de cruce por cero con histéresis. Si la salida está saturada negativamente, entonces el voltaje de retroalimentación es negativo, este voltaje de alimentación mantendrá la salida en saturación

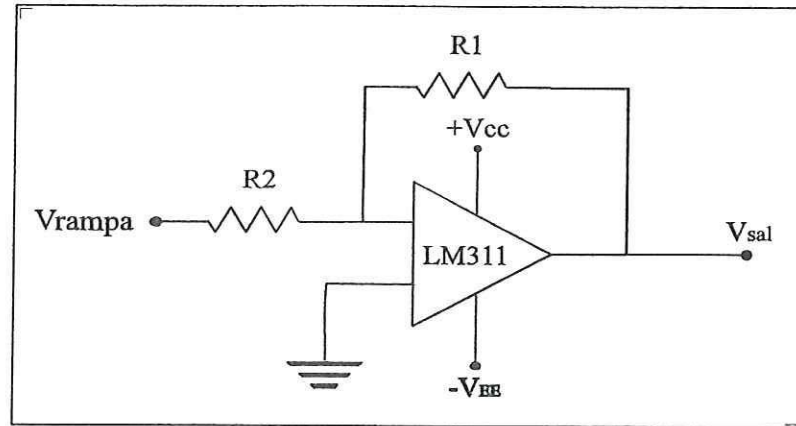


Figura 2.9.- Comparador con histéresis.

Cuando la salida está en saturación negativa, $V_{sal} = -V_{sat}$ y el punto de disparo superior sucede cuando.

$$(e.9) \quad PDS = V_{sat} R2/R1$$

Cuando la salida está en saturación positiva el PDI (punto de disparo inferior) queda determinado por

$$(e.10) \quad PDI = -V_{sat} R2/R1$$

Finalmente si conectamos la salida del detector con la entrada del integrador el circuito queda configurado como en la figura 2.10. En el

instante B, cuando V_{rampa} llega al PDS, la salida del detector se dispara a $+V_{sat}$, esto provoca que el integrador siga rampa abajo, al tiempo C cuando V_{rampa} llegue al punto PDI la salida del comparador se disparará a $-V_{sat}$ y de nuevo la curva del integrador cambiará de dirección rampa arriba

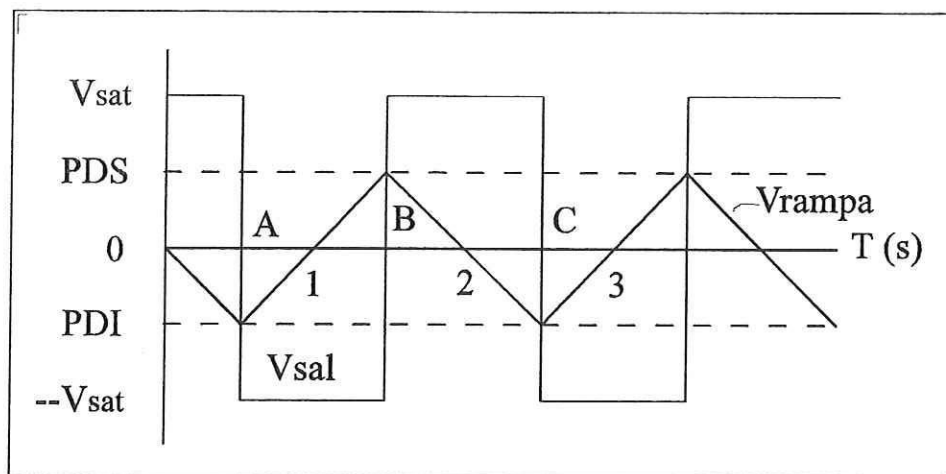


Figura 2.10.- Onda triangular

2.3 Sistema de adquisición.

El sistema de adquisición realiza la captura de datos a través de una fibra óptica pegada a un filtro, el cual sólo permite el paso de luz roja ($680\text{nm} < 685\text{nm} < 690\text{ nm}$), hacia un fotomultiplicador. La corriente emitida por éste es convertida a voltaje por medio de un amplificador de transimpedancia y capturado en la tarjeta de adquisición. Finalmente el programa principal almacena los datos en la memoria de lectura escritura de

la UCP.

2.3.1 El fotomultiplicador.

La clorofila “a” absorbe cerca del 1 % de la luz emitida por una fuente de iluminación para muestras in vivo Aproximadamente sólo entre .005% y .03 % de la luz emitida por la fuente es transformada en fluorescencia roja, El fotomultiplicador Hamamatsu H5783 (Hamamatsu,1997) utilizado cuenta con las características de una alta sensibilidad y respuesta temporal, descrita en la tabla I.

Tabla I.- Características del fotomultiplicador Hamamatsu H5783

| Parámetros | Valor | Unidad |
|-----------------------------------|------------|------------------|
| Sensibilidad radiante (a 420 nm) | 15 | $\mu\text{A/nW}$ |
| Corriente oscura | 1 | nA |
| Ondulación inducida en la señal | 1.1 | mVp-p |
| Tiempo de respuesta | 0.65 | ns |
| Voltaje de control recomendado | +0.25 a +1 | V |

Los datos dados son bajo un voltaje de control de +0.8V. y a una temperatura ambiente de 25° C.

2.3.2 El amplificador de transimpedancia.

La salida de corriente del fotomultiplicador es conectada a un amplificador de señal (lm318), configurado como un convertidor de corriente a voltaje. La corriente que entrega el fotomultiplicador I_{ent} y la salida de voltaje V_{sal} son proporcionales (figura 2.11):

$$e.11 \quad V_{Sal} = R_f * I_{ent}.$$

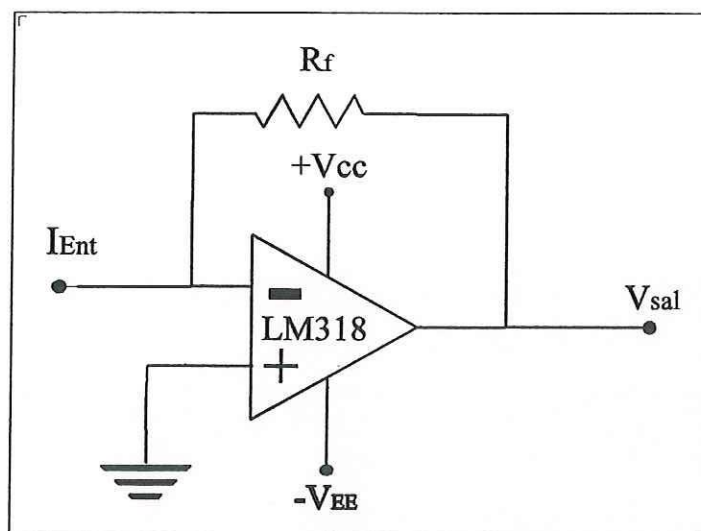


Figura 2.11.- Amplificador de transimpedancia

2.3.3 Tarjeta “Flash12”

La adquisición de datos, la realiza la tarjeta llamada “Flash12” modelo 2 fabricada por Strawberry Tree, inc. (Strawberry,1995), y éstas son sus características.

- La tarjeta cuenta con canales de entrada analógica, 16 simples u 8 diferenciales
- Una rango de resolución desde 12 hasta 14 bits (.006%) seleccionable por programa.
- 8 líneas digitales configurables individualmente como E/S
- 1 contador/temporizador
- Velocidad máxima 1MHz un simple canal
400kHz múltiples canales
- Memoria interna de almacenamiento de datos de 64K
- Alcance de ganancia de +/-5 V

La tarjeta de adquisición puede tener problemas de ruido en la captura de datos y éste puede ser debido a malas conexiones de la señal, errores en la configuración del programa, equipo defectuoso, tarjeta en conflicto con la CP, o ruido del amplificador de transimpedancia.

Capítulo 3 Programación

3.1 Programación del microcontrolador.

El programa del microcontrolador es el encargado de realizar el ciclo de trabajo de los DEL. y de sincronizar su encendido con la adquisición de datos. Para cumplir con su objetivo, el programa habilita su contador 1 para interrumpir cada 200 μ s; programa el TRUA para comunicación serial con la PC; recibe el ciclo de trabajo por el puerto serie y, finalmente, sincroniza los sistemas por p3.2 (dato) y p3.5 (reloj).

El programa sólo tiene 3 posibles parámetros modificables desde la PC dos por el puerto serie y una por p3.3 y p3.4, a saber la cantidad de diodos por encender del pulso actínico (Amplitud figura 3.1), el retardo del pulso prueba 2 (Retardo figura 3.1) y el protocolo de encendido. La subrutina PulsoDoble lleva a cabo el protocolo de encendido descrito en el capítulo 1.2, con las posibles modificaciones de las variables anteriormente descritas.

Es importante tomar en cuenta que los retardos y la sincronización son ejecutados con un microprocesador a 12 MHz, y el mínimo retardo programable por la subrutina "Retardo" es de 11 μ s, (Retardo 2 figura 3.1). La cantidad de DEL por encender puede ser de 1 hasta 23; la duración de los pulsos actínico y prueba son modificables en un alcance de 3 a 13 μ s. con un intervalo de 2 μ s, es necesario modificar el programa si se desea dar nuevos valores a Retardo 1, a la amplitud de los pulsos prueba, y a la duración de los diferentes pulsos para un rango diferente de 3 a 13 μ s.

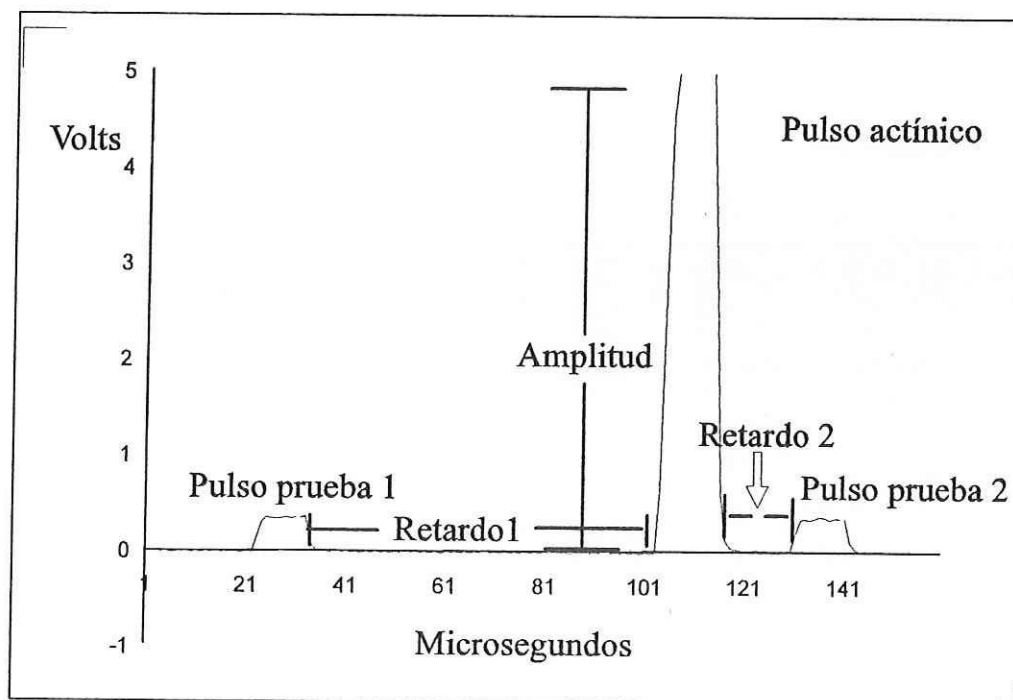


Figura 3.1.- Variables modificables desde la PC, Retardo 2 y Amplitud

El listado del programa, cuyo nombre es Fluor.asm, se incluye en el disco de programas adjunto a este trabajo. El programa se escribió en lenguaje ASM, y fue ensamblado en Intel-ASM-51 Macro Assembler. Para cargar el programa en la memoria de lectura/escritura se hizo mediante el sistema "SPRINT-EXPERT".

3.2 Programación de la Tarjeta Flash12.

El programa principal envía las variables al microcontrolador y parámetros a la tarjeta de adquisición. Para poder programar la tarjeta son necesarios el manejador de conexión analógica (GDRV) y el programa HSOVL. GDRV es un intermediario entre el programa y la tarjeta, convirtiéndose éste en una interfaz de mandos, y HSOVL es un sub-manejador de alta velocidad necesario para identificar y usar la tarjeta flash12.

El lenguaje utilizado en la programación de la tarjeta es "C" de Borland Turbo C. Este lenguaje fue elegido en base a que se tenía un esqueleto de un programa de adquisición de datos analógicos. Este programa y otros más, vienen como ejemplo de programación de la tarjeta "Flash12" en un disco flexible distribuido por los fabricantes de la tarjeta. El programa

fue modificado y adaptado a nuestras necesidades.

El programa principal únicamente adquiere datos por el canal uno, configurado en forma diferencial con un alcance de voltaje de ± 5 volts, y con un periodo de muestreo elegido por el usuario. El programa graba los datos almacenados por la tarjeta de adquisición en la memoria de la PC y es encadenado al programa Graph12.h (programa graficador) y a la subrutina MS_CALL.OBJ que se encarga de interrumpir al manejador y al programa.

Antes de hacer la lectura de datos, el programa principal envía parámetros al microcontrolador por el puerto serie, y la tarjeta envía las señales digitales (canal 1 y 2) al microcontrolador para inicializarlo

Una vez capturados los datos por la tarjeta, el programa principal graba los datos en la memoria RAM para minimizar tiempo en una secuencia de lecturas, ya que el programa no tiene acceso a los datos mientras la tarjeta está leyendo.

Capítulo 4 Resultados.

Los DEL tienen un espectro de emisión como lo muestra la figura 4.1, aparentemente sin emisión en el rojo. Si se pone un filtro rojo entre el DEL y el fotomultiplicador, éste debe bloquear toda la luz azul del DEL y no haber señal de luz.

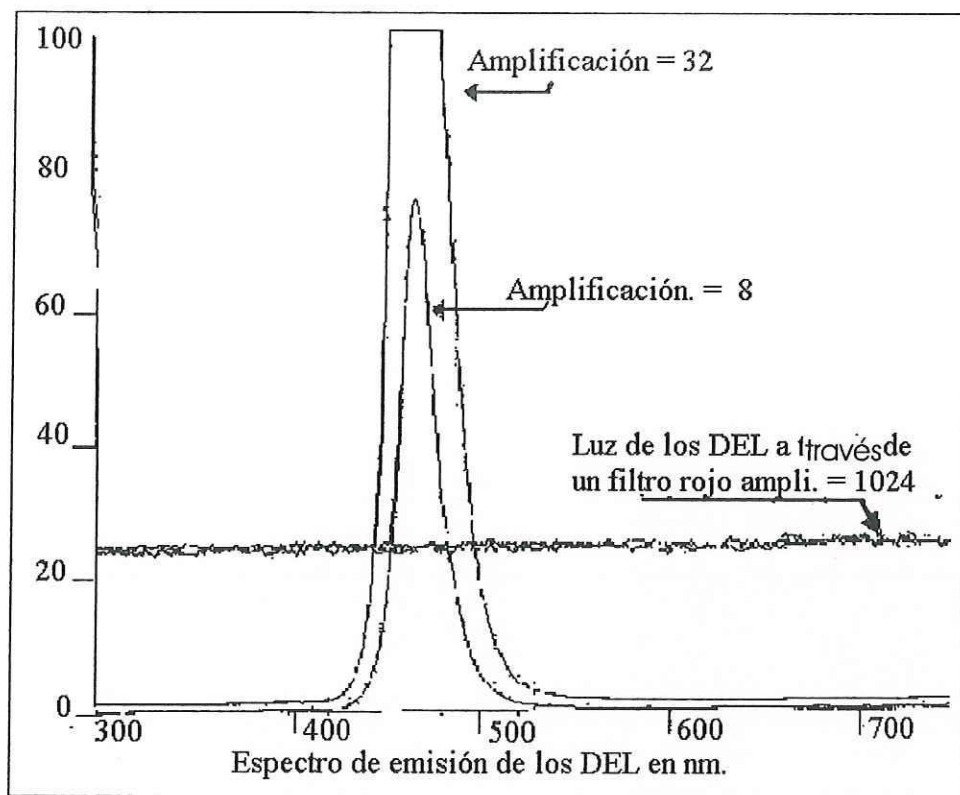


Figura 4.1.- Espectro DEL azul a través de un filtro rojo.

Sin embargo, en pruebas experimentales se observaron los siguientes resultados, Figura 4.3. Al colocar un filtro rojo entre el DEL y el fotomultiplicador se observa una luz base aproximadamente de 1.3 V, si se

coloca un filtro rojo entre el DEL y el primer filtro rojo figura. 4.2 caso b, se observa que el flujo de fotones disminuía un 80 %. Si ahora se coloca un filtro azul entre el DEL y el primer filtro rojo, caso a, este flujo se decremента significativamente.

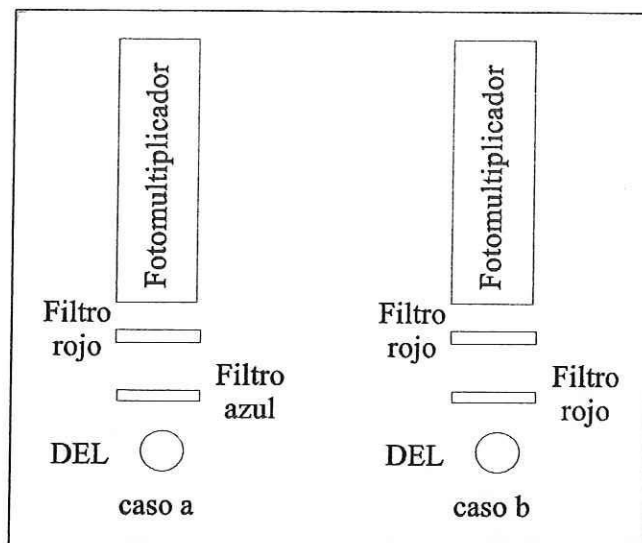


Figura 4.2.- Dos diferentes pruebas

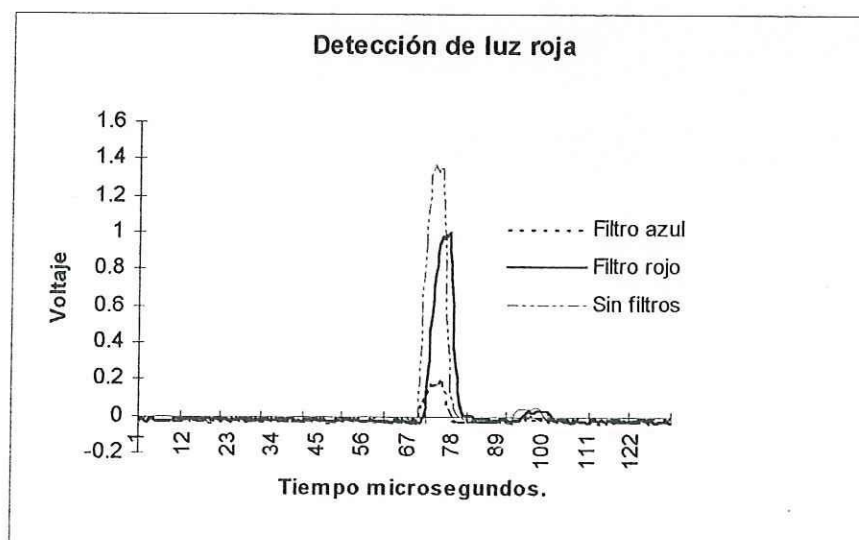


Figura 4.3.- Detección de luz roja en el diodo.

Este fenómeno podría explicarse en base a una o más de las siguientes hipótesis:

- a) Los DEL tienen una emisión residual en el color rojo.
- b) El filtro rojo, al ser iluminado por luz azul, presenta fluorescencia o luminiscencia en el rojo.
- c) El filtro azul presenta el mismo fenómeno que el descrito en el párrafo anterior.

En posteriores experimentos se observaron los resultados de la tabla II. Los diferentes filtros azules utilizados siempre se colocaron entre el DEL y el filtro rojo (figura 4.1 caso a), el experimento se realizó bajo diferentes condiciones obteniéndose aproximadamente los mismos resultados:

- 1.- El experimento se realizó dentro de una caja negra con un pedazo de teflón.
- 2.- Dentro de una caja negra sin teflón.
- 3.- En un cuarto oscuro sin paredes en donde la luz se reflejara.

Tabla II.- Diferentes experimentos que apoyan la hipótesis c.

| | Base | Filtro azul 5135 | Filtro s/n | 2 filtros azules, valores obtenidos esperados | |
|--------------------------|------|------------------|------------|---|------|
| $V_{\text{Caja oscura}}$ | 1 | .1 (10 %) | .15 (15 %) | .04 | .015 |
| $V_{\text{Teflón}}$ | 1.2 | .12 (10 %) | .15 (12.5) | .07 | .015 |
| V_{Aire} | 1.8 | .13 (7.2 %) | .18 (10 %) | .05 | .013 |

En las columnas de la tabla II se observa el porcentaje de la luz transmitida. La pequeña diferencia entre los porcentajes de los distintos casos se puede atribuir, a que la posición del DEL y el fotomultiplicador nunca es la misma. En la última columna se observa que los datos obtenidos no concuerdan con los datos esperados en la razón 3:1. Si se intercambian de posición los filtros rojos con los azules, pasando del caso a al caso c, figura 4.5, el resultado de la señal obtenida en la tabla anterior se hace cero (figura 4.4).

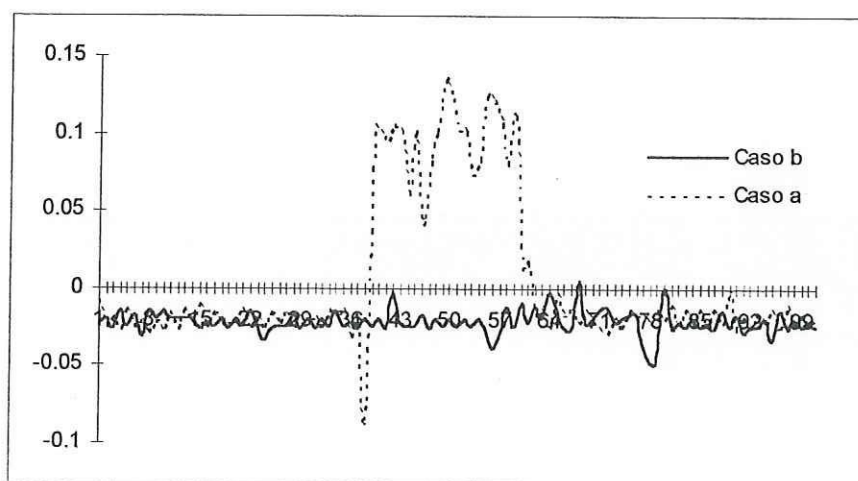


Figura 4.4- Caso a y c figura 4.5

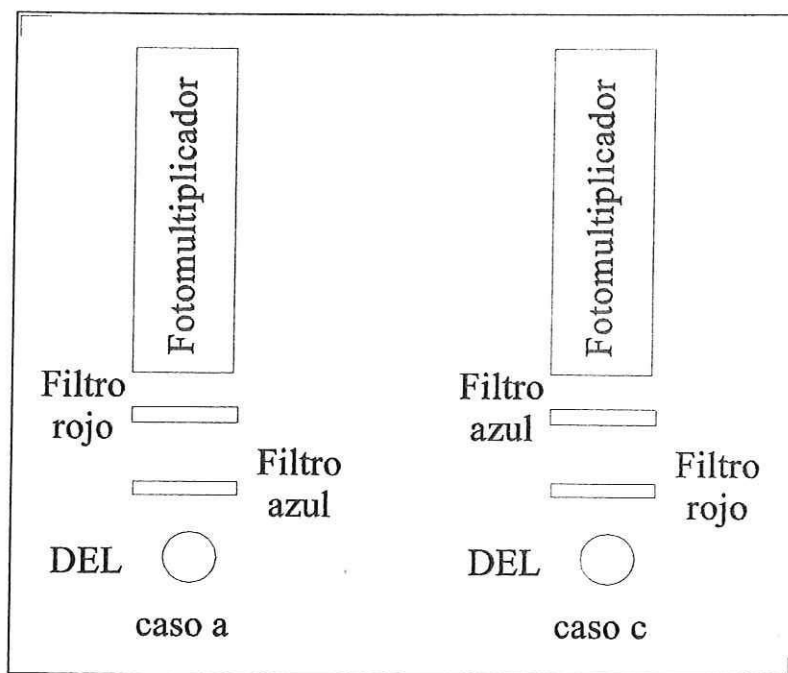


Figura 4.5 Experimento que apoya las hipótesis b y c descritas anteriormente.

El resultado obtenido apoya la idea de las hipótesis b y c estipuladas anteriormente.

Como esta eventual luz roja tenía pocas probabilidades de coincidir espectralmente con la debida a la fluorescencia asintótica, se agregó un filtro pasabandas centrado en 685 ± 5 nm. al sistema de adquisición, reduciendo en 35 veces la cantidad de luz roja indeseable. En la figura 4.6, se observa la cantidad de luz roja para la misma luz de excitación con y sin filtro pasabandas. En ambos casos, la muestra es agua destilada.

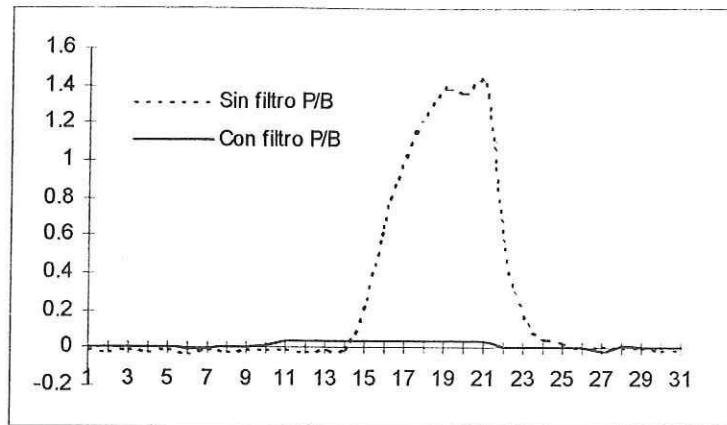


Figura 4.6.- Reducción de luz indeseable.

Al realizar mediciones con la tarjeta “flash12”, se encontró un problema: para periodos de muestreo por abajo de $3 \mu\text{s}$., la tarjeta tiene un ruido propio de aproximadamente 833 Hz (figura 4.7) y una amplitud de .018 mV, y éste se debe a un defecto de diseño de la tarjeta.

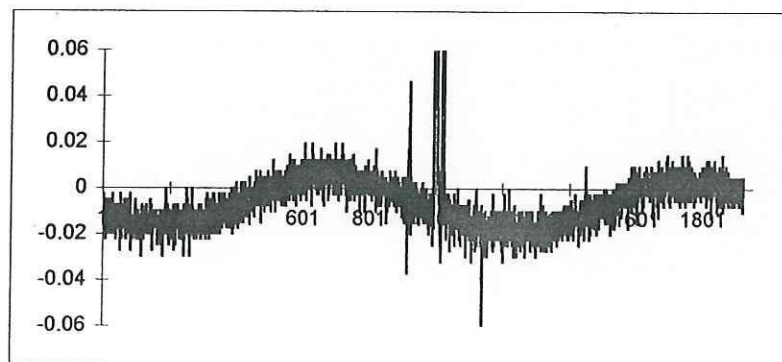


Figura 4.7.- Ruido debido a la tarjeta defectuosa

El ruido desaparece para valores en el periodo de muestreo mayores a $3 \mu\text{s}$. (figura 4.8).

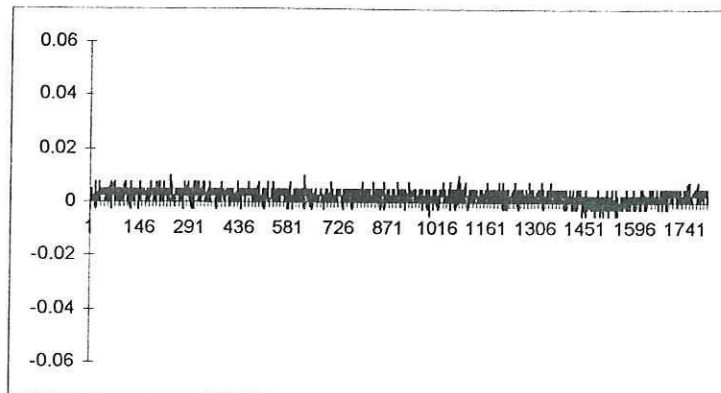


Figura 4.8.- Periodo de muestreo 5 μ s.

La tarjeta de adquisición tiene una resolución de 12 bits, la figura 4.9 se observa dicha resolución para un periodo de muestreo de 1 μ s, aproximadamente \pm 2.44 milivolt.

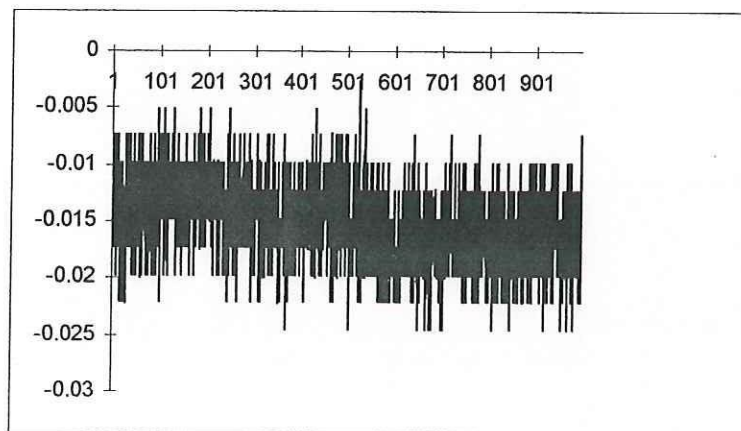


Figura 4.9.- Resolución de la tarjeta de adquisición a 1 μ s.

Se observó ruido en la adquisición de datos producido por el amplificador de transimpedancia aproximadamente 30 veces más grande

que la resolución de la tarjeta, y se comprobó que era producido por la fuente de alimentación.

Al incluir una fuente de alimentación separada, se disminuyó considerablemente este problema. La figura 4.10 muestra el ruido con el amplificador de transimpedancia alimentado separadamente. Su valor pico es ahora sólo 10 veces más grande que la resolución de la tarjeta.

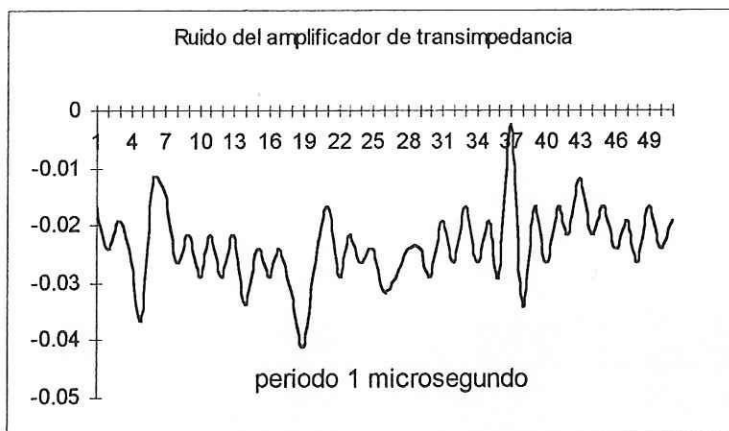


Figura 4.10- Ruido causado por el amplificador transimpedante.

Cuando se abre el interruptor A_i (figura 2.4), para encender los DEL, la bobina inductora $L1$ tiene oscilaciones que decrecen con el tiempo figura 4.11. Se realizó un diseño electrónico que minimizara estas oscilaciones (figura 4.12).

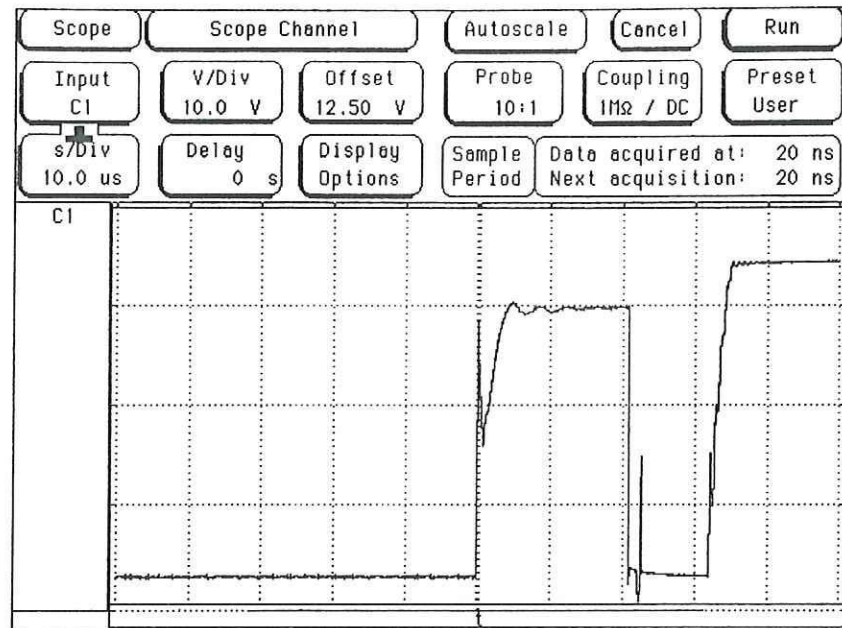


Figura 4.11.- Oscilaciones de L1 figura 2.4

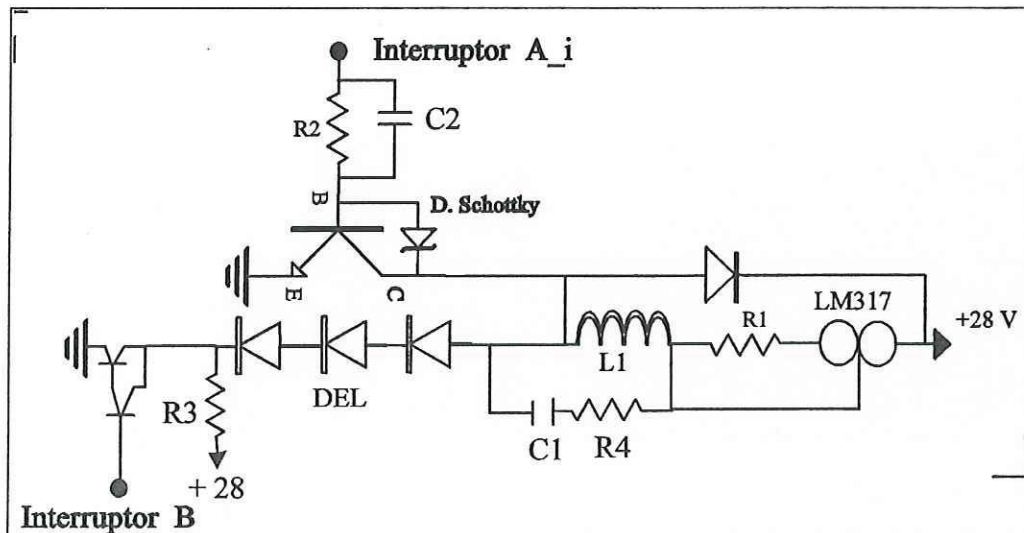


Figura 4.12.- Nueva configuración en la bobina inductora

Posteriores experimentos comprobaron que la amplitud de las oscilaciones dependen de la cantidad de DEL que se enciendan y de la bobinas utilizadas. En la figura 4.11 se observa un retardo y oscilaciones

para el encendido de 5 DEL y los valores actuales de L1, R4 y C1 (figura 4.12). Jugando con estos tres valores se encuentran mejores valores en el encendido/apagado de los DEL (figura 4.13).

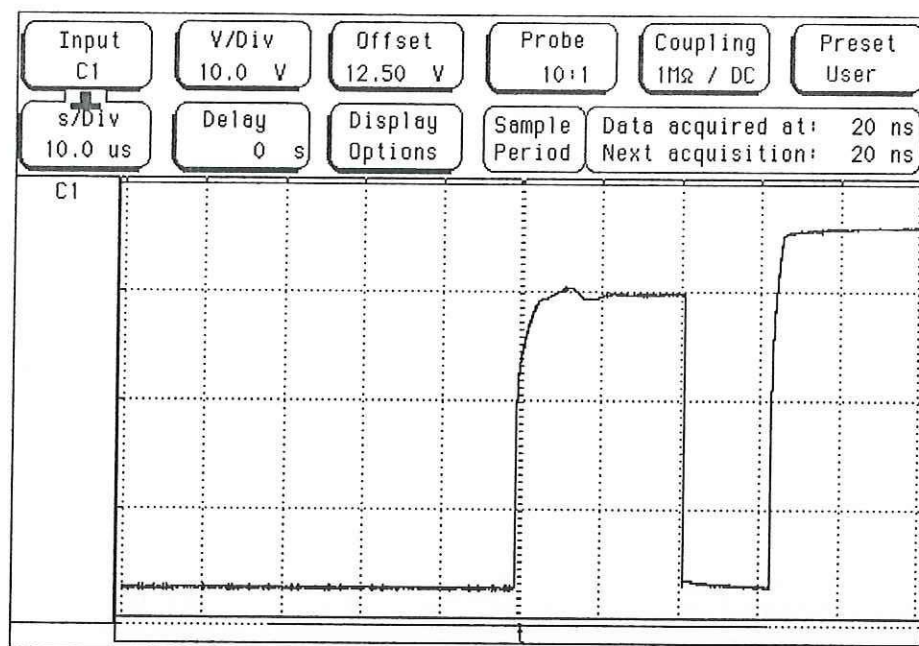


Figura 4.13 .- Nuevos valores de L1, R4 y C1 figura 4.12.

En figura 4.14 observamos los tiempos de encendido apagado del amplificador de transimpedancia. Parte del retardo observado es debido al problema anteriormente mencionado, y otra parte al mismo amplificador.

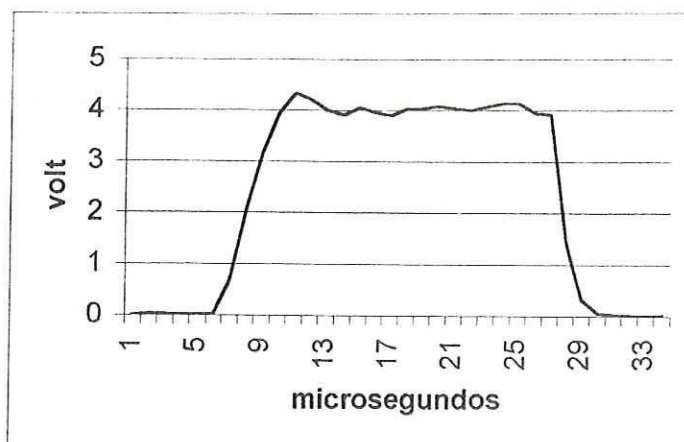


Figura 4.14.-Retardo encendido/apagado

Capítulo 5 Conclusiones

Se diseñaron y realizaron los circuitos y programas de control de un fluorómetro de resolución temporal destinado al estudio de fotosíntesis en clorofila "a". Actualmente, la resolución temporal del instrumento es de 2.5 microsegundos. El sistema de conmutación de sus fuentes de iluminación es por corriente lo que garantiza una intensidad de luz más constante en comparación con aquellos basados en voltaje.

Durante las pruebas efectuadas, se determinó que los DEL azules emiten luz roja residual y que los filtros rojos y azules tienen una respuesta no lineal, emitiendo luz roja parásita cuando son iluminados con luz azul.

Esta luz roja indeseable, que impide la medición adecuada de aquella debida a la fluorescencia es de un espectro amplio en longitud de onda, por lo que pudo ser disminuida en una razón 1/35 mediante un filtro pasabanda centrado en las longitudes de onda de la luz de fluorescencia.

Así mismo, se detectó un problema de ruido en la tarjeta de adquisición utilizada, el que se debería a un mal diseño de la misma.

En estas condiciones, con el fin de mejorar las características de este fluorómetro y de ampliar su gama de aplicaciones sería recomendable.

- a) Diseñar un sistema de conmutación de los DEL de mayor velocidad.
- b) Disminuir el ruido del sistema substituyendo la tarjeta de adquisición y mejorando el diseño del amplificador de transimpedancia.

Bibliografía

- Strawberry Tree, 1995. Flash 12 Data Acquisition and control Board owner's Manual, and Analog Connection Development System.
- Intel, 1997. Embedded Controller Handbook. Sections 5:1-9, 6:1-32, 7:1-23.
- Malvino & Albert paul, 1986. Principios de electronica. Mcgraw-Hill, pp 3-8, 115-117, 154-161.
- Coughlin, Robert F., 1987. Circuitos integrales y amplificadores operacionales. Prentice-Hall, pp 58-64, 124-128.
- Kochan, Stephen, 1989. Programming in C. Hayden Books.
- National Semiconductor, 1982. Linear Book, Sections 3:144-153, 165-171, 5:48-55, 1:23-30
- Kolber & Falkowski, 1993. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. By the America Society of Limnology and Oceanography. Inc., 38(8): pp 1646-1665.
- Hall & Rao, 1994. Photosynthesis, Cambridge University Press, pp 1-75.
- Falkowski & Raven, 1997. Aquatic Photosynthesis, Black Well, pp 65-95.

- Kooten & Snel , 1990. The use of Chlorophyll nomenclature in plant stress physiology Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory Chapman & Hall, London, pp 193-206.

Apéndice A Secuencia de encendido.

Encendido.

Partimos del estado en que los interruptores se encuentran abiertos el estado **a**, mapa de Karnaugh (figura A.1)

Se habilita el paso de corriente por el interruptor A_i figura 2.4, pasando del estado **a** al **b**

Se habilita el paso de corriente por el interruptor B, pasando del estado **b** al **c**

Se habilitan las líneas de diodos por encender, pasando del estado **c** al **e**

Finalmente se hace el encendido al cortar el paso de corriente por el interruptor A_i pasando del estado **e** a **f**

Apagado.

Se apaga el DEL al cortar el paso de corriente por el interruptor A_i pasando del estado **f** al **e**

Deshabilitamos las líneas de diodos, pasando del estado **e** al **c**

Deshabilitamos el paso de corriente por el interruptor B, pasando del estado **c** al **b**

Deshabilitamos el paso de corriente por el interruptor A_i, pasando del estado **b** al **a**

Finalmente llegamos al estado en que los interruptores se encuentran abiertos (estado **a**). La figura A.2 nos muestra el ciclo de encendido y apagado.

| HabSis HabP | Hab2 CEi | 00 | 01 | 11 | 10 |
|----------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 00 | | 000 | 110 | 110 | 100 |
| 01 | | 000 | 110 | 110 | 100 |
| 11 | | 000 | 011 ^f | 110 ^e | 100 |
| 10 | | 000 ^a | 110 ^d | 110 ^c | 100 ^b |

A_i B X_e

Figura A.1.- Mapa de Karnaugh del interruptor A_i y B.

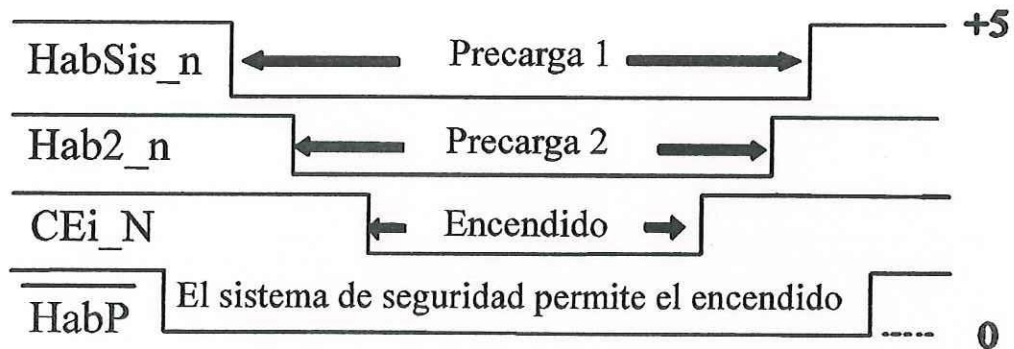


Figura A.2.- Ciclo de encendido.

Apéndice B Mapas de Karnaugh

El interruptor A_i y B es abierto/cerrado si es igual a 0/1. Se requiere que cuando la señal HabP sea igual a 1 el arreglo lógico ponga la señal $A_i = 0$ y con $HabP = 0$ ponga a A_i en 1 permitiendo que el interruptor se cierre y la corriente que circula por B se derive por el transistor interruptor A_i . La señal Xe igual a 1 indica que una o varias líneas están encendidas.

Se habilitan los interruptores A_i en los siguiente casos (mapa de Karnaugh de la figura A.3).

| HabSis HabP | Hab2 CEi | 00 | 01 | 11 | 10 |
|----------------|-------------|----|----|----|----|
| 00 | | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 01 | | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 11 | | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 10 | | 0 | 1 | 1 | 1 |

Figura A.3- Señal A_i .

$$A_i = \neg HabP * Hab2 + HabSis + \neg CEN_i * Hab2$$

| HabSis HabP | Hab2 CEi | 00 | 01 | 11 | 10 |
|----------------|-------------|----|----|----|----|
| 00 | | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 01 | | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 11 | | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 10 | | 0 | 1 | 1 | 0 |

Figura A.4.- Señal B.

La señal que controla a B es habilitada en los casos marcados por el mapa

y su ecuación queda determinada como $B = \text{Hab2}$;

| HabSis HabP | Hab2 CEi | 00 | 01 | 11 | 10 |
|----------------|-------------|----|----|----|----|
| 00 | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 01 | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 10 | | 0 | 0 | 0 | 0 |

Figura A.5.- Señal Xe.

Para la señal de seguridad X_e

$$X_e = /HabSis * Hab2 * Habp * CE0_N + \dots +$$

$$/HabSis * Hab2 * Habp * CE6_N.$$

Cada interruptor controla diferentes cantidades de DEL para poder encender de 1 a 23 diodos.

Cantidad de DEL que controla cada interruptor:

$$A_0 = 1$$

$$A_1 = 5$$

$$A_2 = 2$$

$$A_3 = 4$$

$$A_4 = 5$$

$$A_5 = 1$$

$$A_6 = 5$$