

## Índice

1. O AxioVision: princípios	3
2. Como instalar ?	4
3. Operação básica	7
4. Comprovando o balanço de cores (opcional)	11
5. Imagem ao vivo - operação avançada	12
6. Imagem ao vivo e a Workarea	14
6.1 – Aba Frame	14
6.2 – Aba General	15
7. Live properties	17
7.1 – Aba Display	17
7.2 – Aba Navigator	19
8. A fotografia foi obtida. O que fazer ?	20
8.1 – Ferramentas de medição	21
8.2 – Edição de atributos	23
8.3 – Resultados das medições e geração de tabela	24
8.4 – ROI (Region of Interest)	25
8.5 – Prancha (Splitter)	26
8.6 – Relatório (Report.zvr)	27
9. Salvando fotos ou arquivos	30
10. Os módulos do AxioVision	35
10.1 – AxioVision Base	35
10.2 – Fluorescence Lite	36
10.3 – AutoMeasure	37
11. Considerações finais	51
12. Bibliografia	52
Autores e Contatos	53
Anexo 1 - Ligando AxioCams: as placas Firewire	54
Anexo 2 – Calibração de medidas no AxioVision	57



## 1. O AxioVision: princípios

A aquisição, pelo cliente, de qualquer câmera para microscopia óptica junto à Carl Zeiss, implica no envio de um DVD com o software *AxioVision* como parte do kit. A princípio, o DVD contido na embalagem corresponde à última versão do AV disponibilizada pela Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha.

Para cada nova versão do AV lançada, há apenas um tipo de DVD existente, sem variantes - o que difere a versão normal (vendida ao cliente, com módulos especiais) da versão *LE* (*Limited Edition*, parte integrante do kit da câmera) é o *Dongle* (chaveiro USB) que libera as licenças de uso.

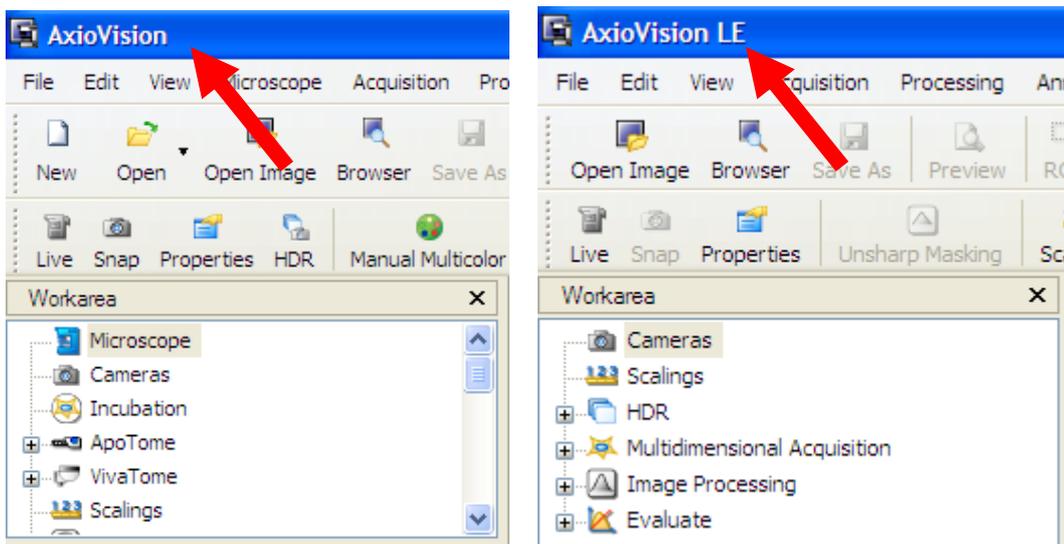


Figura 1.1 - AxioVision e AxioVision LE

As principais ferramentas **ausentes** na versão LE são:

- comunicação com microscópios motorizados e/ou codificados (*MTB* ou *Microscope Configuration*);
- plugins para incubadora, módulo CO<sub>2</sub>, controle de temperatura, entre outros;
- funções de relatório (*Report*) e prancha (*Splitter*);
- medições e anotações relevantes, tais como contagem de eventos e setas indicadoras;
- módulos especiais.

Entretanto, o AV LE permite a operação de câmeras *AxioCam* em modo *live* com possibilidade de tratamento de cores, captura de imagens, medições básicas (distância, área e ângulo), transporte de valores de medidas para planilha e salvamento de imagens em diversos formatos sem quaisquer diferenças em relação ao AV licenciado.

Antes de iniciar a instalação do *AxioVision*, certifique-se de que o computador, além de possuir os requisitos mínimos (descritos no verso da embalagem do DVD), tenha também a porta para conexão da câmera adquirida (IEEE 1394B para *AxioCam ICc5*, USB 2.0 para *AxioCam ERc5s*, IEEE 1394A para as demais).

## 2. Como instalar ?

Insira o DVD enviado com o kit da câmera no leitor do seu computador. A tela representada na figura 2.1 (abaixo) abrir-se-á automaticamente. Caso isto não ocorra, acesse o Windows Explorer e dê um duplo-clique sobre a unidade de disco correspondente ao DVD (conforme figura 2.2).



Figura 2.1 – Instalação do AV, início

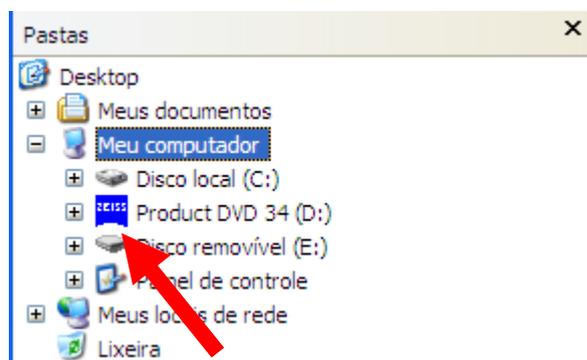


Figura 2.2 – Instalação do AV, via WinExplorer

Siga os passos da instalação preenchendo os campos requeridos. Na tela de seleção de programas a instalar, marque as opções *AxioVision* e *MTB2004* conforme a figura 2.3.

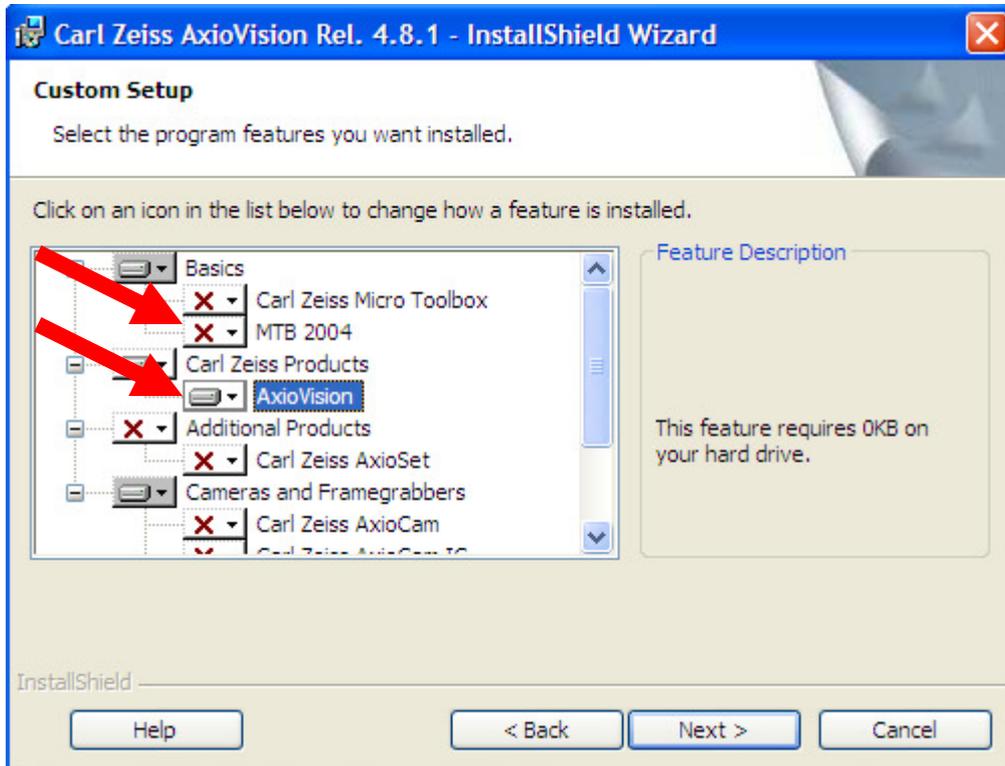


Figura 2.3 – Seleção do software

Se a câmera adquirida pelo cliente for uma *AxioCam* ou *AxioCam IC*, marque a opção correspondente conforme a figura 2.4.

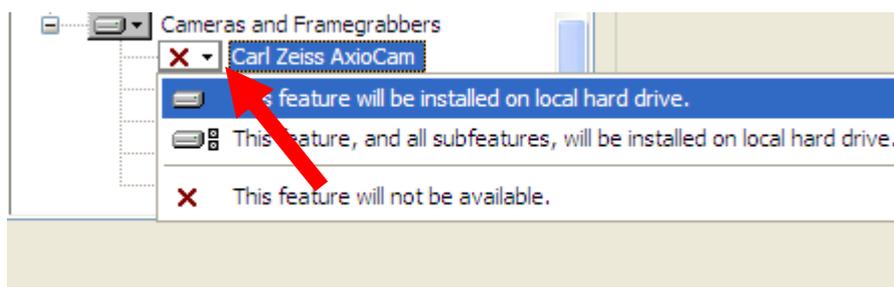


Figura 2.4 – Seleção da câmera

A instalação de uma *AxioCam IC*, quando do passo seguinte à seleção dos programas a instalar, exige a instalação de um *driver* especial, através do aparecimento de uma tela extra (conforme figura 2.5). Certifique-se de que o *checkbox* indicado está marcado e prossiga a instalação.

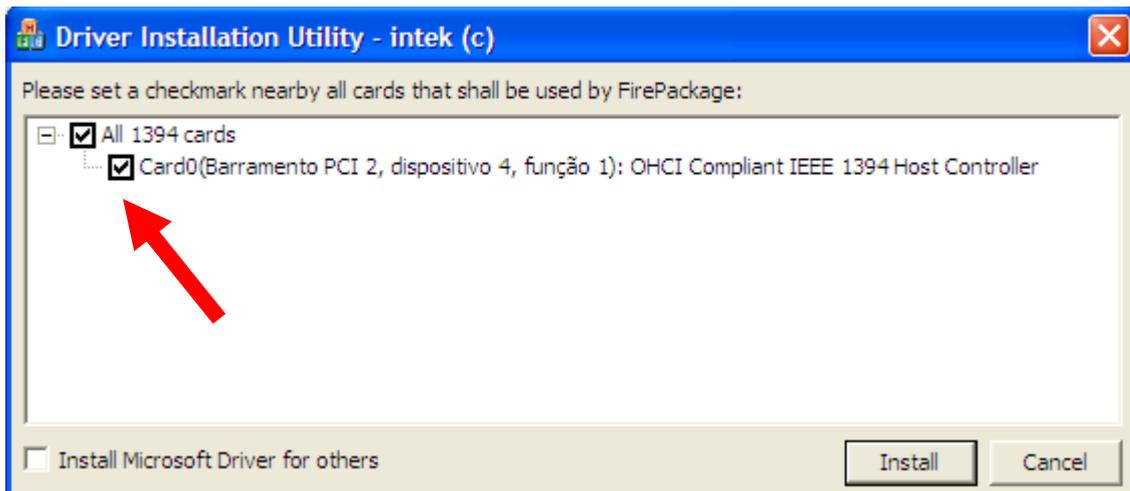


Figura 2.5 – Driver INTEK para AxioCam IC

Se o processo de instalação apresentar mensagem de erro de certificado, selecione a opção **Continuar Assim Mesmo** (*Continue Anyway*) e siga com a instalação até o seu término.



### 3. Operação básica

Na área de trabalho do Windows, dê um duplo-clique no ícone *AxioVision Rel. 4.8*, conforme figura 3.1.

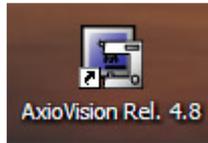


Figura 3.1 – AxioVision, acesso

Após o carregamento do programa, a tela inicial apresentar-se-á de acordo com a figura 3.2, abaixo.

Para acessar as principais ferramentas essenciais à operação, é recomendável abrir uma barra de controles vertical denominada *Workarea* clicando no local indicado:

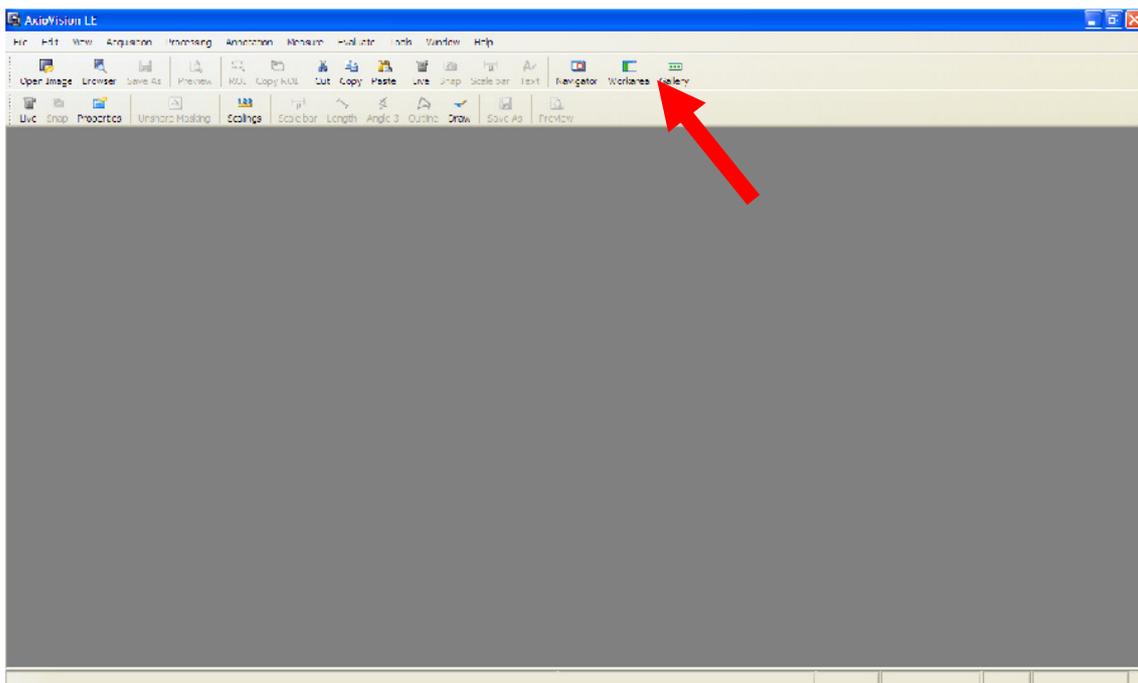


Figura 3.2 – AxioVision, tela inicial

As barras de ferramentas horizontais, na parte superior da tela, podem ser abertas e alteradas de acordo com as preferências do usuário, com mais flexibilidade se o AV for a versão licenciada (e não a LE). Para abri-las ou fechá-las, basta clicar com o botão direito na região das barras já abertas e selecionar a barra desejada.

Na barra de controles vertical aberta pela ativação da *Workarea*, dê um duplo-clique no item *Camera* – que mostrará, como subitem, a câmera conectada ao computador. Selecionando a câmera mostrada com um simples clique, as funções de ajuste da imagem ao vivo far-se-ão disponíveis na parte inferior.

Antes de trazer a imagem ao vivo à tela, conforme a figura abaixo, deve-se levar em conta que:

- a qualidade de imagem que o usuário tem na observação pelas oculares deve ser transferida para a câmera e a partir deste ponto pode-se tentar, se aplicável, melhorias digitais;
- má qualidade de imagem obtida nas oculares dificilmente será mascarada com tratamento digital. Tudo depende da origem, ou seja, do que é visto nas oculares;
- podem ocorrer algumas variações de intensidade luminosa entre os meios visuais devido ao tipo de tubo binocular usado (50/50, 70/30, 80/20, 100/0), ou por ajustes realizados no microscópio;
- não há coerência em tratar uma imagem já fotografada se houver possibilidades de se obter a mesma imagem novamente a partir da câmera, que por sua vez advém de uma boa origem - as oculares.

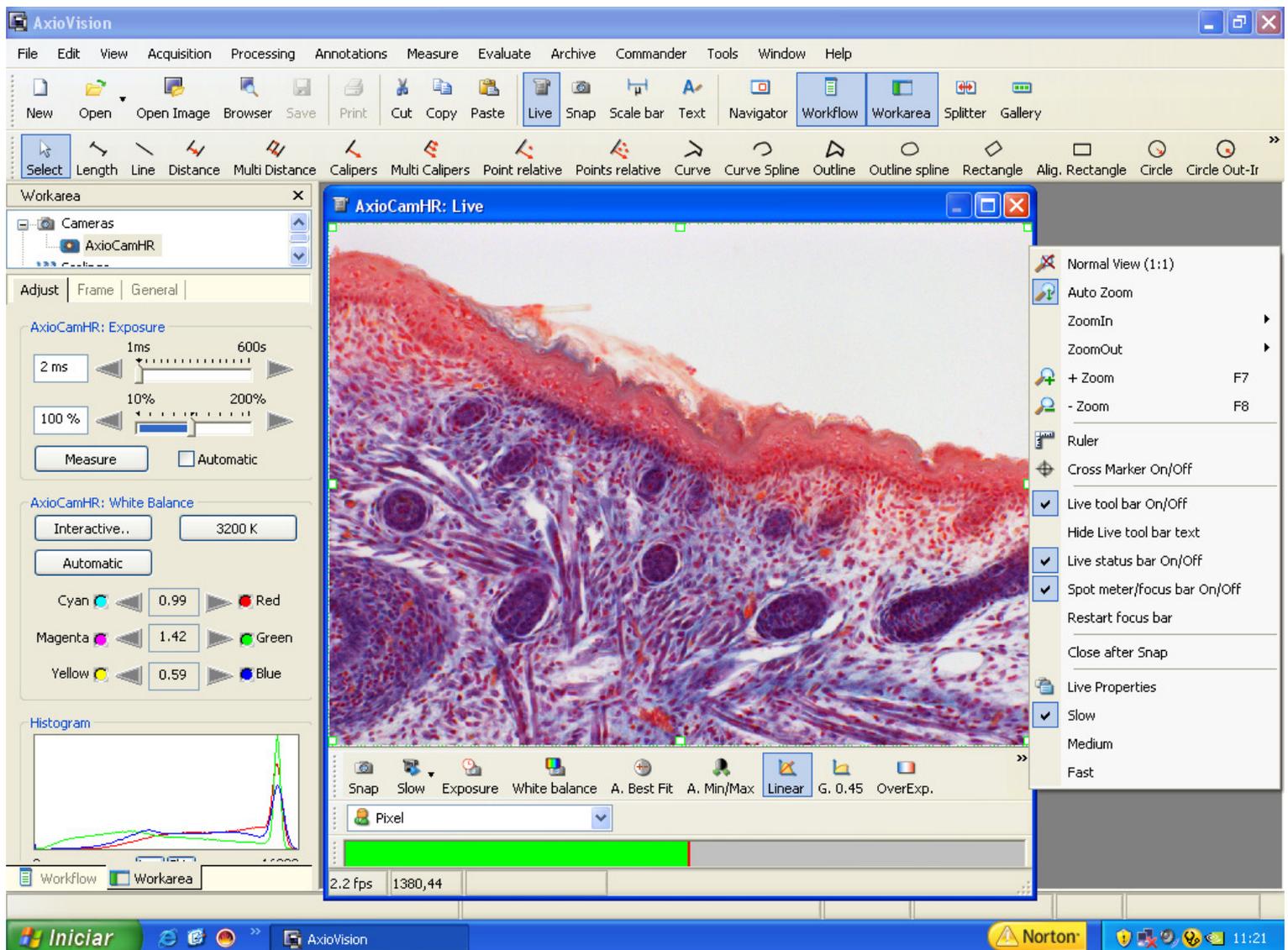
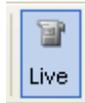
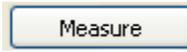


Figura 3.3 – Workarea e Live view



Clique no botão **Live** para exibir a imagem ao vivo, que, inicialmente, não estará ajustada. **Neste momento, não se recomenda novo ajuste via microscópio** - se a imagem no binóculo é vista a contento como exposto nos itens acima, a imagem ao vivo, portanto, deve ser posta nas mesmas condições através dos comandos de software.



Clique no botão **Measure** localizado na aba **AxioCamHR: Exposure** da *Workarea* (lado central esquerdo da tela) e observe o tempo (em milissegundos, ms) retornado pela câmera. O tempo indicado, quando usando técnicas simples de microscopia de luz transmitida, deve estacionar em torno dos 3ms.

**OBS:** no uso de técnicas avançadas de microscopia (ex: fluorescência, DIC e polarização), o tempo de exposição requerido para a formação das imagens será usualmente mais alto. De todo modo, leve em conta apenas que a imagem vista no binóculo tem de estar boa.

Se as dicas anteriores em relação à imagem vista nas oculares foram seguidas e não há imagem ao vivo, verifique se o cursor do tubo binocular (se presente, é uma alavanca na lateral direita do binóculo) está posicionado para visualização via câmera.

Na parte inferior da janela da imagem ao vivo, clique no botão *Linear*.



Figura 3.4 – Linear, imagem real

Nesta condição, garante-se que a imagem exibida não tem qualquer tratamento digital por enquanto, ou seja, a imagem é fiel à vista nas oculares. Os demais pré-ajustes acima ilustrados (Best Fit, Min/Max e 0.45) introduzem sugestões de melhoria à imagem, mas já indicam a utilização de tratamento digital. O acionamento destes é de preferência do operador, de acordo com a necessidade de melhoria exigida.

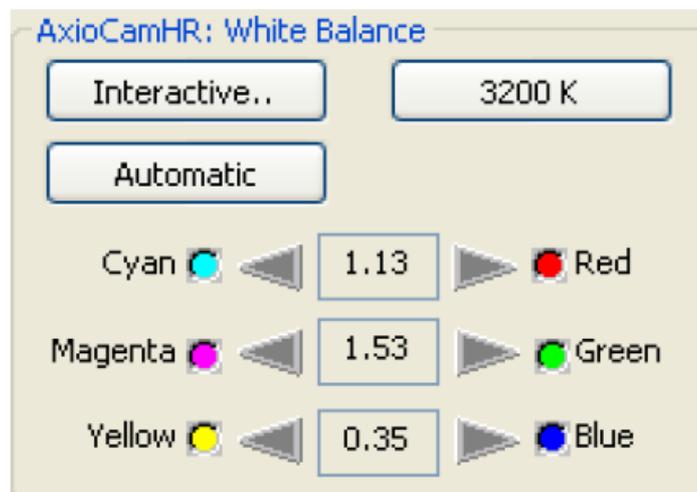


Figura 3.5 – White Balance

O próximo passo consiste em ajustar o balanço de branco da imagem ao vivo (conforme figura 3.5). Clique no botão , localizado no campo *White Balance* (logo abaixo das funções do campo *Exposure* usadas anteriormente). O software tomará como referência a média das áreas brancas presentes na imagem e aplicará o balanço de branco. Se necessário (ex: imagem aparentemente escura), aumente o tempo de exposição (via cursor ao lado do tempo em ms) e repita o balanço de branco. Se não houver áreas claras suficientes para tomada de referências, o branco ajustado não será o ideal, apresentando, em muitos casos, tons rosados ou azuis. Se isto ocorrer, clique no botão *Interactive* e escolha, com o cursor do mouse, um pixel branco (área da imagem sem material) ou preto.

O botão  zera qualquer ajuste feito anteriormente e assume a temperatura de cor da fonte de luz do microscópio.

Os botões  (ativados pelo checkbox *Show Channels*), são comandos que realçam cores individualmente e que, se utilizados em excesso, desbalanceiam as cores originais. Pode-se também lançar mão do *Color Offset*, que puxa a cor do fundo para tons azulados ou amarelados.

**OBS:** se usar o *Color Offset*, após obter a fotografia clique no botão *Reset* abaixo do cursor. Isso garante que as próximas imagens não serão pré-influenciadas por quaisquer ajustes anteriores do fundo.

Feitos os ajustes de *Exposure* e *White Balance*, já é possível colher a imagem para os trabalhos subsequentes (e desde que não se deseje executar ajustes adicionais sobre a imagem ao vivo, descritas na sequência deste material). O comando usado para tirar fotografias é denominado *Snap* e pode ser encontrado em até cinco lugares diferentes:

- na barra de ferramentas horizontal (parte superior da tela);
- na parte inferior da janela da imagem ao vivo;
- no menu *Acquisition*;
- através da tecla de atalho **F3**;
- na aba *Workflow*.

Antes da obtenção da fotografia, no entanto, deve-se selecionar a objetiva em uso na imagem ao vivo pelo *listbox* apresentado na figura 3.6, localizado na parte inferior da tela do *Live*, para que a escala correspondente seja aplicada.

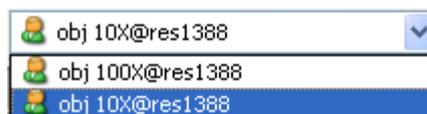


Figura 3.6 – Listbox de seleção de objetiva

A imagem, então, adquirida, irá para uma área do programa denominada *Gallery* (ou galeria).

#### 4. Comprovando o balanço de cores (opcional)

A verificação do balanceamento (ou não) das cores pode ser feita observando-se a própria imagem ou posicionando-se a lâmina em uma área vazia e observando-a no modo *Live* (conforme a figura 4.1, abaixo).

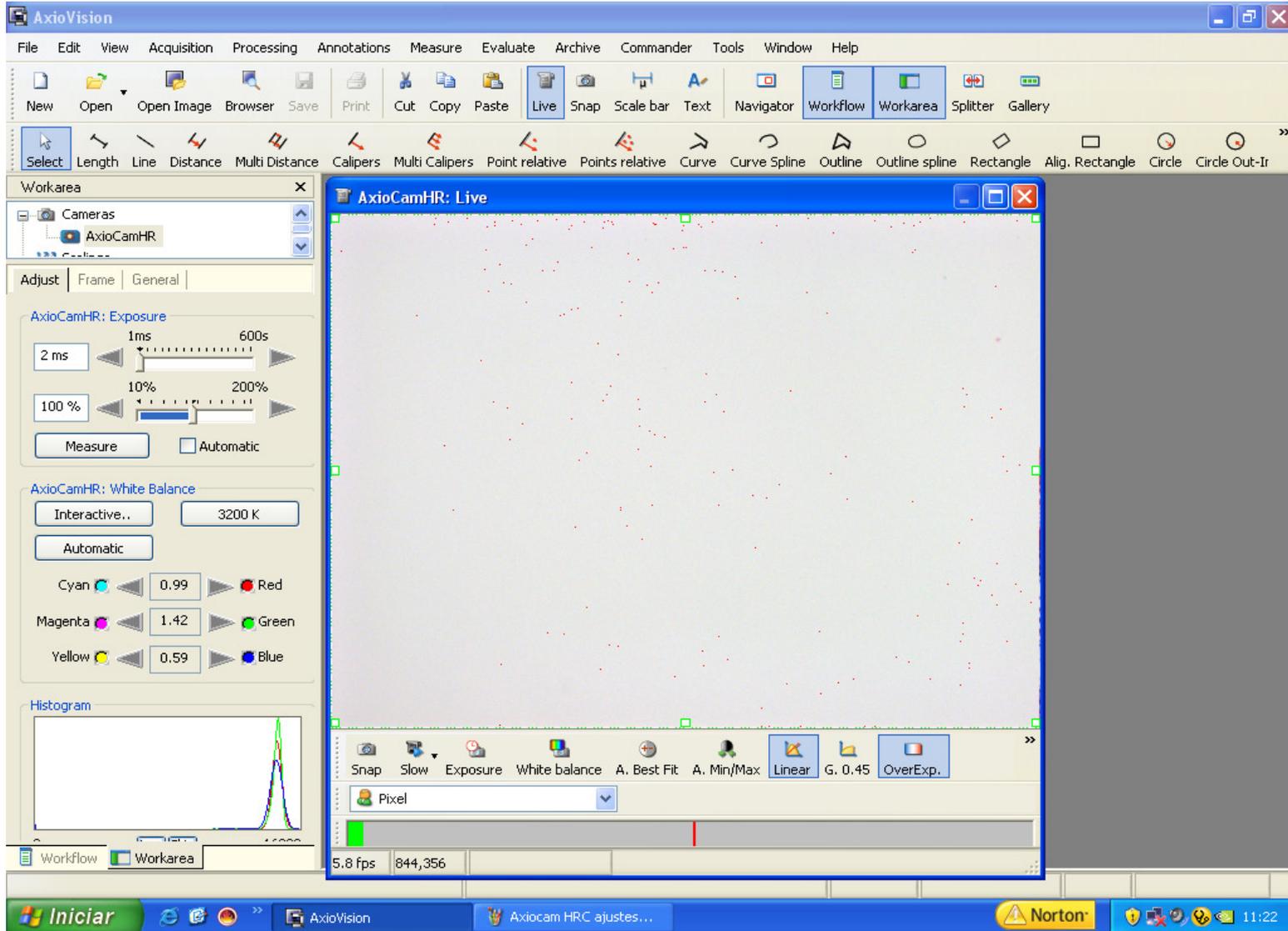


Figura 4.1 – White Balance, comprovando

O histograma, na parte inferior esquerda da figura acima, representa a imagem vista pela câmera em uma região da lâmina sem material (apenas com a iluminação). Nesta condição, a representação RGB (*Red*, *Green* e *Blue*, cores primárias que compõem a imagem colorida) apresenta picos sobrepostos: têm as cores, pois, a mesma intensidade - e por conseqüência o balanço de cores correto, sugerindo um branco coerente.

## 5. Imagem ao vivo - operação avançada

Analisando a linha inferior do histograma da figura abaixo, é possível verificar a profundidade de resolução de cores (em bits) presente na imagem. Os picos de cores, quando posicionados mais à esquerda, indicam menor intensidade de luz (ou baixa presença daquela cor na composição da imagem), o que **em tese** exigiria um aumento de intensidade luminosa via controle do microscópio.

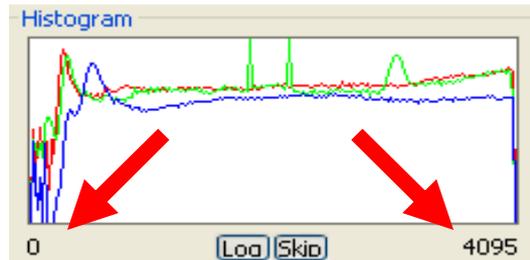


Figura 5.1 – Histograma

Entretanto, lembre-se das citações das páginas 7 e 8 (primeiro parágrafo): se a imagem estiver adequada quando vista pelo binóculo, a função clássica da câmera é emular o que os olhos vêem – o tempo de exposição obtido inicialmente (com o clique no botão *Measure*) provavelmente estará próximo dos 3ms e os ajustes devem limitar-se ao aumento (ou diminuição) gradual deste mesmo tempo (item *Camera*, aba *Adjust*, campo *Exposure*), conforme ilustrado na figura 5.2.



Figura 5.2 – Tempo de exposição, ajuste



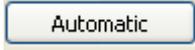
O botão **OverExp.**, presente na parte inferior da janela da imagem ao vivo, é uma função auxiliar em que a imagem ao vivo indica através da saturação, na cor vermelha, os pontos de excesso de luz. Poucos pontos vermelhos (como visto na figura 4.1) indicam que os picos de RGB estão na porção direita do histograma, ou seja, próximo à capacidade máxima de reprodução de cores da câmera - o que sugere iluminação e branco ideais para a tomada da fotografia.

A figura 5.3 apresenta outros comandos presentes na janela da imagem ao vivo, e posteriormente a descrição de suas funções.

**OBS:** a barra da figura abaixo, bem como todos os comandos da parte inferior da janela da imagem ao vivo, podem ser escondidos. Basta clicar com o botão direito sobre a imagem ao vivo e selecionar a opção *Live Tool Bar On/Off*. Recomenda-se não tomar tal ação.



Figura 5.3 – Comandos para a imagem ao vivo

- SNAP - captura a imagem apresentada ao vivo;
- SLOW - velocidade de atualização da câmera, alterável para *Medium* ou *Fast*. No modo *Slow*, a imagem ao vivo tem maior resolução, mas responde mais lentamente à movimentação do *Charriot*. De forma contrária, no modo *Fast* a imagem ao vivo apresenta menor resolução e maior velocidade de resposta a movimentos;
- EXPOSURE - tem a mesma função de , é apenas um atalho;
- WHITE BALANCE - tem a mesma função de , é apenas um atalho;
- BEST FIT, A. MIN/MAX, LINEAR e G. 0,45 - são ajustes parametrizados, sugeridos pelo software, que atuam no Brilho, Contraste e Gama da imagem ao vivo.

**OBS:** a função *Linear* deve ser inicialmente selecionada, pois representa a imagem sem qualquer ajuste digital (conforme citado no item 3, figura 3.4).

- OVEREXP. - indicador de excesso de luz;
- PROPERTIES - mostra as propriedades da imagem ao vivo. As funções pertencentes a este botão serão pormenorizadas à parte, no capítulo 7.

Abaixo desta barra de comandos, haverá o *listbox* de seleção da objetiva utilizada atualmente na obtenção da imagem, conforme citado no capítulo 3, figura 3.6.

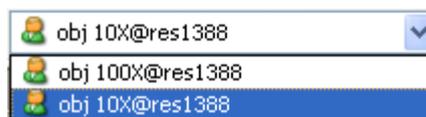


Figura 5.4 – Listbox de seleção de objetiva

Nesta lista aparecerão as objetivas instaladas no microscópio utilizado **desde que se tenha sido feita a calibração do mesmo**.

**OBS:** caso a aquisição da imagem tenha sido feita com a seleção de objetiva incorreta e a lâmina já tiver sido removida do microscópio, pode-se selecionar no item *Scalings* (localizado na *Workarea*, abaixo do item *Camera*, ou no menu *Measure*) a objetiva correspondente à utilizada na fotografia, pela lista de calibrações disponível, e posteriormente clicar no botão .

## 6. Imagem ao vivo e a Workarea

A barra de ferramentas denominada *Workarea* compreende três abas. Além da aba *Adjust*, já detalhada no capítulo 3 e responsável pelos comandos básicos para tratamento da imagem ao vivo, pode-se notar a presença de outras duas: *Frame* e *General*.

### 6.1 – Aba Frame

O primeiro campo da aba, denominado *Camera Mode*, permite comutar o modo de operação da câmera entre preto-e-branco (B/W) e colorido (RGB), além da resolução da própria câmera, conforme a ilustração 6.1.

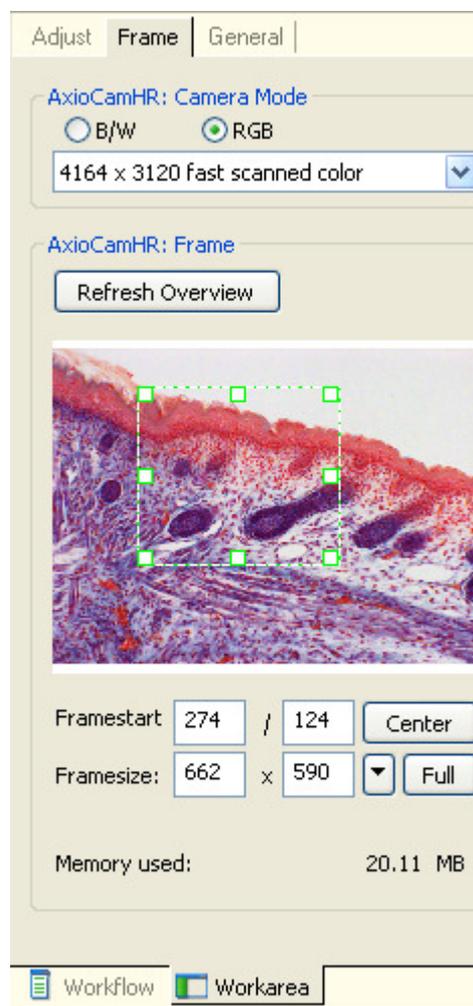
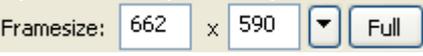


Figura 6.1 – Aba Frame, funções

A aba supra ilustrada mostra, a seguir, o campo *Frame*, desenvolvido para que se faça possível fotografar apenas uma determinada região da imagem ao vivo, determinada pelo usuário, como um recorte. Clicando-se no botão , a



imagem vista pela câmera é transferida para o campo e, a partir de então, define-se o tamanho do frame. O comando  disponibiliza tamanhos pré-determinados. O arraste do quadrante verde pontilhado em torno da imagem no campo permite o ajuste manual da área da imagem que será fotografada.

**OBS:** a imagem fotografada em recorte especial carrega a escala selecionada no *listbox* de objetivas da imagem ao vivo, solucionando casos em que o usuário não possui uma objetiva intermediária, deseja algum detalhe da imagem sem perder a escala de calibração e/ou deseja maior detalhamento de estrutura mesmo que a objetiva usada na fotografia seja a de maior magnificação presente no microscópio.

Logo após determinar a área desejada, basta clicar em .

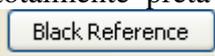
**OBS:** lembre-se de selecionar corretamente a objetiva correspondente à utilizada no momento. E depois de obter a fotografia, clique no botão  para garantir que a imagem ao vivo mostrada volte a ser a imagem integral vista pelo CCD da câmera.

## 6.2 – Aba General

Nesta aba encontram-se funções com baixa frequência de utilização, mais relacionadas à técnica de microscopia utilizada, dispositivos externos e microscópio no qual a câmera está instalada. Os campos ilustrados na figura 6.2 são descritos abaixo, na ordem em que são vistos.

- **DIGITAL GAIN** - voltado para o uso em Fluorescência. Instrui-se não alterá-lo para nenhuma das demais técnicas de microscopia. A alteração do fator de ganho da câmera aumenta a sua sensibilidade a sinais luminosos de baixa intensidade;

**OBS:** Para câmeras da linha IC, o campo *Digital Gain* é visto como *Analog Gain*, pois elas trabalham com ganhos em base logarítmica.

- **IMAGE ORIENTATION** - rotaciona ou espelha a imagem ao vivo. Utilizado quando se deseja casar os movimentos em X e Y do *charriot* à movimentação da imagem, dependendo, portanto, do posicionamento da câmera no microscópio e do próprio microscópio onde ela está instalada;
- **BLACK REFERENCE** - é o contrário do White Balance, pois ajusta o fundo da imagem para baixos níveis de iluminação (como na técnica de Fluorescência). O ajuste é feito somente uma vez, ou seja, suprime-se a necessidade de refazê-lo a cada imagem colhida. Basta obter uma imagem totalmente preta defronte à câmera (ou o mais escura possível) e clicar no botão .
- **SHADING CORRECTION** - comando utilizado quando se deseja uniformizar a iluminação e/ou corrigir defeitos persistentes de óptica. É utilizado para cada objetiva a ser colocada no caminho óptico. Para ajustar o  deve-se, pela ordem, focalizar a amostra desejada, retirar a lâmina do caminho de



observação e, então, clicar no botão. Ao término de uso desta função, deve-se desativá-la pela desmarcação do *checkbox*  Enable.

**OBS:** A caixa de lâmpada, o condensador e todo restante do conjunto óptico devem estar alinhados para que se minimize a necessidade de uso de correção digital via *Shading Correction*.

- SHUTTER - não utilizado em microscópios manuais e câmeras na condição regular de uso. Para estes equipamentos a alteração não surte quaisquer efeitos.

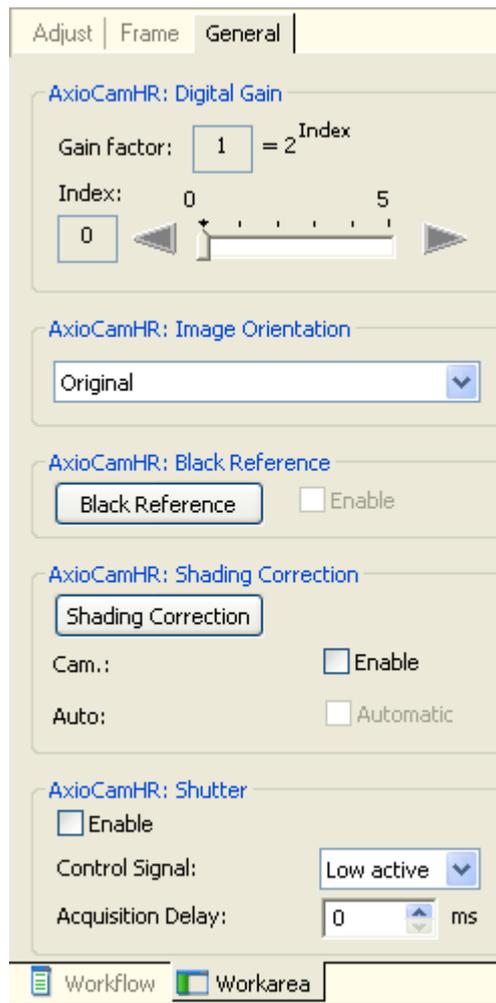


Figura 6.2 – Aba General, funções

## 7. Live properties

As propriedades de imagem ao vivo (ou *Live Properties*) têm o intuito de prover mais alguns ajustes antes de se obter a fotografia.

Há duas maneiras de acessar tais propriedades: pode-se clicar no botão *Properties* (parte inferior da tela do *Live*) ou pode-se posicionar o ponteiro do mouse sobre a imagem ao vivo, clicar com o botão direito e selecionar o item *Live Properties*.

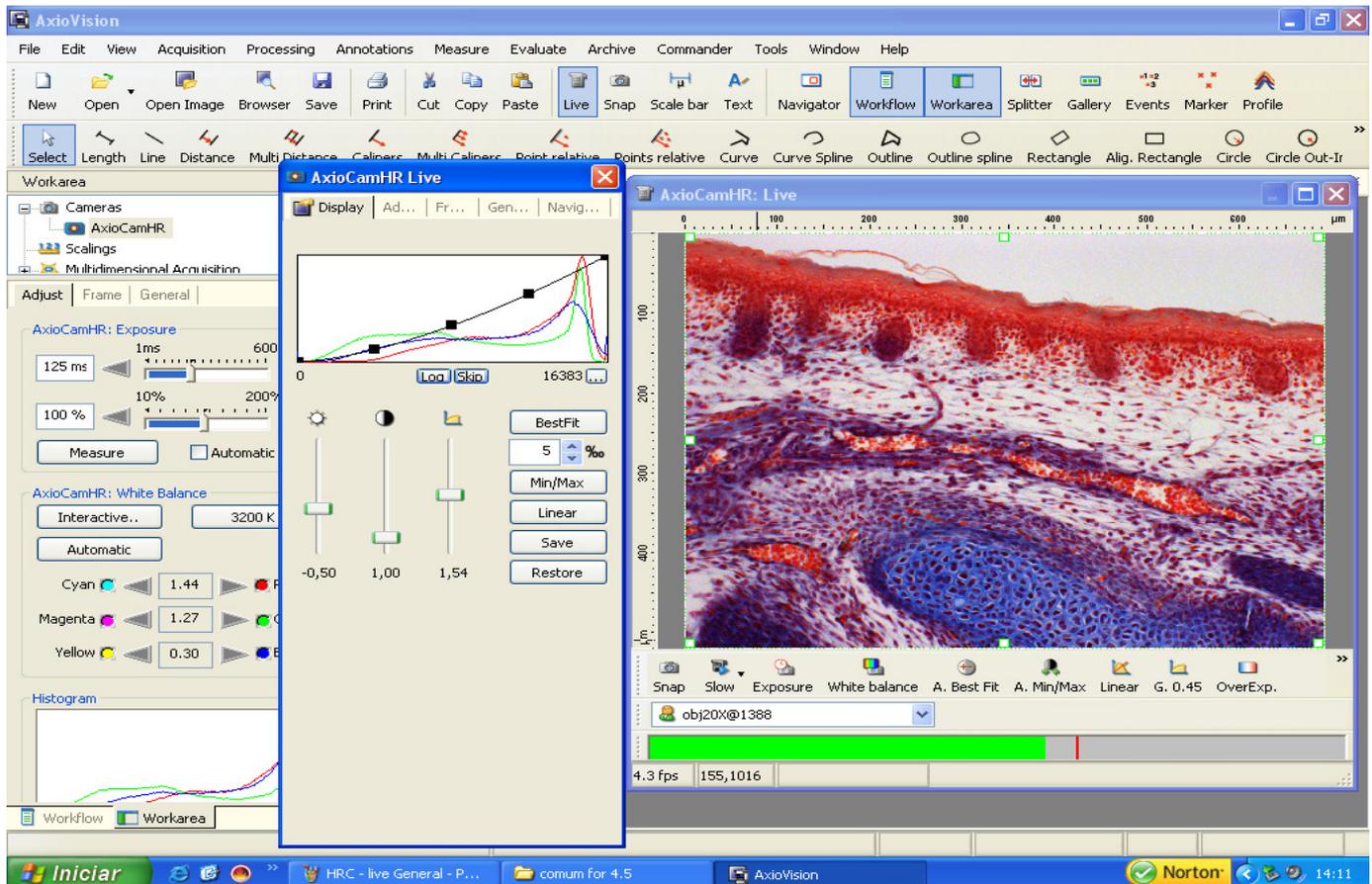


Figura 7.1 – Live properties

A janela *Live Properties* é composta por cinco abas: *Display*, *Adjust*, *Frame*, *General* e *Navigator*. Destas, apenas a primeira e a última serão pormenorizadas a seguir, levando-se em conta que as demais já foram descritas nos capítulos 3 e 6.

### 7.1 – Aba Display

Na aba *Display* apresenta-se o histograma, coincidente ao da aba *Adjust*, mas com uma ‘curva de aproveitamento de cores’ cuja intenção direta é permitir que o usuário altere os ajustes de Brilho, Contraste e Gama da imagem pela movimentação dos cursores deslizantes de cada função ou arrastando um dos 5 pontos presentes na curva (linha negra) sobre o histograma de cores.

**OBS:** as funções localizadas à direita dos cursores correspondem aos botões no rodapé da imagem ao vivo apresentados no item 5, figura 5.3. Entretanto, a seleção dos mesmos nesta aba é a única maneira de se visualizar diretamente a alteração do histograma quando da aplicação de melhorias na imagem.

Caso o usuário deseje somente fotografar sem fazer qualquer alteração na imagem, ou seja, somente na condição *Linear*, é possível utilizar estas mesmas funções de ajuste de display **após** a aquisição da imagem. Basta clicar com o botão direito sobre a foto adquirida e selecionar o item *Properties*.

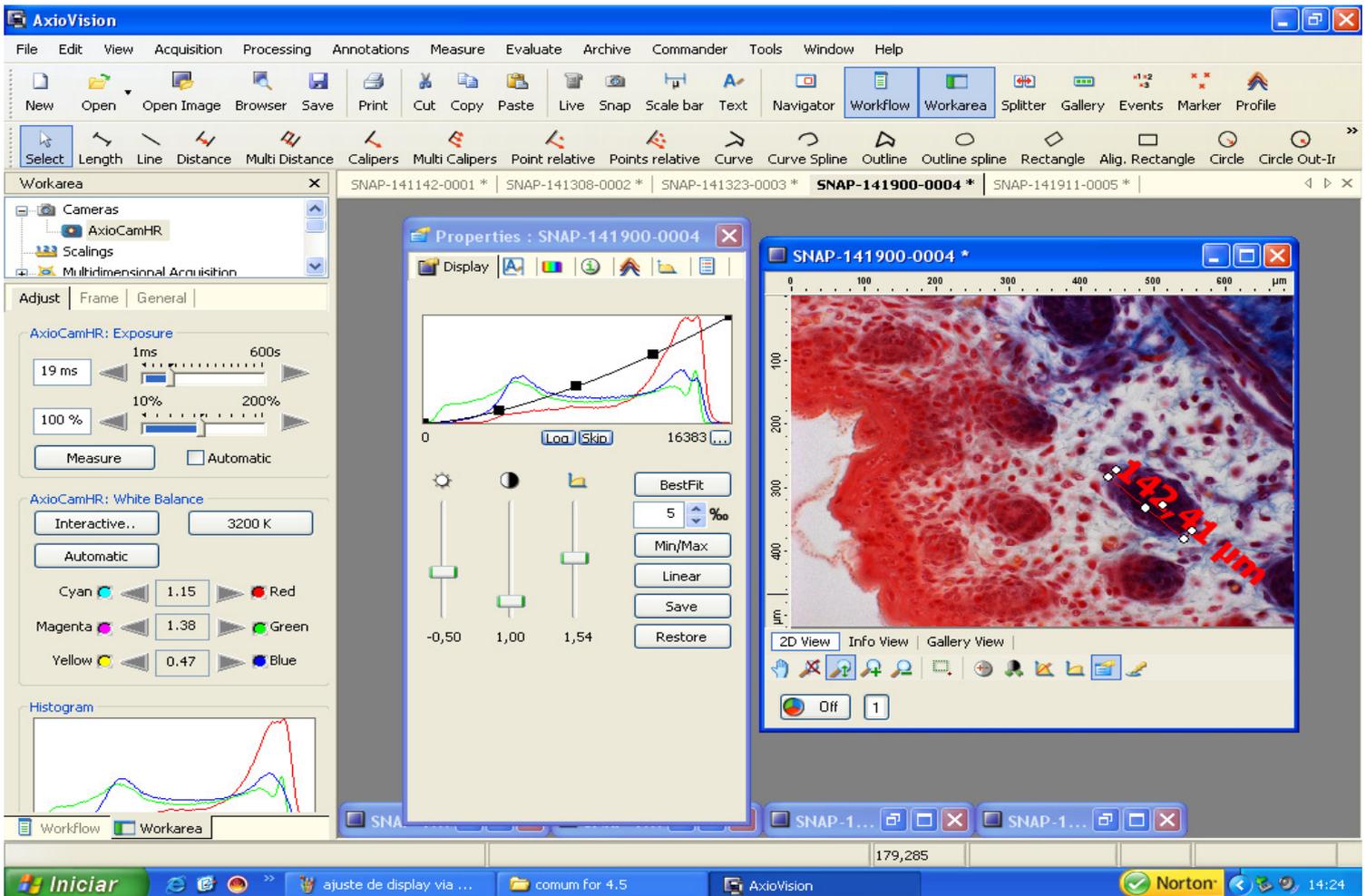


Figura 7.2 – Histograma da imagem capturada

Ao término do ajuste e conseqüente tomada de fotografia, deve-se clicar no botão  para que a próxima imagem não seja adquirida com ajustes da imagem anterior.

**OBS:** todo o ajuste de cor feito nesta aba, sobre uma imagem, é carregado como uma propriedade desta imagem (o *Display Mapping*), sendo possível então transferir o ajuste de uma foto já tirada a uma imagem ao vivo e vice-versa, através do uso adequado dos botões *Save* e *Restore* presentes na parte inferior direita da aba.

Qualquer imagem aberta na galeria do AxioVision, inclusive oriunda de outros softwares, pode receber tratamento de cores via histograma.

## 7.2 – Aba Navigator

A aba *Navigator* apresenta sob seu controle apenas um campo, no qual a imagem ao vivo é mostrada, com um contorno em vermelho.

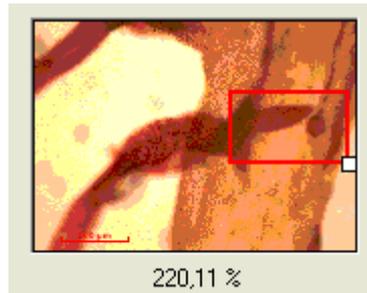


Figura 7.3 – Navigator, ao vivo

O ponto branco visto no canto inferior direito do contorno é passível de arraste e permite a redução do campo visual, ação que corresponde a um zoom na imagem ao vivo.

Posicionando-se o ponteiro do mouse dentro deste contorno, é possível clicar e arrastá-lo, o que leva à modificação da região em zoom.

Esta ferramenta é útil para o estudo ao vivo, por exemplo, de padrões de movimentação de organismos presentes em meios líquidos ou de observação de cultura celular.

**OBS:** após o uso do *Navigator*, recomenda-se o retorno ao padrão de zoom original. Para isso, clique com o botão direito sobre a imagem ao vivo e selecione a opção *Auto Zoom*.

## 8. A fotografia foi obtida. O que fazer ?

Sobre uma fotografia tirada no AV ou importada de outra fonte, o usuário tem a possibilidade de:

- inserir medidas (menu *Measure*) e anotações (menu *Annotation*);
- produzir “fotos de fotos”, ou seja, criar novas imagens a partir do recorte de imagens preexistentes (comando *ROI*);
- realizar novos ajustes de reprodução de cores (*Properties* ou menu *Processing*);
- salvar a imagem em diversos formatos (menu *File*, opção *Save As*).

Para o AxioVision licenciado, oferecem-se ferramentas adicionais, tais como:

- pranchas (função *Splitter*);
- relatórios (*.zvr Reports*);
- retículo (função *Live Grid*);
- ferramentas adicionais para medidas (de 11 a 23, contra 3 da versão LE).

Caso tenha sido adquirido ou se possua um equipamento da Carl Zeiss com algum nível de codificação e/ou motorização, o AV licenciado pode ser utilizado para liberar o monitoramento/controlado dos dispositivos eletrônicos do microscópio via software.

Antes de qualquer inserção de medidas sobre a imagem, deve-se aplicar nesta a escala correspondente à objetiva utilizada. A escala, por sua vez, advém de uma calibração prévia do conjunto software-microscópio mediante a obtenção de imagens de referência de lâminas milimétricas ou micrométricas (*part numbers* Zeiss 474025, 474026, 474027 ou 474029). O tópico referente a calibrações e aplicação de escalas será tratado no Anexo 4 desta apostila.

Para aplicar uma escala de referência na imagem, basta selecionar o botão



(na parte superior central da tela ou no menu *Annotation*), posicionar o ponteiro do mouse sobre a imagem, clicar uma vez com o botão esquerdo, mover o ponteiro horizontal ou verticalmente até o tamanho desejado e clicar novamente com o botão esquerdo. Vê-se um exemplo na figura 8.1, a seguir.

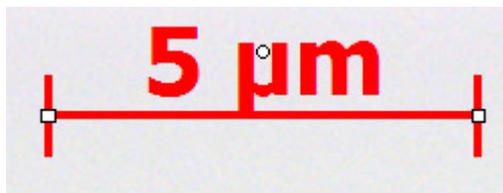


Figura 8.1 – Scale Bar, exemplo

Ao lado do botão *Scale Bar* e igualmente presente no menu *Annotation*, o botão *Text* habilita o usuário a inserir texto sobre a imagem. Selecione-o, abra uma caixa imaginária sobre a imagem e solte o clique do mouse. Após, basta escrever o texto desejado.

As abas **2D View** | Info View | Gallery View, vistas no canto inferior esquerdo da imagem adquirida, permitem inserção de informações gerais (como por exemplo, em que condição foi adquirida a foto) e visualização de imagens (quando em lote) sob outra perspectiva.

Clicando-se no item *Info View*, abre-se a tela mostrada na figura 8.2.

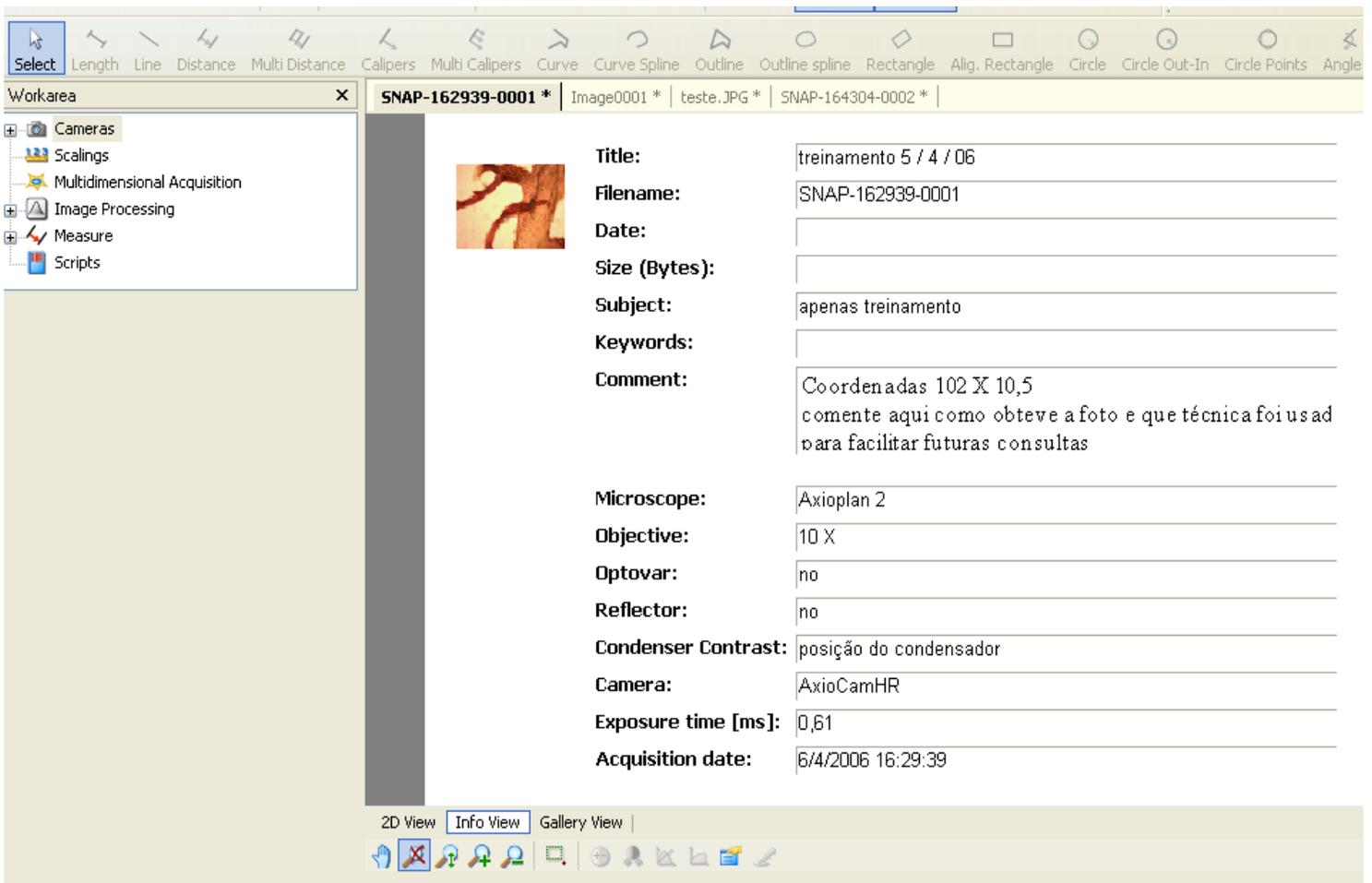


Figura 8.2 – Info View

**OBS:** Quando o microscópio é motorizado e/ou codificado, está conectado à CPU via cabo de comunicação (USB ou RS232) e é aliado à licença do AV com as configurações adequadas, as informações contidas no *Info View* são recebidas diretamente do equipamento.

## 8.1 – Ferramentas de medição

O AxiVision pode possuir entre 3 e 23 ferramentas de medição, dependendo do nível de licenciamento do software. Algumas delas podem ser vistas no exemplo a seguir, na figura 8.3.



Figura 8.3 – Ferramentas de medição, em barra

Nenhuma das ferramentas exige cliques com retenção – geralmente a fixação das mesmas sobre as imagens é feita por cliques simples, nas regiões de interesse, seguidos de um clique com o botão direito para encerramento.

Todas as ferramentas disponíveis, após serem inseridas sobre a fotografia, geram dados relevantes para uso estatístico: os valores de medidas podem ser transportados para softwares de planilha (como o *MSEExcel*) antes ou após customização dos dados que cada ferramenta entrega na saída.

O acesso às ferramentas normalmente é feito através do menu *Measure*, mas a barra representada na figura 8.3 pode ser colocada, como atalho, junto às demais barras abertas (exceto na versão LE).

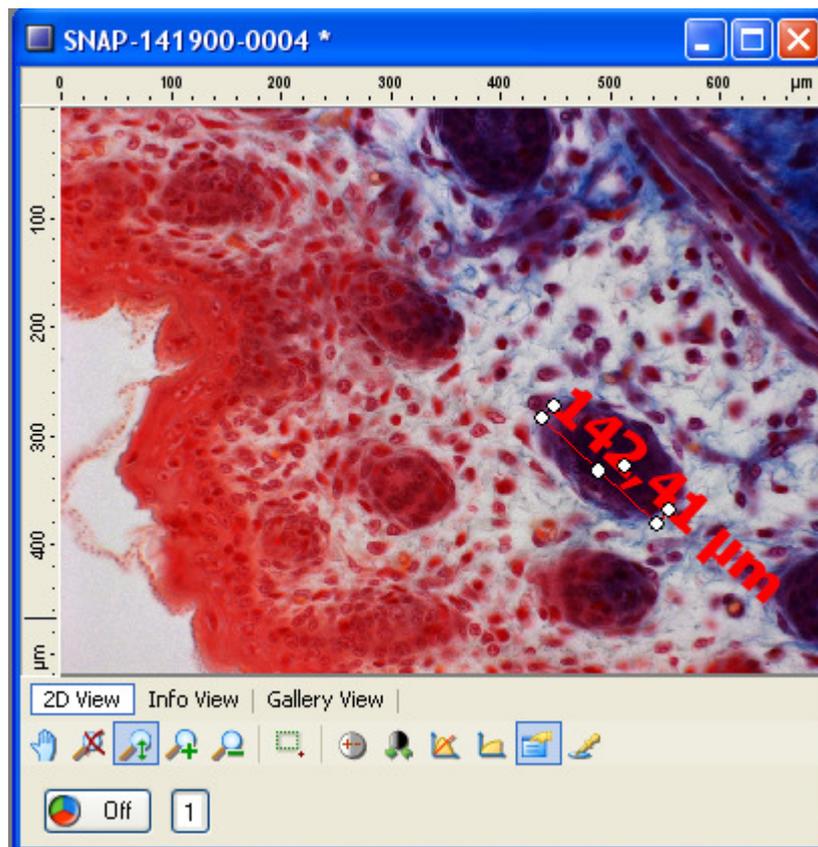
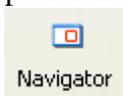


Figura 8.4 – Length tool sobre fotografia

Quaisquer das medidas/anotações colocadas sobre uma imagem podem ser editadas em relação à cor, fonte, linha, delimitadores e posição. Os pontos brancos vistos sobre a ferramenta *Length*, acima, são os pontos de relevância para edição: posicionando o ponteiro do mouse sobre um dos mesmos, pode-se aumentar ou diminuir a dimensão medida através de clique com o botão esquerdo, retenção e arraste para a nova posição desejada. Um clique simples sobre a linha habilita os pontos brancos. Um clique com retenção sobre a mesma linha permite o arraste completo da medição ou anotação.

Caso se esteja buscando uma medição precisa, pode-se proceder com o refino do posicionamento e/ou tamanho da medição previamente efetuada usando-se a ferramenta



(ao lado do botão *Workarea*, na seção superior central da tela, conforme

indicado na figura 8.5). O *zoom* dinamicamente ajustável/posicionável, proporcionado pelo *Navigator*, funciona da mesma maneira que o *zoom* da imagem ao vivo. Entretanto, neste caso, o objetivo é enquadrar uma região medida para reposicionamento dos pontos-limite – os pontos brancos - da ferramenta ali usada. Após o refino basta voltar a imagem ao tamanho natural clicando-se com o botão direito sobre a fotografia e selecionando-se a opção *Auto Zoom*.

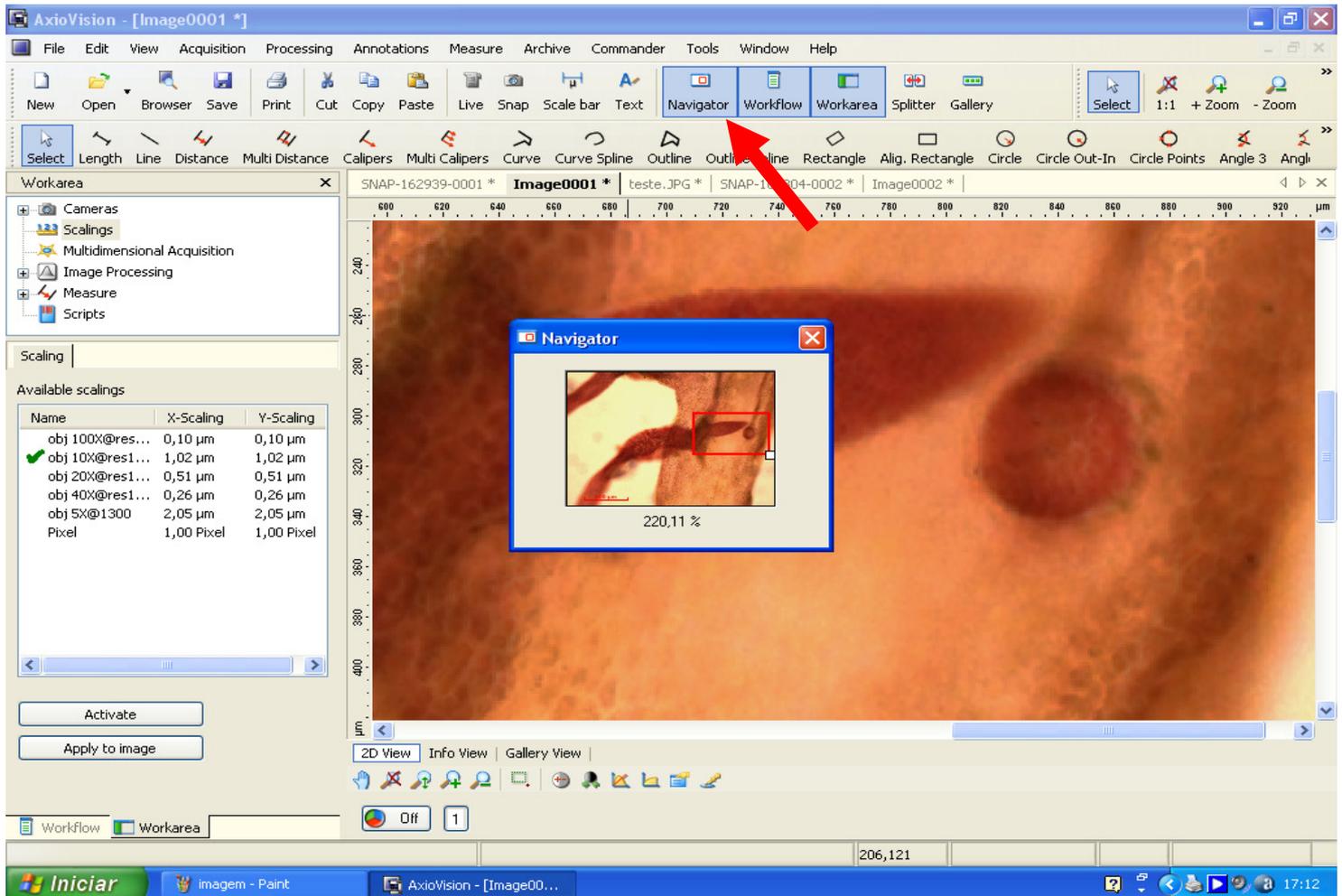


Figura 8.5 – Navigator, imagem obtida

## 8.2 – Edição de atributos

As medidas e anotações inseridas sobre as fotografias, também conhecidas como atributos, podem ser editadas em relação às suas cores, fontes e linhas conforme citado no subcapítulo anterior.

Para alterar atributos inseridos na foto, posicione o ponteiro do mouse sobre a mesma e clique com o botão direito do mouse. Selecione o item *Properties* (ou acesse-o diretamente clicando no botão correspondente à função, na parte inferior da fotografia, indicado pela seta vermelha) e, por fim, a segunda aba disponível, denominada *Attributes* (conforme figura 8.6).

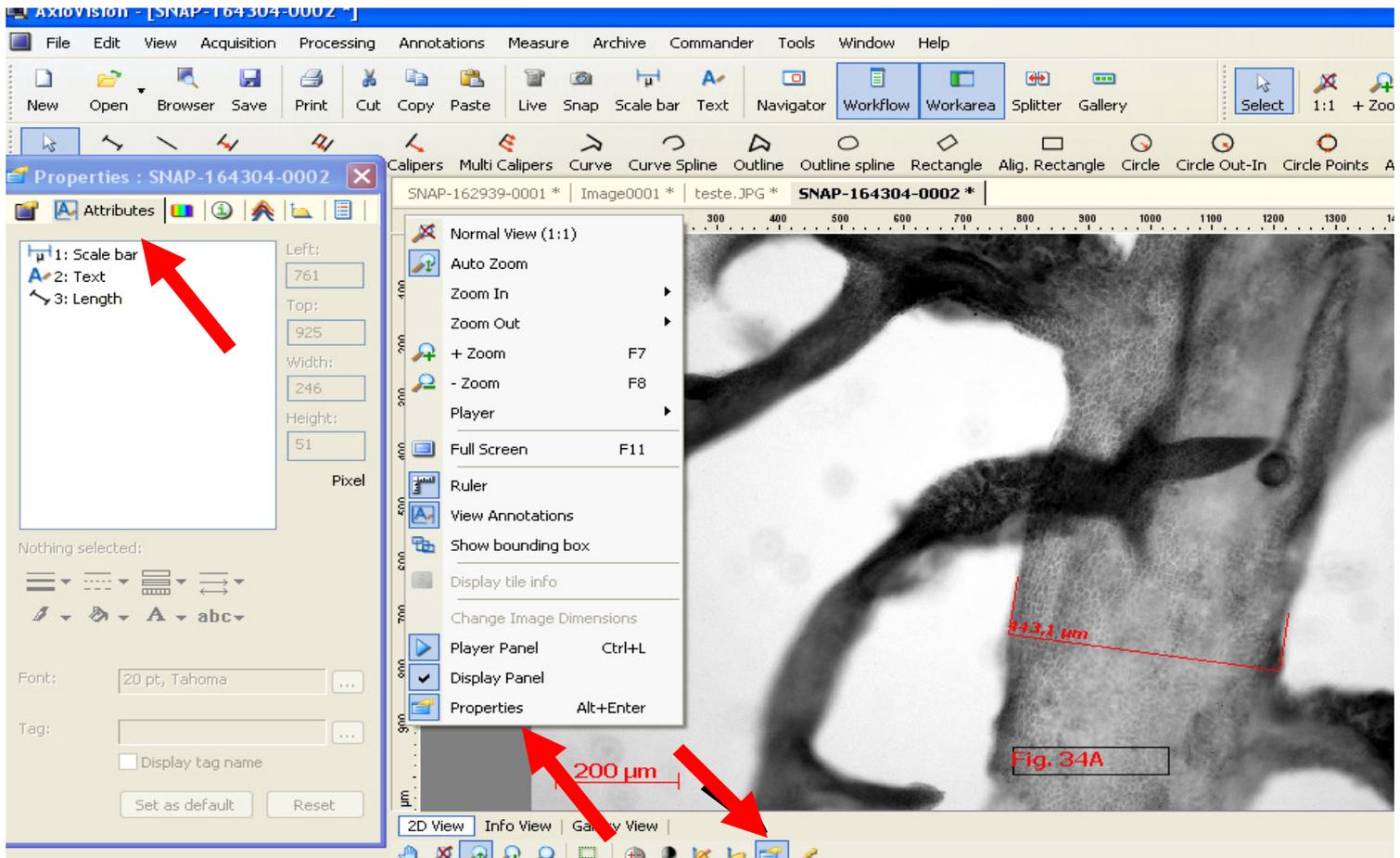


Figura 8.6 – Atributos, edição

Cada item da lista de atributos corresponde a uma anotação ou medição sobreposta à imagem. A seleção de qualquer um dos itens (ou um clique sobre a linha de qualquer dos atributos na foto) habilita a edição total do mesmo pelas ferramentas dispostas na parte inferior da mesma lista. A aplicação da alteração, quando feita, é imediata.

### 8.3 – Resultados das medições e geração de tabela

A tabela a seguir representada é obtida em função das medições realizadas e seu acesso dá-se pela última aba da janela aberta (denominada *Measurement*), no mesmo item *Properties*.

Nela, é possível visualizar todos os valores de medição inseridos sobre uma foto, tais como densidade de cor, perímetro, altura média, largura média, raio, distância, área e contagem de eventos, entre outros.

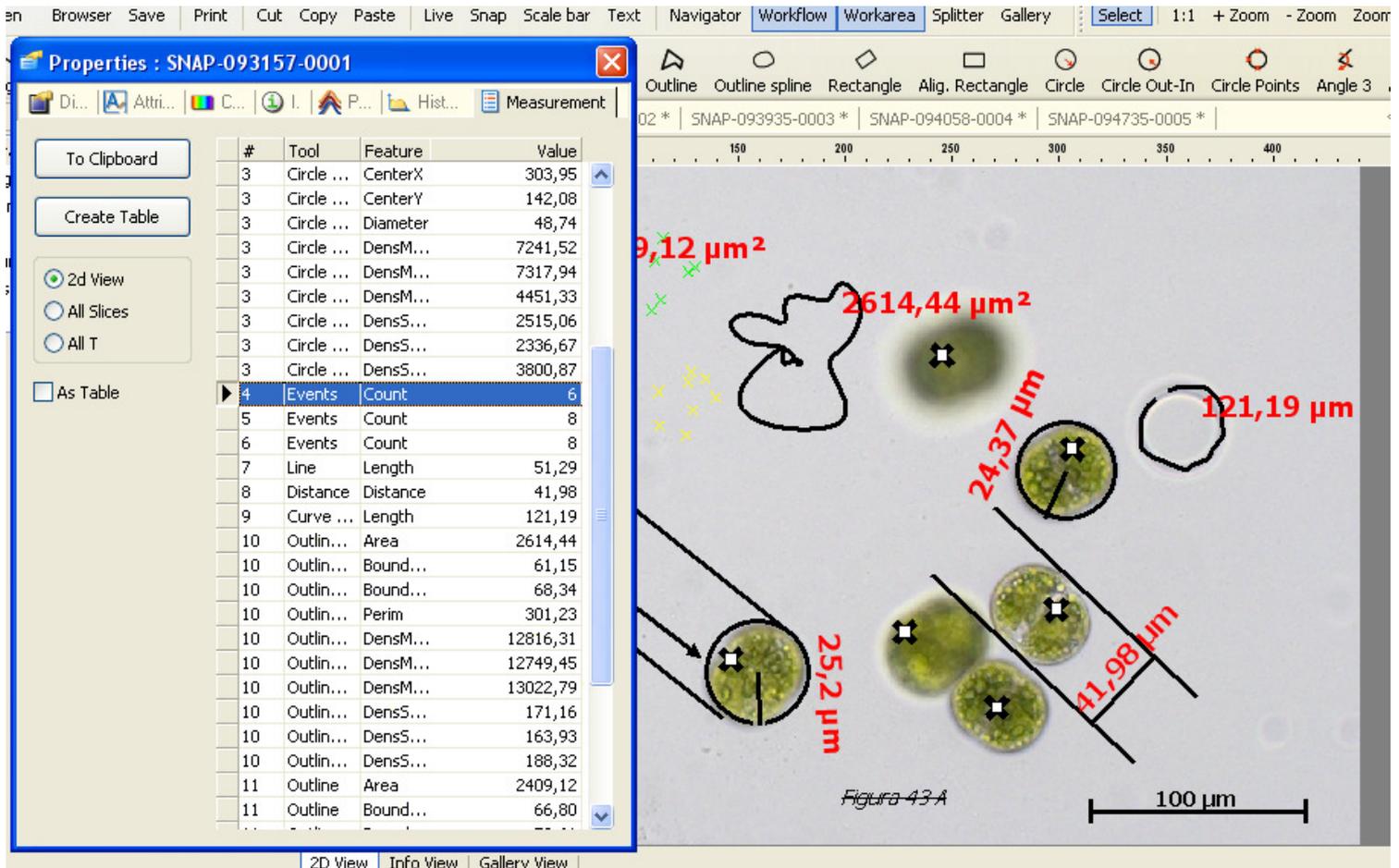
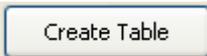


Figura 8.7 – Tabela de medidas

**OBS:** Caso a escolha da calibração (conforme descrito no capítulo 5) da imagem obtida estiver incorreta, é possível ‘forçar’ a escala correta selecionando-se, no item  **Scalings**, presente no menu *Workarea*, a objetiva correta e confirmando-a com o botão *Apply to Image*.

Clicando-se no comando , os dados da tabela são copiados para a área de transferência do Windows. Basta, então, abrir qualquer software de processamento de planilhas e colar estes dados pelo atalho *CTRL+V* ou pelo botão *Paste*.

Caso o computador utilizado não tenha qualquer software do gênero e pretenda-se realizar o tratamento estatístico em outro equipamento, pode-se usar a opção  para gerar a planilha na própria galeria do *Axiovision*, salvando-a, depois, no formato *CSV* (ou *Comma Separated Values*). Tal formato é facilmente interpretado por editores de planilha (como o *MSEXcel*).

#### 8.4 – ROI (Region of Interest)

O comando *ROI* permite a produção de novas fotos através do corte de fotos preexistentes.

Para que se possa obter a “foto da foto”, deve-se clicar no botão *ROI*, selecionar a área desejada e em seguida clicar no botão *Copy ROI*.

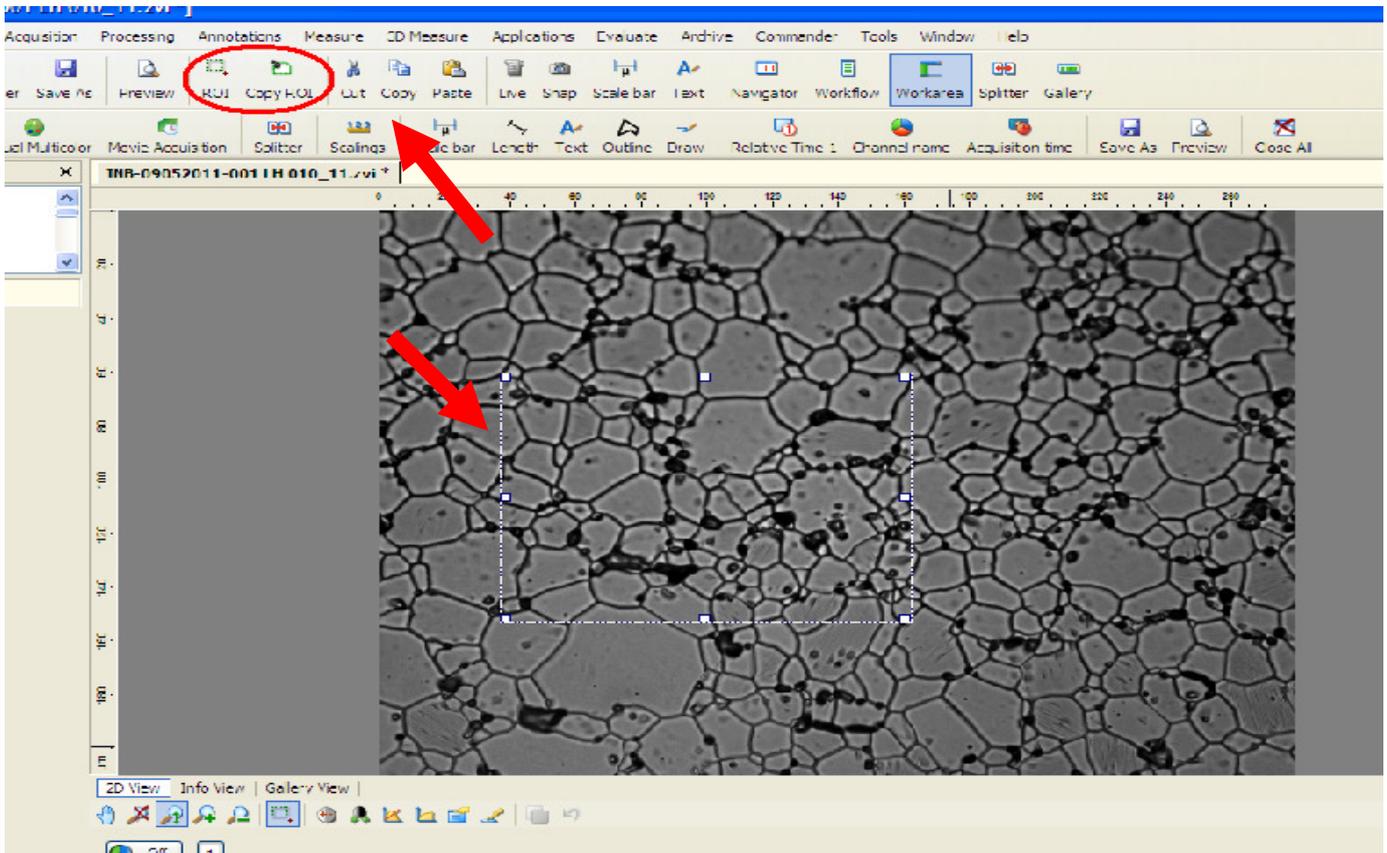


Figura 8.8 – Comando ROI

Neste momento, a área selecionada está confiscada. A reprodução da mesma na galeria do *AxioVision*, como uma nova fotografia, é feita pelo atalho *CTRL+V* ou pelo botão *Paste*.

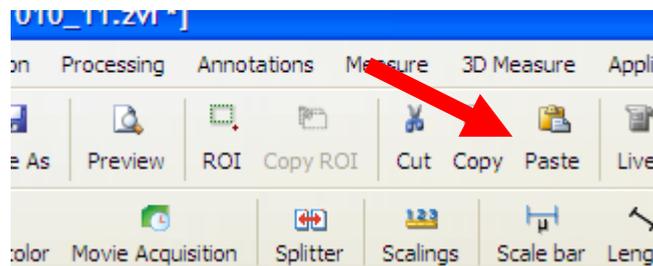


Figura 8.9 – Botão Paste, para reproduzir ROI

## 8.5 – Prancha (Splitter)

As ferramentas de produção de prancha e relatório podem ser úteis aos pesquisadores que pretendem comparar detalhes de uma estrutura microscópica em função de posição, tempo e canais, emitir laudos, padronizar relatórios para um setor, entre outros.

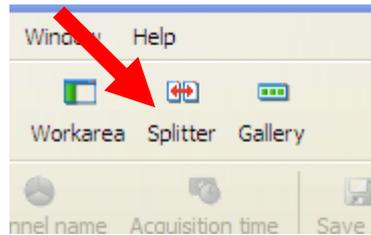


Figura 8.10 – Botão Splitter

O botão *Splitter* dá acesso ao utilitário de preparação de pranchas, sendo possível elaborar páginas contendo de 2 a 12 fotos.

**OBS:** toda foto que se pretende inserir na prancha deve estar aberta na Galeria do *AxioVision*, ou seja, não pode ser trazida diretamente de um arquivo.

As imagens que compõem a prancha podem ter as configurações definidas em conjunto ou individualmente, marcando ou desmarcando-se o *checkbox*  Synchronize presente no canto inferior esquerdo da janela. A configuração da área de *zoom* das imagens pelo comando  também é regida por este *checkbox*.

Antes de se criar a prancha, é interessante definir o espaçamento entre as fotos através do botão  no canto superior direito da janela. Em seguida, clique no botão .

**OBS:** a prancha produzida aparece na Galeria e é tratada como uma foto.

## 8.6 – Relatório (Report.zvr)

Como a função *Splitter* permite apenas um posicionamento padronizado das imagens em uma página, a função *Reports* é vista como um complemento àquela função (por permitir a colocação de foto sobre foto, por exemplo).

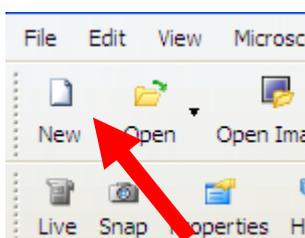


Figura 8.11a – Botão New

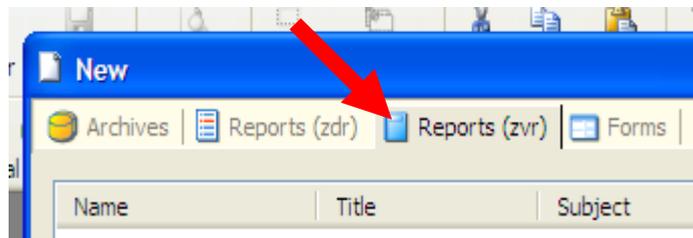


Figura 8.11b – Aba Reports (zvr)

A lista de relatórios disponíveis contém 21 layouts diferentes sugeridos pelo *AxioVision* – e todos são passíveis de diagramação e edição de acordo com as preferências do usuário.

A função *Reports* é disponibilizada apenas para as versões licenciadas do *AxioVision*.

**OBS:** como alguns dos relatórios aplicam cabeçalho com dados do estabelecimento, pode ser importante informar os tais dados previamente ao software, mediante ao preenchimento dos campos presentes no menu *Tools – Options – ID*.

Para que se possa editar o relatório escolhido após abri-lo, clique com o botão direito do mouse sobre o mesmo e selecione a opção *Design Mode*.

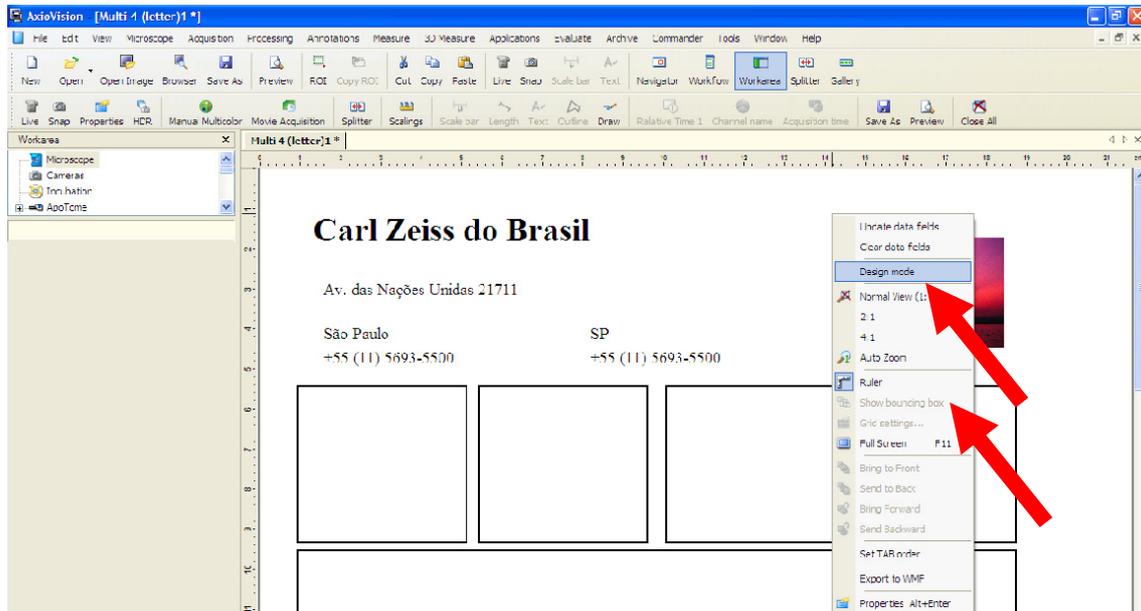


Figura 8.12 – Design mode e Show bounding box

Em seguida, como sugestão, clique novamente com o botão direito sobre o relatório e selecione a opção *Show Bounding Box* – serão exibidos os contornos de todas as caixas editáveis do relatório.

Para inserir uma foto em uma das caixas, clique no botão  e arraste a foto de preferência de maneira direta.

Todas as caixas dos relatórios podem ser customizadas quanto à fonte, cor, contorno e alinhamento através da opção  *Properties Alt+Enter*, apresentada pelo clique do botão direito do mouse. Os comandos de customização são semelhantes aos vistos na figura 8.6.

## Carl Zeiss do Brasil

Av. das Nações Unidas 21711

São Paulo

+55 (11) 5693-5500

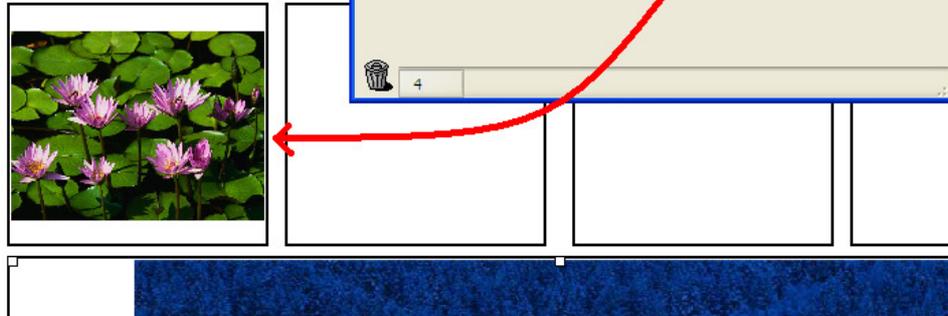


Figura 8.13 – Drag & Drop de imagem da Galeria

Os modos de salvamento de relatórios serão citados no capítulo 9, imediatamente a seguir.

## 9. Salvando fotos ou arquivos

Ao contrário das expectativas iniciais de todo usuário do *AxioVision*, as fotos obtidas a partir da imagem ao vivo ou arquivos elaborados (como relatórios) não são automaticamente salvos – o usuário tem a responsabilidade de determinar o que será aproveitado ou descartado (e também programar o salvamento automático, se assim lhe convier).

Por configuração padrão, o *AxioVision* armazena as imagens em uma área de transição denominada Galeria (ou *Gallery*, com botão de atalho presente na barra de ferramentas, localizado na parte superior central da tela do programa). A Galeria, fisicamente, corresponde à memória RAM do computador no qual o programa roda.

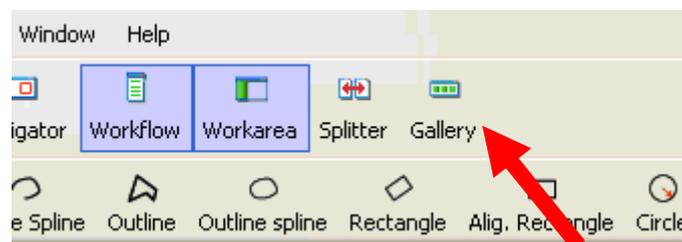


Figura 9.1 – Galeria, acesso

Dessa maneira, é recomendável o uso de *no-break* para a alimentação da CPU, a fim de se evitar que quedas de energia causem perda de material já obtido. Também por esse motivo, deve-se sempre respeitar as configurações mínimas exigidas pela Carl Zeiss, quando adquirindo o computador em que ficarão baseados o software e componentes de hardware do microscópio.

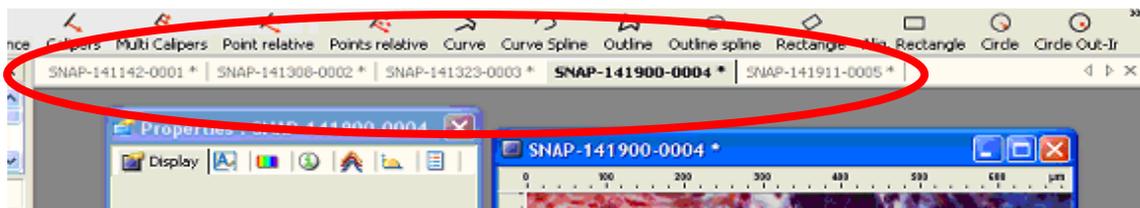


Figura 9.2 – Fotos na RAM, não salvas

Na ilustração acima, pode-se notar cinco abas, assim explicadas:

- cada aba corresponde a uma foto/arquivo;
- a quantidade de “abas” suportadas está ligada à capacidade de memória RAM;
- o asterisco à frente de cada prefixo significa que o material não está salvo;
- a aba em negrito indica que a foto está em primeiro plano na tela.

A maneira trivial de se salvar dados é, após colocá-los em primeiro plano, acessar o menu *File - Save As*. Entretanto, outras maneiras de se salvar imagens ou arquivos fazem-se disponíveis conforme ilustração da figura 9.3.

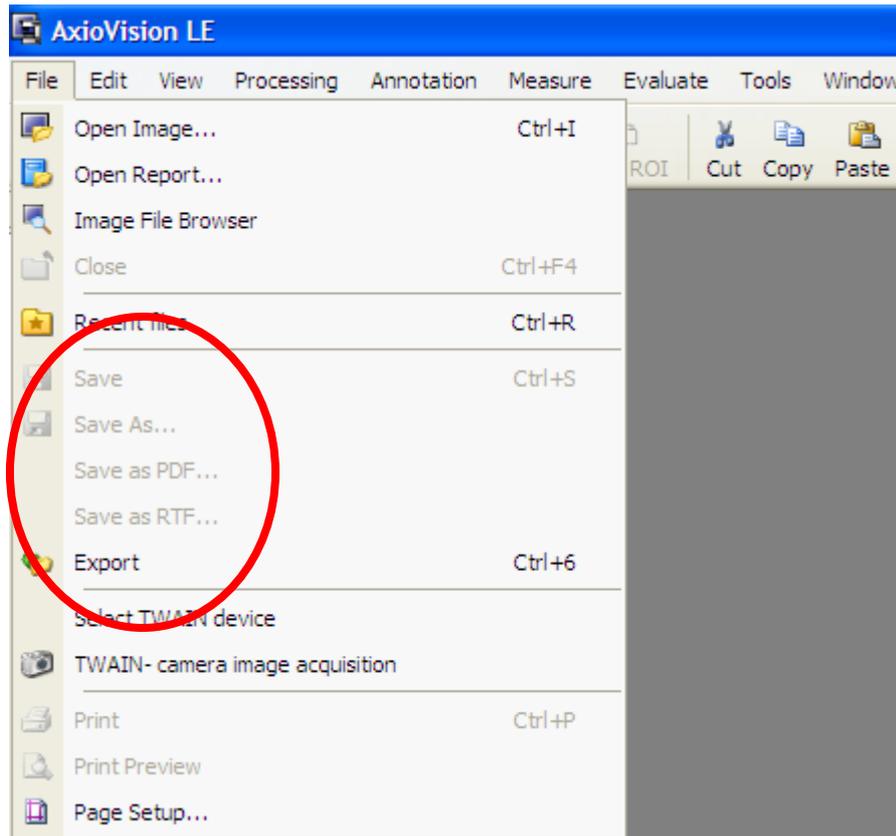


Figura 9.3 – Menu File e submenus de salvamento

- SAVE – salva em formato pré-configurado no programa (geralmente o formato *.zvi* é o padrão) ou salva alteração em material aberto para edição, no mesmo formato em que havia sido salvo anteriormente;
- SAVE AS – abre a janela simplificada de seleção de formatos de salvamento;
- SAVE AS PDF – salva em formato *.pdf*, interpretável pelo software Adobe Acrobat;
- SAVE AS RTF – salva em formato *.rtf*, interpretável pelos softwares Microsoft Word e Wordpad;
- EXPORT – abre a janela avançada de seleção de formatos de salvamento.

Acessando-se o menu *Save As*, as quatro primeiras opções de salvamento de imagens disponíveis e mostradas na ilustração da figura 9.4 são:

- ZVI – formato proprietário Zeiss, só abre no **AxioVision**;
- TIF – formato mais largamente suportado entre diferentes plataformas de computadores (Macintosh, Windows, Unix) e que suporta fotos de até 48 bits;
- BMP – formato cujo tamanho de foto salva equivale ao formato *.zvi*, mas cuja foto salva não perde qualidade;
- JPG – formato usado para salvar fotos sob técnica de compressão digital, de 8 a 10 vezes menor que o tamanho original no formato *.zvi*, mas com perda de qualidade final.

Após a customização total de um relatório, pode-se tomá-lo como padrão do setor onde foi produzido: basta acessar o menu *File – Save As* e salvá-lo no formato

.zvr. Para envio a terceiros que não possuem o *AxioVision*, os formatos *.pdf* e *.rtf* são os disponíveis, conforme a figura 9.3.

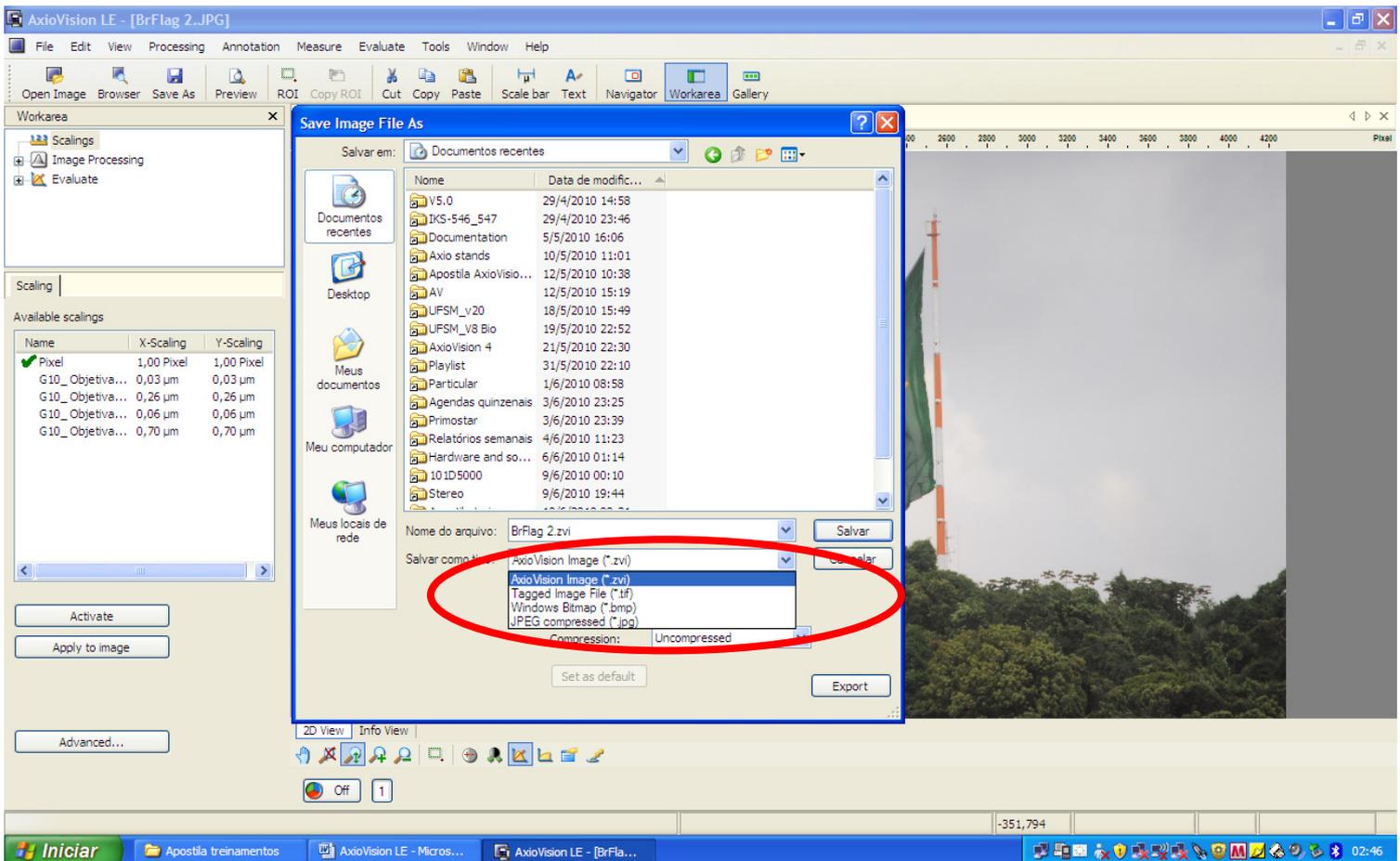


Figura 9.4 – Save As

Para quaisquer dos formatos escolhidos para salvamento de foto (excetuando-se o *.zvi*), faz-se necessário optar por características que acompanharão a foto como parte integrante da mesma, conforme ilustração abaixo.

O formato *.zvi*, apesar de ser interpretado somente pelo *AxioVision*, é de suma importância por ser o único que permite edição e controle completos da foto mesmo após a mesma ter sido salva.

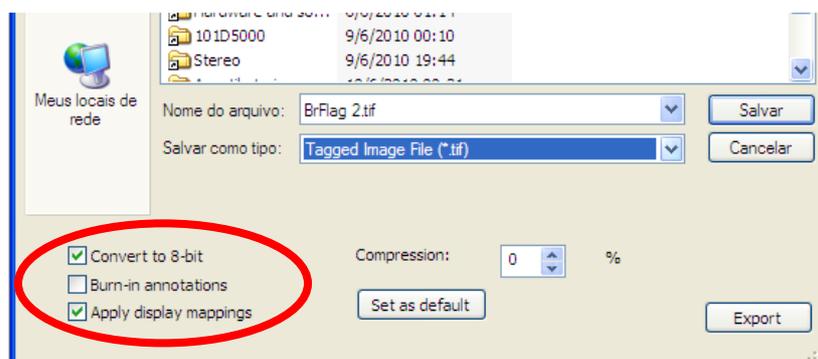


Figura 9.5 – Salvando em formato não-ZVI

Os *checkboxes* destacados, quando marcados, alteram as seguintes características da fotografia que será salva:

- CONVERT TO 8-BIT – aparece somente no formato TIF. Usado para reduzir a profundidade de resolução da foto no momento do salvamento e assim permitir sua posterior leitura por quaisquer softwares que interpretem este formato;

**OBS:** Alguns programas antigos não conseguem interpretar arquivos em formato TIF de alta resolução e podem apresentar erro na tentativa de abertura do arquivo (formato de arquivo não suportado). Por isso, a conversão para 8-bit.

- BURN-IN ANNOTATIONS – queima sobre a foto quaisquer anotações colocadas sobre. Ou seja, após o salvamento, tal queima transforma tais anotações em parte integrante da imagem;

**OBS:** fotos adquiridas em preto-e-branco apresentarão medidas igualmente queimadas em preto-e-branco, mesmo que estas tenham sido apresentadas com cores quando inseridas na foto.

- APPLY DISPLAY MAPPINGS – mantém ou retira as alterações de características da imagem, tais como brilho, contraste, gama e ganho digital.

**OBS:** recomenda-se não desmarcar esta opção, exceto se as alterações feitas na representação das cores na tela tiverem caráter apenas experimental e se por fim desejar-se salvar a foto sem tratamentos digitais.

Se for preferível salvar a foto em algum outro formato que não seja um dos quatro apresentados na figura 9.4, pode-se acessar o submenu *Export*, ilustrado na figura 9.6.

Os *checkboxes* indicados pela letra **A** são referentes ao controle de salvamento de imagens obtidas por meio dos módulos *Multichannel* e *Fluorescence Lite*, usados basicamente em fluorescência ou para mixagem de técnicas de microscopia. Quando usando o *AxioVision LE*, estes *checkboxes* devem ser desmarcados.

O *checkbox* indicado pela letra **B**, denominado *Gray scale*, quando marcado, salva a foto em preto-e-branco (sem levar em conta se a mesma é colorida ou não). Neste caso, qualquer foto colorida advinda de qualquer outro programa também pode ser transformada em uma foto em preto-e-branco sob o uso adequado desta ferramenta.

A região circulada mostra os demais formatos disponibilizados pelo *AxioVision* para salvamento. Destacam-se então os formatos *.psd* (Adobe Photoshop), *.pct* (Macintosh QuickDraw) e *.png* (semelhante ao *.tif*, sem perda de qualidade).

**OBS:** Quando uma imagem é salva em formato não *.zvi*, gera-se um arquivo, na mesma pasta a que foi direcionada, com o mesmo nome da foto, porém com extensão *\_meta*. Tal arquivo deve ser preservado somente se for desejável manter-se as informações referentes à obtenção da foto (tipo, câmera utilizada e tempo de exposição) ou se for necessário inserir novas medições sobre a foto posteriormente, no *AxioVision*, quando esta foto não tiver sido salva também no formato *.zvi*.

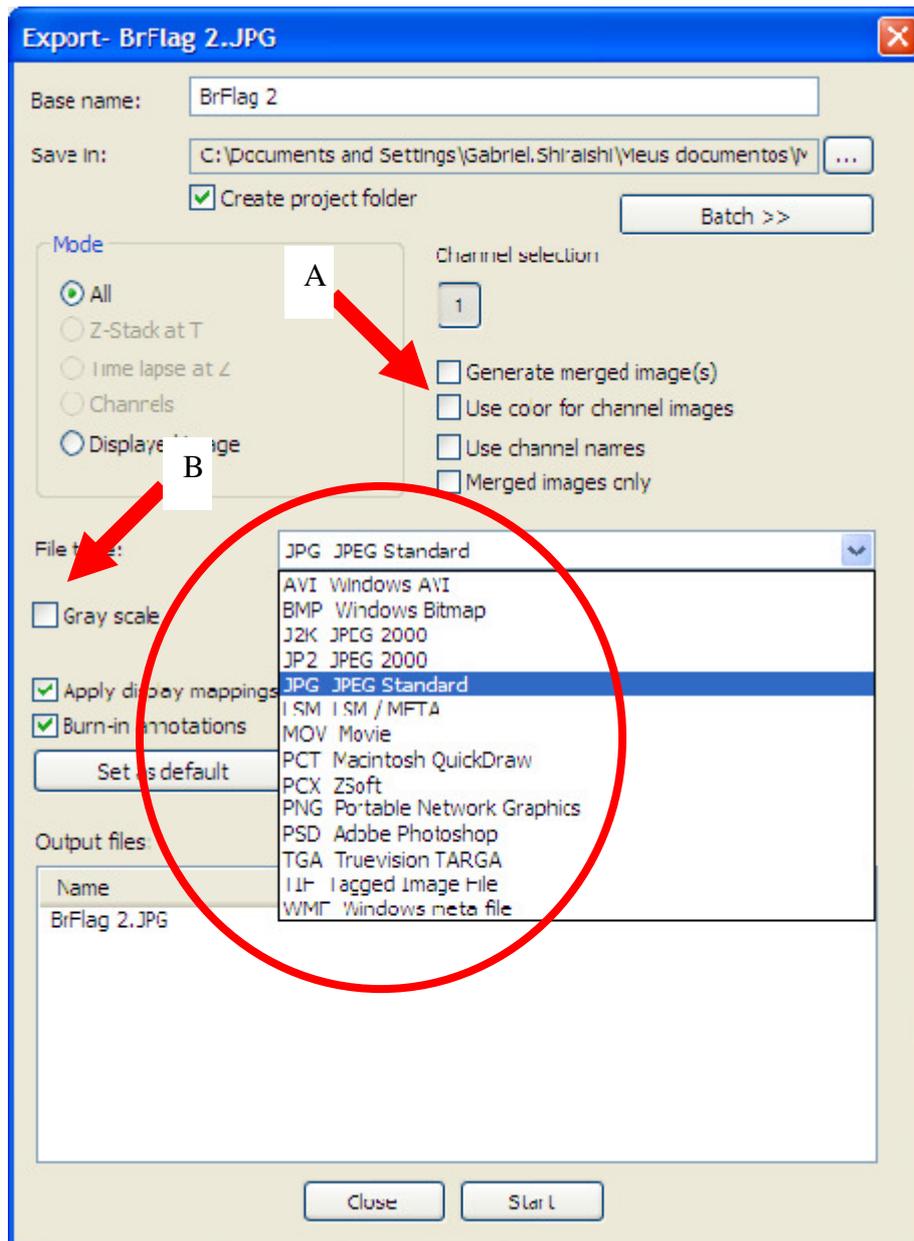


Figura 9.6 – Export

Conclusivamente, se o formato *.zvi* é o único que permite alterações posteriores da imagem com manutenção da integridade desta, mas faz-se necessário salvar a foto em um outro formato não *.zvi* para envio, recomenda-se salvar a foto duas vezes: primeiramente no formato *.zvi* e, em seguida, no formato desejado. Dessa maneira pode-se também ignorar (deletar) o arquivo *\_meta* gerado.

## 10. Os módulos do AxioVision

Quando as necessidades de aplicação do *AxioVision* pelo cliente transcendem quaisquer ferramentas e métodos apresentados até então, faz-se necessário utilizar módulos especiais sob o propósito de se obter os resultados esperados.

Partindo-se de uma licença denominada *Base* programada no *Dongle* pode-se acrescentar, através da reprogramação deste mesmo *Dongle*, uma infinidade de módulos que controlarão tanto o computador quanto o microscópio de maneira didática e eficiente na busca por um resultado mais customizado.

Bons exemplos de aplicação podem ser citados:

- lâminas de fluorescência com mais de um *dye* pedem imagens individuais e fundidas no mesmo experimento (*Multichannel*);
- culturas celulares necessitam de filmagem *after-night* (*Time Lapse*);
- metais, ligas metálicas, inclusões não-metálicas e grafites precisam ser distinguidos e separados conforme normas DIN e ISO (*Materials Core*);
- células transfeccionadas precisam de análise de absorção de  $Ca^{++}$  (*Physiology*);
- lâminas de bioestratigrafia e outros materiais com relevo precisam ser analisados quanto à topografia, composição, anisotropia, etc (*Z-Stack*, *Extended Focus*).

### 10.1 – AxioVision Base

De maneira oposta à citação do capítulo 1, página 3, destacam-se no módulo básico do *AxioVision* as seguintes ferramentas:

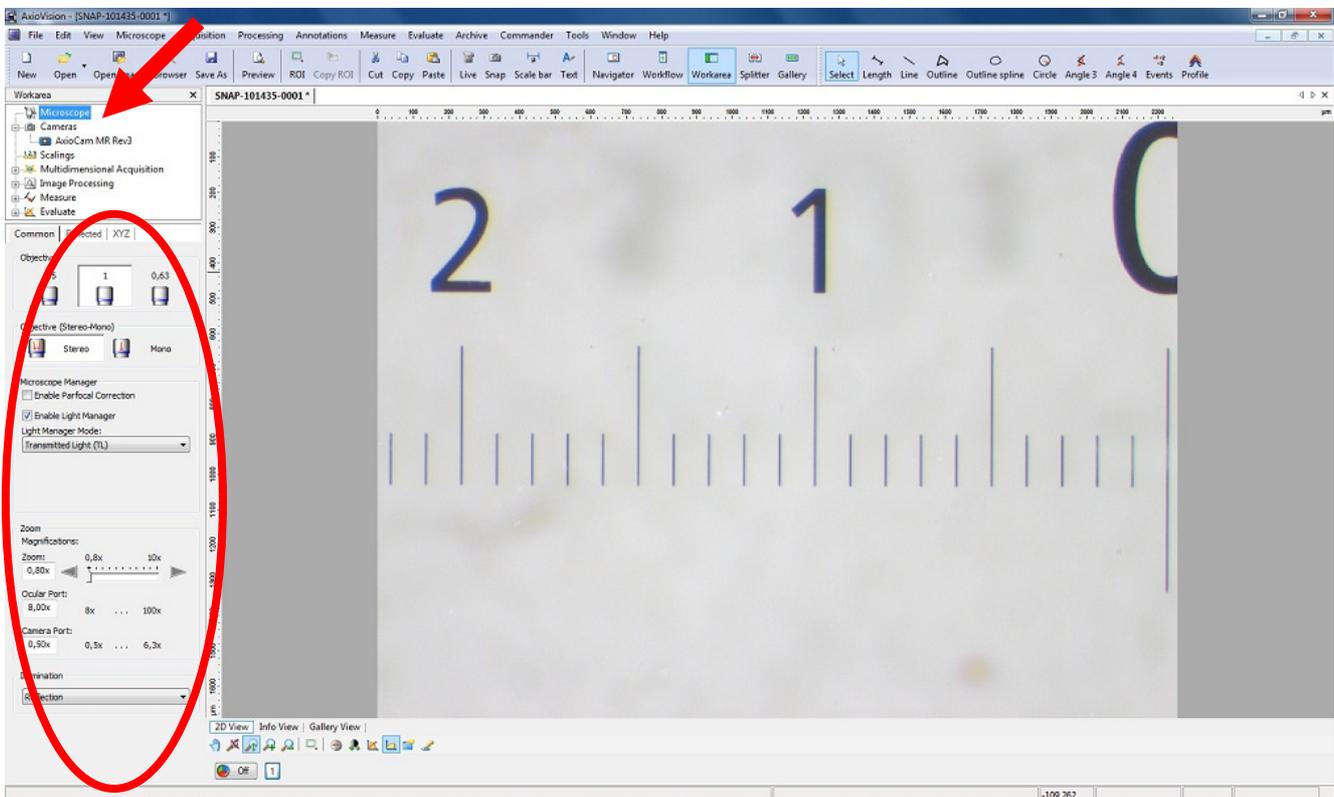


Figura 10.1 – Comunicação com estereomicroscópio

- comunicação com microscópios motorizados e/ou codificados, via *MTB* (equipamentos novos) ou *Microscope Configuration* (equipamentos antigos);
- plugins para incubadora, módulo CO<sub>2</sub>, controle de temperatura, entre outros;
- funções de relatório (*Reports*) e prancha (*Splitter*);
- ferramentas de medição e anotações extras, em adição às já presentes no *AxioVision LE*, tais como contagem manual de eventos, seta e perfil de cores.

## 10.2 – Fluorescence Lite

O módulo *Fluorescence Lite* reúne a funcionalidade de dois módulos mais complexos (*Multichannel* e *Time Lapse*) em um método de operação mais resumido, permitindo a captura e superposição de até quatro canais de imagem ou filmagem simples.

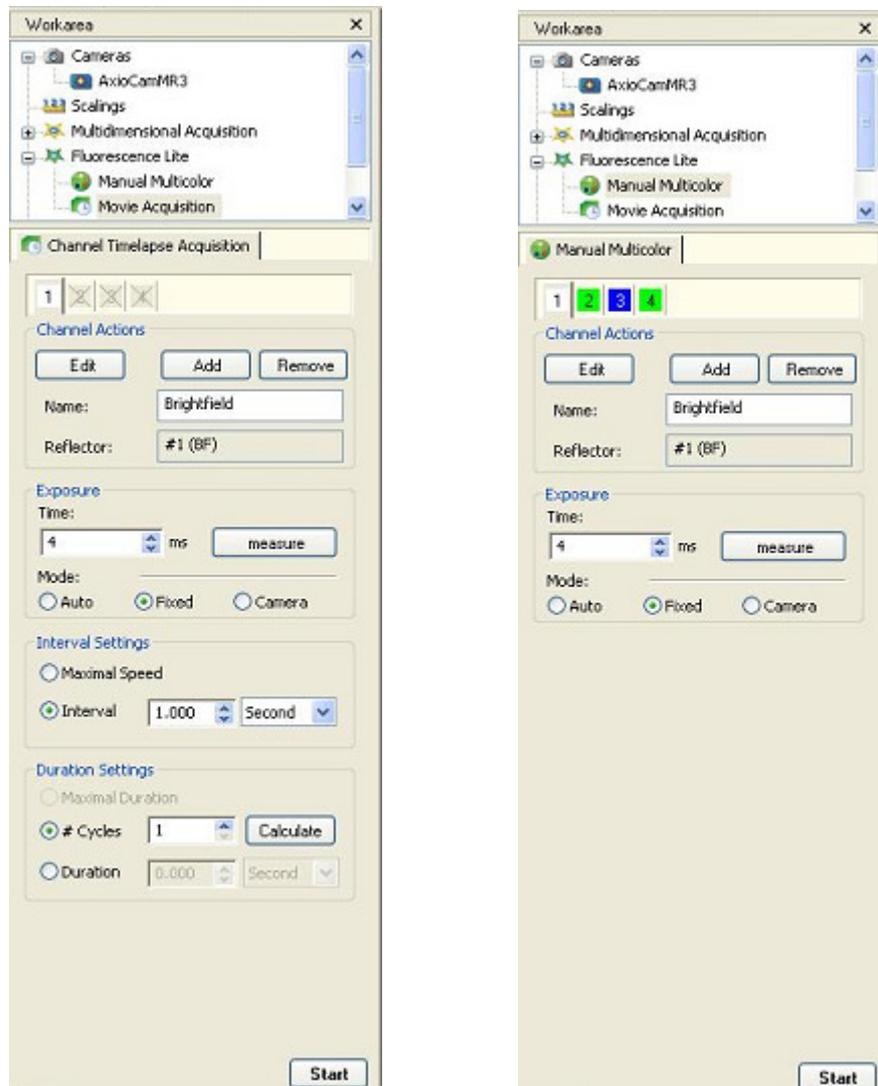


Figura 10.2 – Multicolor e Movie, equivalentes a Multichannel e Time Lapse

O módulo *Fluorescence Lite*, apesar de exigir licenciamento com *Dongle*, não exige a aquisição da licença tipo *Base*. Em outras palavras, não haverá comunicação com dispositivos eletrônicos do microscópio, o que tornará absolutamente manual a obtenção de imagens dos canais de fluorescência.

Para adquirir uma sequência fotográfica em forma de filme, selecione a aba  **Movie Acquisition**. Configure o canal de aquisição através do seletor , o intervalo de aquisição entre cada imagem através dos comandos  e a duração total do experimento através dos comandos . Configure a câmera para obter uma imagem simples através dos comandos a seguir.



Figura 10.3 – Configuração de tempo de exposição, módulo *Fluorescence Lite*

Após realizar os ajustes necessários, clique no botão . Para adquirir imagens de material fluorescente com um ou mais marcadores, selecione a aba  **Manual Multicolor**. Configure cada marcador contido na amostra através do seletor  e mantenha inativos os seletores que não forem utilizados. Para cada um dos marcadores, insira o nome e escolha a posição do filtro de fluorescência que irá expressar a referida marcação. Clique no botão  e siga os passos solicitados pelo programa referentes à mudança manual dos filtros. Para cada mudança executada, ajuste o tempo de exposição da câmera através do comando descrito na figura 10.3, acima.

### 10.3 – AutoMeasure

O módulo *AutoMeasure* (ou Medidas Automáticas) realiza análise de imagens, através de programação simples, podendo categorizar o material nelas contido por cores (ex: intensidade) e/ou formatos (ex: circular). Em relação aos resultados obtidos, normalmente buscam-se tabelas estatísticas de medidas, que podem ser exportadas para editores de planilha para uso quantitativo.

Uma vez que certa programação é desenvolvida para um material, pode-se salvá-la para uso em imagens futuras de mesma natureza, tanto em análise individual quanto em análises em lote.

Como a análise de uma imagem só é feita após o desenvolvimento do programa para tal, as instruções a seguir serão divididas em *Wizard* (desenvolvimento) e *Run Program* (execução).

Após obter uma imagem do material para o qual se deseja a análise automática, mantenha-a em primeiro plano e acesse o módulo *AutoMeasure* conforme a figura abaixo.

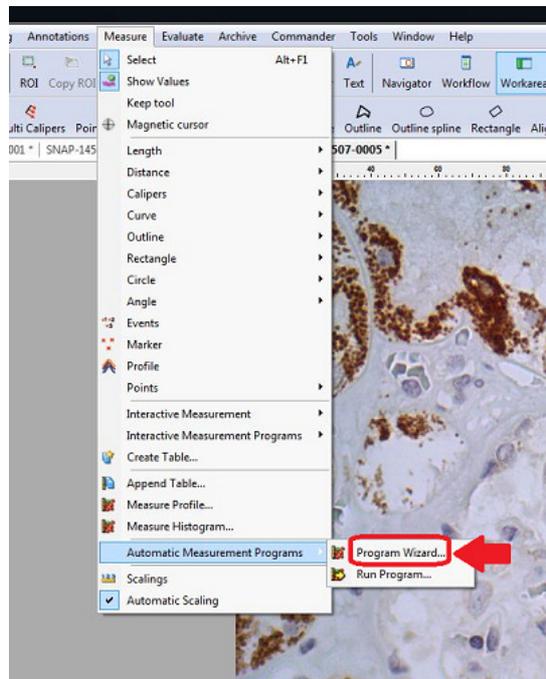


Figura 10.4 – Criando um novo programa para medições automáticas

**OBS:** o desenvolvimento do programa é feito em 13 passos, subdivididos em 3 partes principais (tratamento de imagens, segmentação e estatística).

Defina o nome e insira, se pertinente, informações relevantes ao programa que será desenvolvido, conforme as figuras 10.5 e 10.6, a seguir.

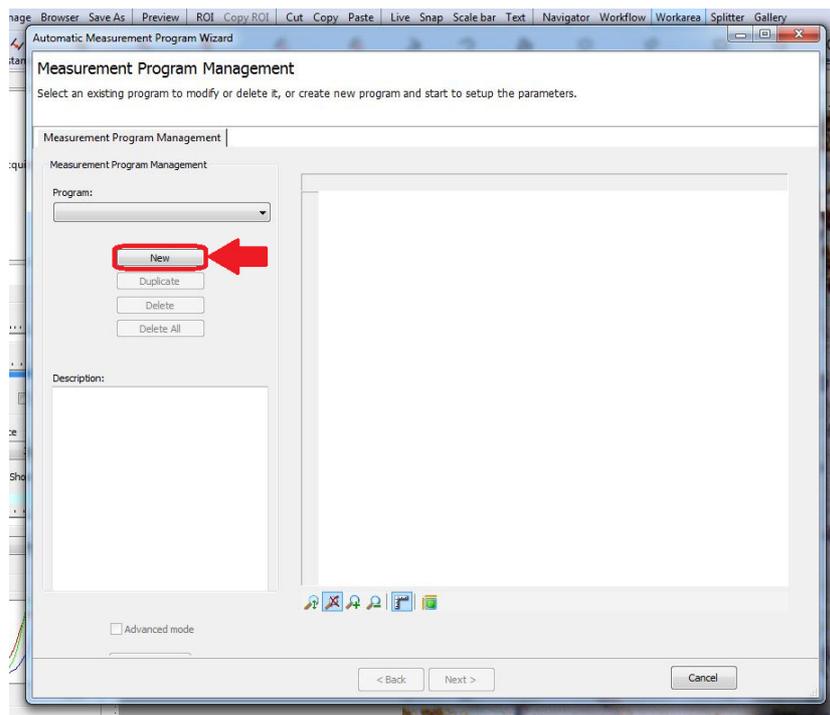


Figura 10.5 – Passo 1, tela inicial

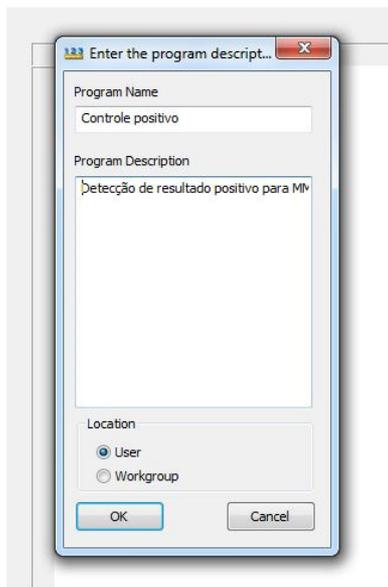


Figura 10.6 – Passo 1, nome e descrição do programa

Assim procedido, a figura 10.7 mostra a tela dos dados iniciais e a imagem que estava em primeiro plano quando do acesso ao módulo. Clique em *Next* para continuar.

**OBS:** esta será a imagem-base para a programação. Neste caso, todas as imagens a serem analisadas com o programa ora desenvolvido deverão ser obtidas através do mesmo método de microscopia.

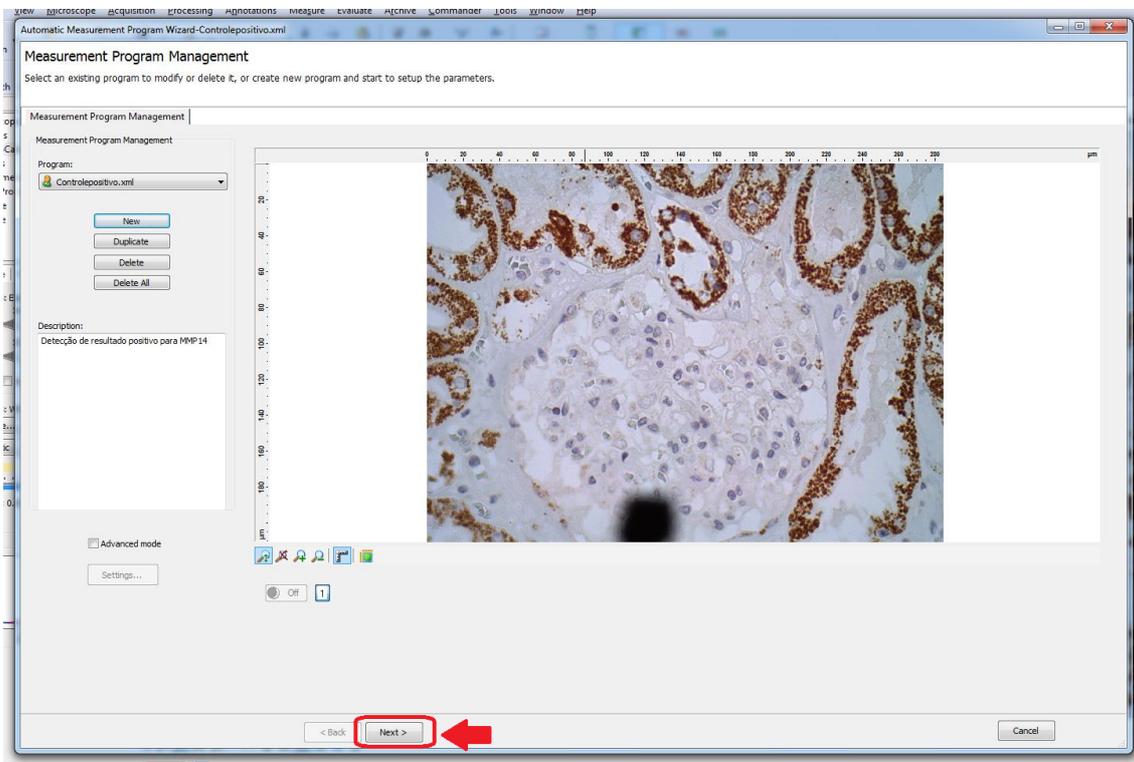


Figura 10.7 – Passo 2, definições iniciais do programa

Na parte superior da janela de cada passo da programação, pode-se consultar uma breve explicação sobre a atuação deste na figura, conforme destaque na figura abaixo.

Para cada passo apresentado, há a opção de executá-lo (marcando-se o *checkbox* 'Execute', destacado na figura abaixo) ou não. Se a execução não for feita, a imagem analisada pelo programa não sofrerá influência do passo da programação.

Se as imagens obtidas para análise tiverem qualidade adequada (ou seja, obedecendo aos capítulos de 3 a 7 desta apostila), o primeiro terço desta programação praticamente não será executado – o que tornará o programa mais leve.

Na figura 10.8 abaixo, por exemplo, a foto-base foi obtida com focalização e iluminação (página 8), tempo de exposição (*Exposure Time*, página 9) e balanço de branco (*White Balance*, páginas 9 e 10) adequados – o que evita a necessidade de correções como a apresentada.

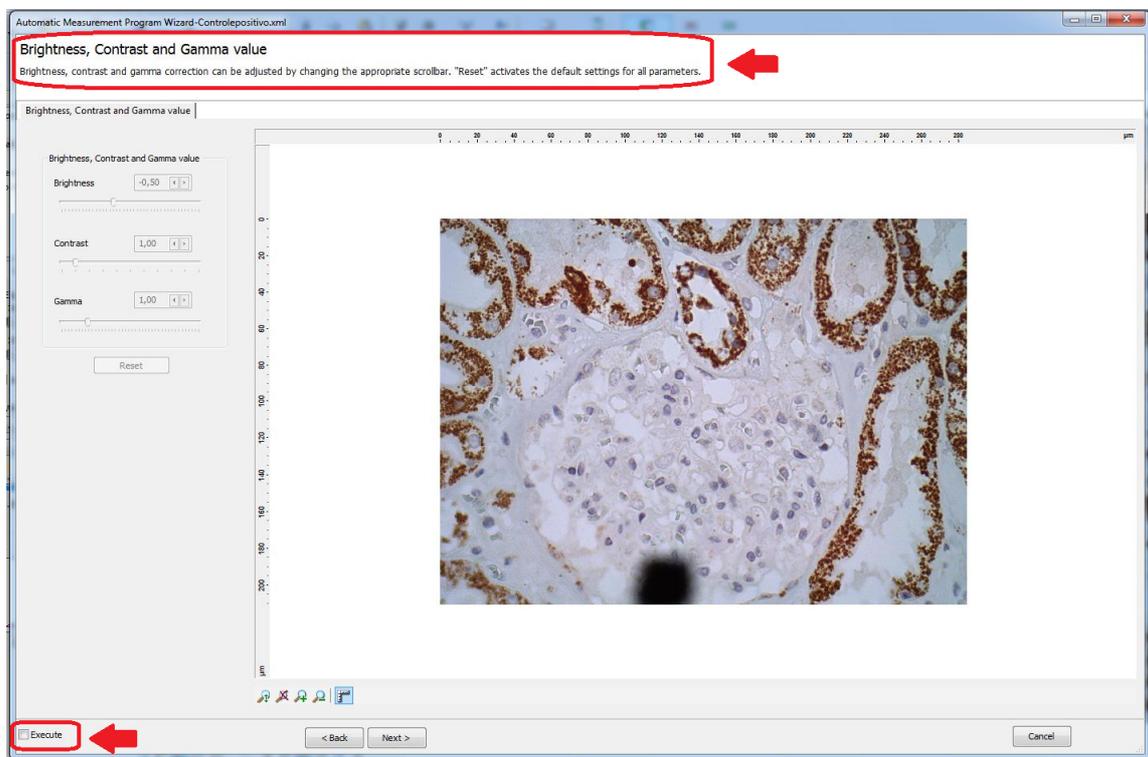


Figura 10.8 – Passo 3, brilho, contraste e gamma

O filtro de *Sigma* apresentado na figura a seguir pode ser um auxiliar útil na equalização entre nuances de uma mesma cor pertencentes a uma mesma estrutura.

Em outras palavras, supondo-se que o interesse do pesquisador em relação à imagem aqui utilizada seja a quantificação da cor marrom. Com a imagem original, tem-se a impressão de que a tonalidade desta cor é uniforme em todas as regiões que a contém. Por outro lado, a segmentação de uma determinada cor é feita com base na composição de cada pixel da imagem – e qualquer uma das partes marrons aqui vistas, quando colocada em *zoom*, apresenta-se conforme a imagem 10.9, na página a seguir.

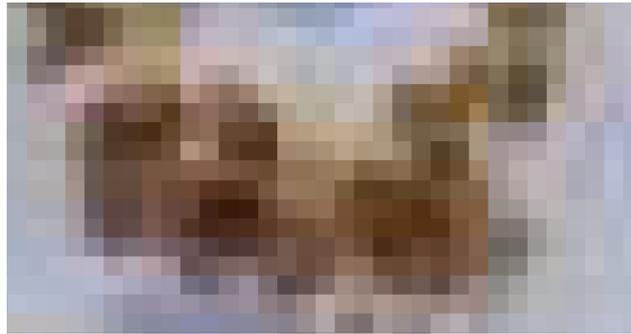


Figura 10.9 – Passo 4, filtro de Sigma não aplicado

Entretanto, ao utilizar-se um determinado nível de Sigma, a mesma apresenta-se conforme as imagens 10.10 e 10.11, abaixo.

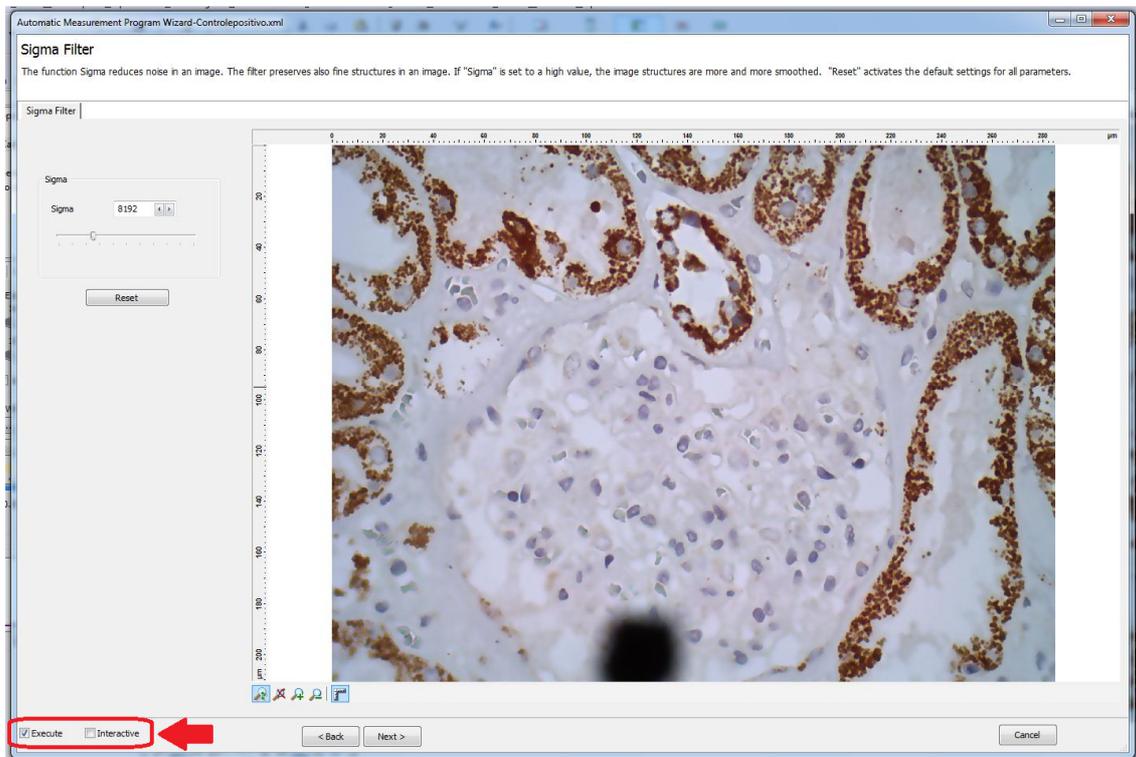


Figura 10.10 – Passo 4, filtro de Sigma em execução

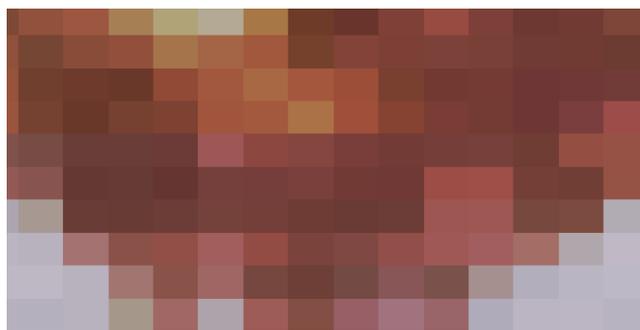


Figura 10.11 – Passo 4, filtro de Sigma sobre a região da figura 10.9

A aproximação das tonalidades entre as nuances desta cor marrom a nível de pixels facilita a quantificação da mesma, desde que todas as nuances equalizadas pertençam a uma mesma fase do material (ou neste caso, tudo que é marrom representa um resultado positivo para determinado exame).

**OBS:** conforme destaque na figura 10.10, toda vez que se executa um passo (marcando-se o *checkbox* 'Execute'), aparece um segundo *checkbox* (denominado 'Interactive'). Como o próprio nome sugere interpretar, a função *Interactive* torna o passo interativo, ou seja, toda vez que o programa for executado, haverá uma interrupção no passo marcado para uma suposta correção da imagem. O uso do *Interactive*, a exemplo do *Execute*, é facultativa.

O *Shading Correction*, passo apresentado a seguir, tem a função de equalizar a iluminação da imagem de forma digital caso haja áreas de sombra na mesma.

Se o microscópio apresentar-se com o alinhamento adequado da iluminação segundo *Köhler*, não haverá regiões de sombra a serem remediadas – ou seja, pode-se manter este passo sem execução. Por outro lado, se a imagem-base advém de outro equipamento não-Zeiss e apresenta-se com sombras, o uso do *Shading Correction* facilita a equalização das cores do material.

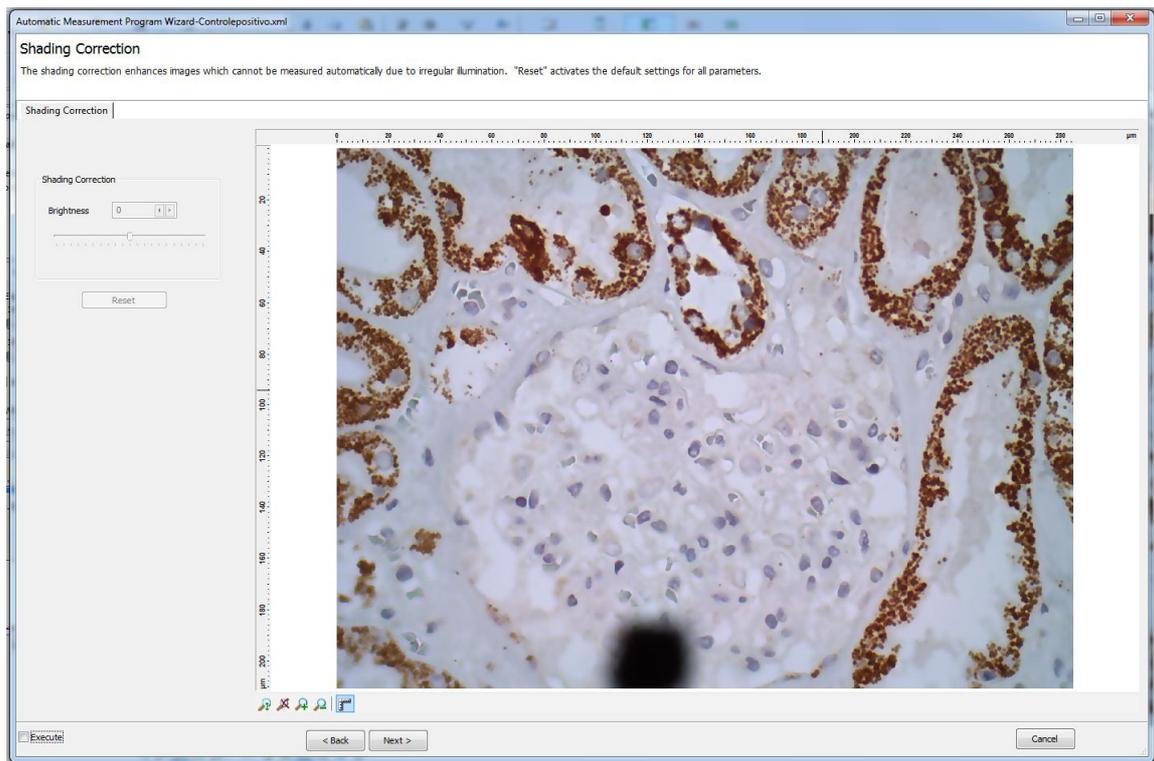


Figura 10.12 – Passo 5, correção de sombras

O *Edge Enhancement*, próximo da programação e último disponível no grupo de tratamento de imagens, tem a função de definir os contornos do material analisado quando este apresenta-se difuso.

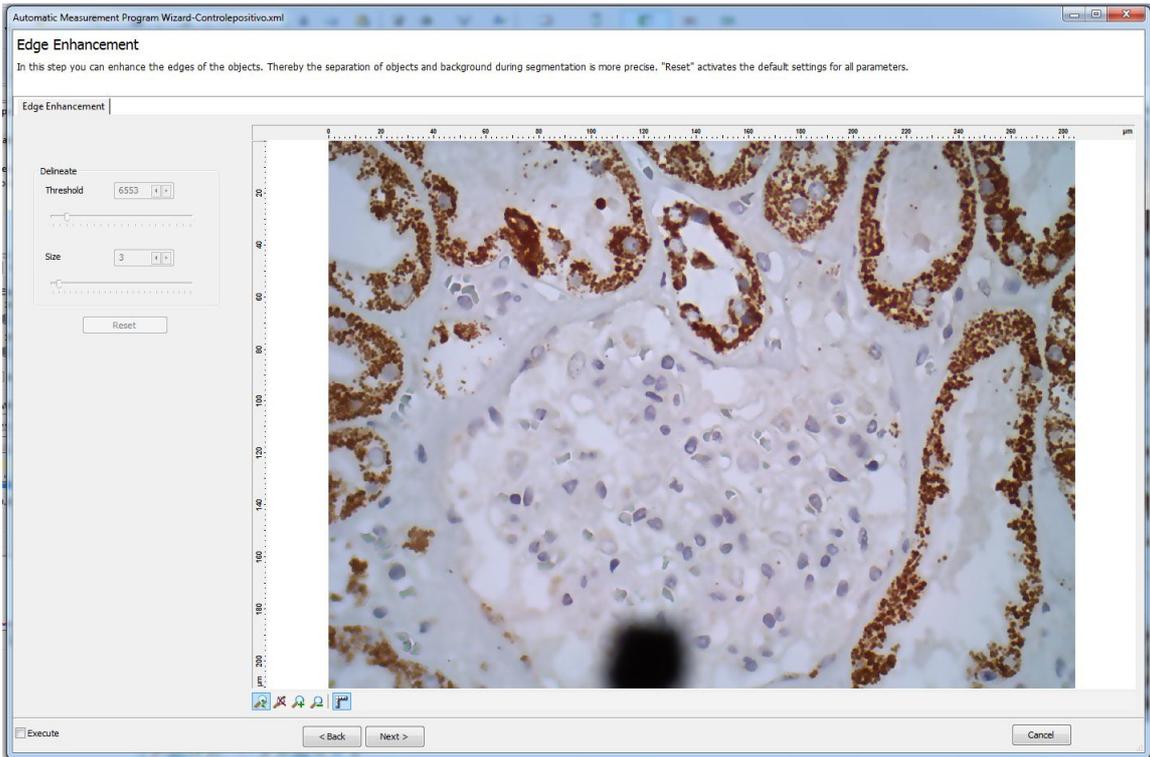


Figura 10.13 – Passo 6, melhoria de bordas

O passo a seguir (*Segmentation*) é o primeiro referente ao grupo de passos de segmentação. Direcionado à separação de materiais distintos por fases (cores distintas), tem execução obrigatória por se tratar do principal item da programação.

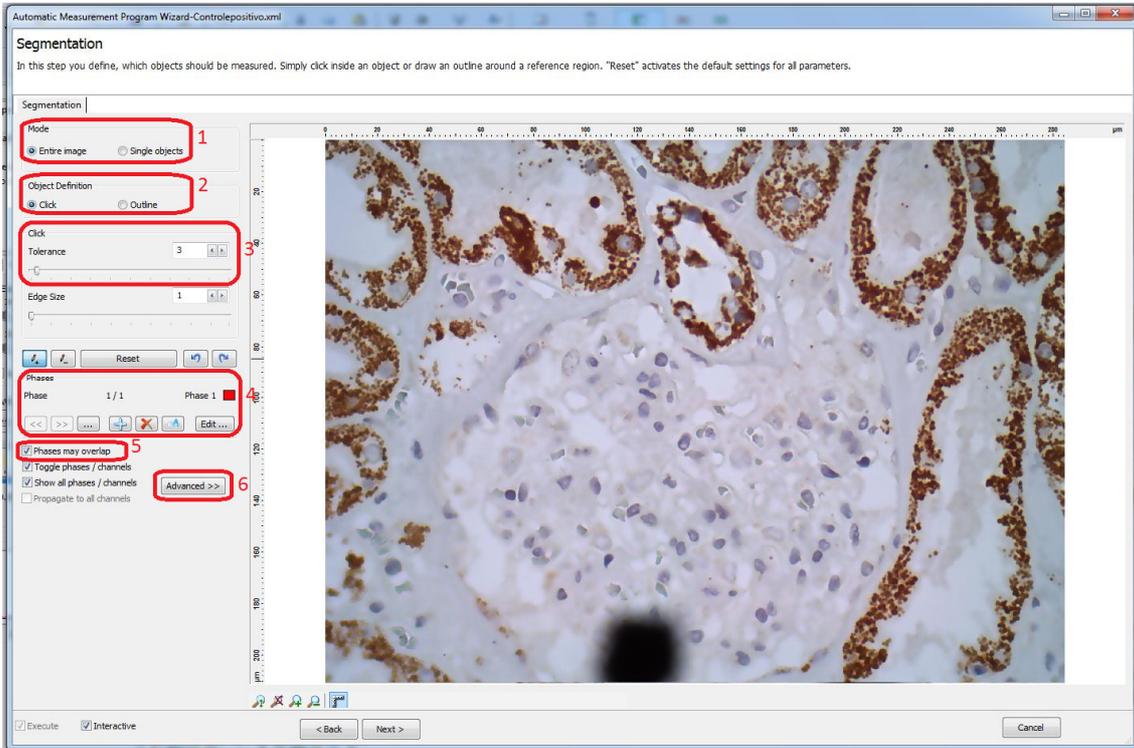


Figura 10.14 – Passo 7, segmentação

Pode-se apontar durante a programação, para fins de estatística, até 100 fases de cor diferentes.

Seguindo o passo-a-passo ilustrado na figura 10.14, entende-se que para a imagem inteira (1), através de um *click* na cor de interesse (2), com uma certa tolerância à variação de tonalidade daquela cor (3), será feita a marcação da fase 1/1 em vermelho (4). Em outras palavras, ao se posicionar o mouse sobre a imagem, a composição de cor do *pixel* sob o ponteiro será mostrada e, se selecionado o tal *pixel*, todos os demais *pixels* da imagem que tiverem composição de cor semelhante - dependendo do nível de tolerância (3) – serão igualmente selecionados e indicados com a cor vermelha.

O uso conveniente do *Sigma Filter* (terceiro passo da programação) pode facilitar a segmentação por aproximar a tonalidade dos *pixels* semelhantes.

Por outro lado, se duas ou mais fases a serem quantificadas tiverem tonalidades de cor próximas, deve-se evitar o uso do *Sigma Filter* e desmarcar o *checkbox* ‘*Phases may overlap*’ (5).

Os botões que permitem adição e exclusão de fases de cores estão contidos no campo (4), mesmo lugar onde localizam-se os botões de navegação entre as fases já marcadas. Acima do campo (4), estão os botões pelos quais pode-se retornar um passo ou reinicializar todas as marcações já feitas.

Caso o conhecimento sobre histogramas (capítulo 7.1, página 17) tenha sido compreendido de forma avançada, pode-se usar o botão *Advanced* (6) e ajustar, para cada fase, as variações mínimas de tonalidade de RGB que devem ser detectadas.

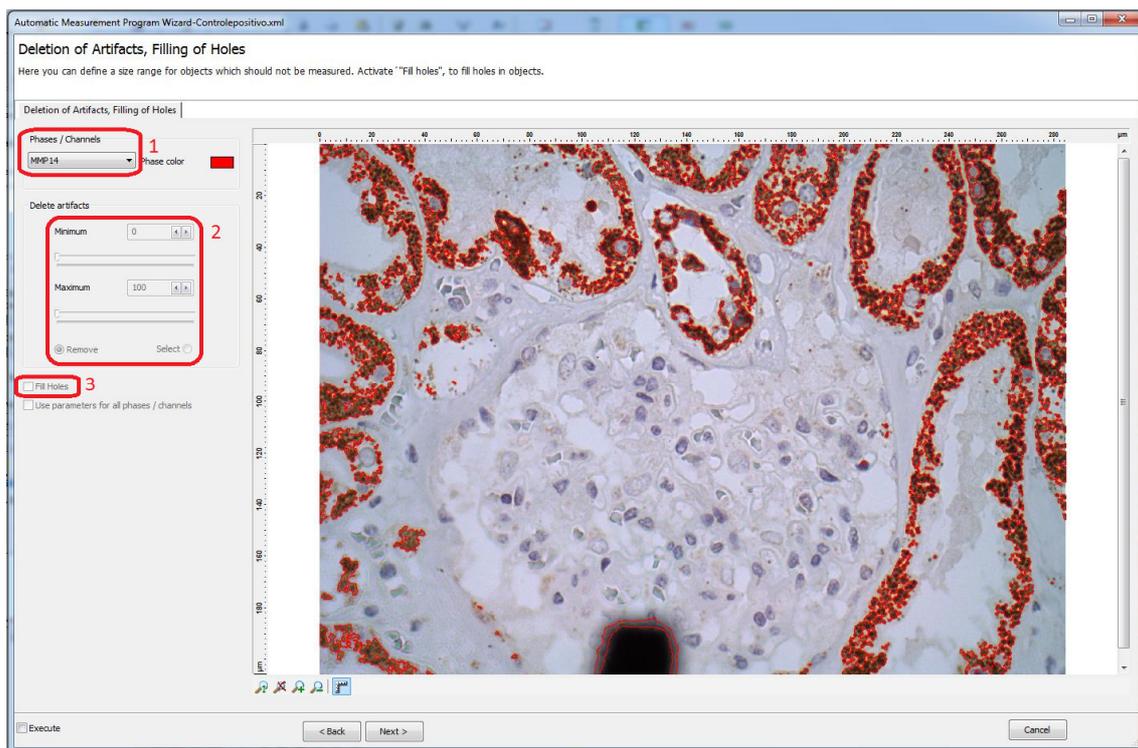


Figura 10.15 – Passo 8, deleção/seleção de artefatos

No passo seguinte à segmentação, pode-se determinar e habilitar a deleção de artefatos (marcações de uma fase que não deveriam ser consideradas) ou preenchimento de buracos (áreas de uma fase inscritas em outras áreas maiores da mesma fase). Selecionando-se a fase (1) a ser refinada, pode-se definir uma faixa de tamanho (2, em

um<sup>2</sup>) a ser considerada ou descartada. O *checkbox* denominado *Fill Holes* (3) determina que toda área de uma fase que esteja inscrita em outra área maior da mesma fase deve ser considerada como parte da maior área.

Exemplo: a lâmina usada nesta análise está passando por quantificação das células da cor marrom, mas há outras partículas de mesma cor na fotografia de menor dimensão que as células e que podem ser consideradas como sujeira. Assim sendo, determina-se um intervalo entre áreas *Minimum* e *Maximum* menor do que as células e seleciona-se o modo *Remove* (2) ou determina-se um intervalo entre áreas *Minimum* e *Maximum* que englobe as áreas das células e seleciona-se o modo *Select* (2).

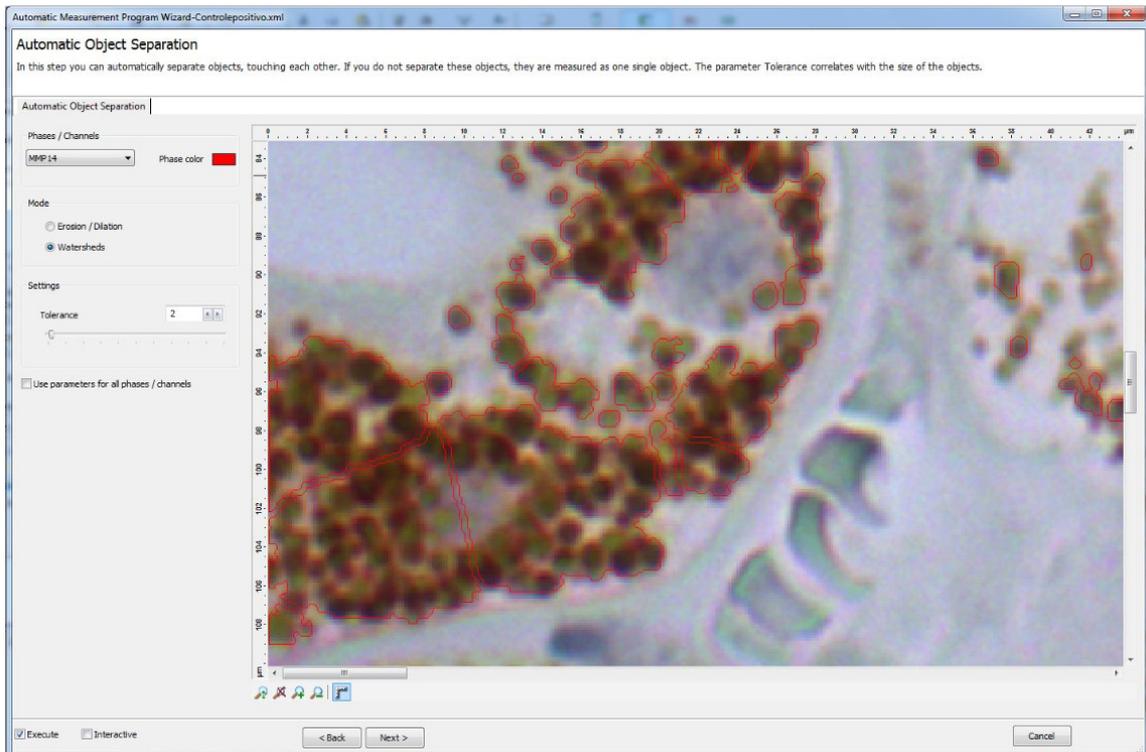


Figura 10.16 – Passo 9, separação automática de objetos

Após a aplicação de um passo que determina exclusão de marcações de fase por área, pode-se determinar um nível automático de separação entre as áreas remanescentes.

Exemplo: as células da cor marrom apresentam proximidade tal que, mantendo-se a marcação atual, um grupo de várias células é considerado como apenas um evento. Neste caso, um nível de separação automática, se bem aplicado, pode promover a separação entre células pela diferença mínima de tonalidade encontrada na fronteira entre cada uma delas.

Executando-se uma separação automática de objetos, conforme ilustrado acima, é possível que regiões não-excluídas pelo passo 8 tenham sido divididas e, agora, apresentem área menor do que a configurada naquele passo. Por este motivo, o passo subsequente é a repetição da deleção/seleção de artefatos – e assim é possível reaplicar a exclusão ou seleção outrora feita.

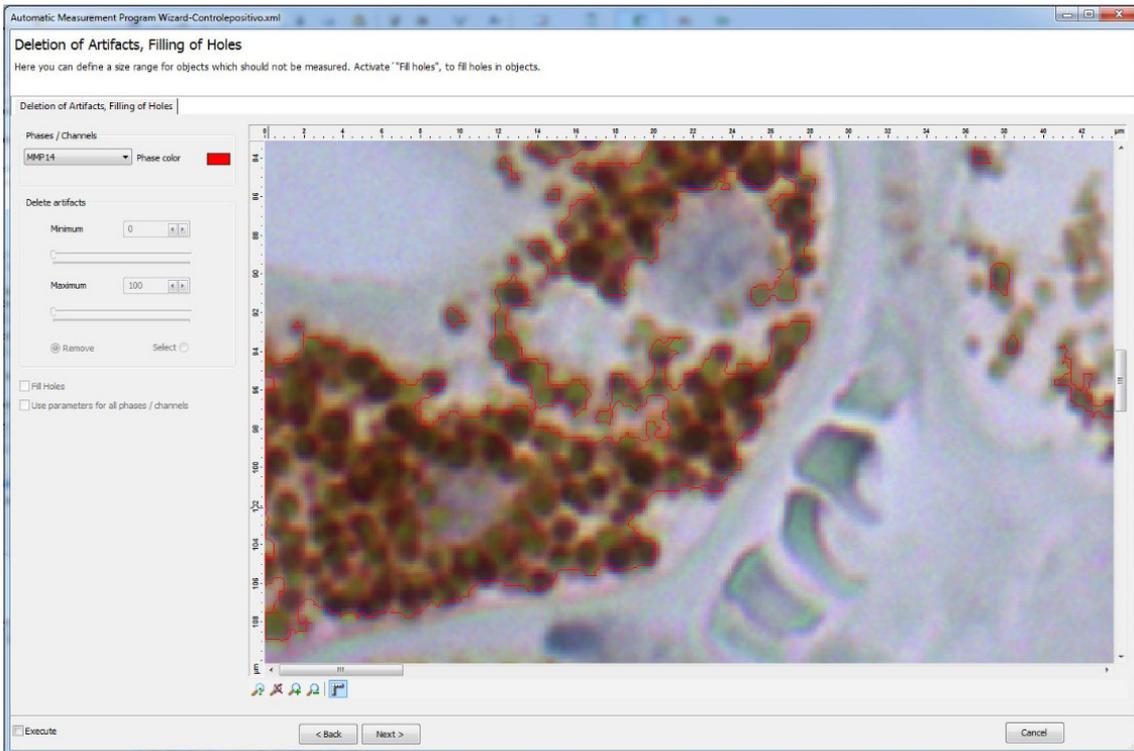


Figura 10.17 – Passo 10, deleção/seleção de artefatos, repetindo passo 8

Usando-se a mesma faixa de tamanho (em  $\mu\text{m}^2$ ) do passo 8, áreas divididas pelo passo 9 que estiverem dentro do intervalo serão tratadas como selecionadas ou deletadas.



Figura 10.18 – Passo 11, processamento interativo de marcações



- REGION FILTER – Opcional. Permite a exclusão de artefatos de qualquer fase demarcada, de acordo com fórmula inserida no subitem *Expression* (ex: em se desejando excluir quaisquer artefatos da Fase 1 que tenham altura maior que 30um, basta selecionar a ferramenta *Bound height* e determinar os 30um como limite superior).
- FRAME – Opcional. Permite a determinação de área de análise automática diferente da área padrão (que seria a fotografia completa).

**OBS:** Caso se utilize a opção de traçado de área(s) a mão livre, torna-se obrigatória a habilitação do item *Interactive*, pois, para cada imagem analisada, o usuário deverá definir o traçado novamente.

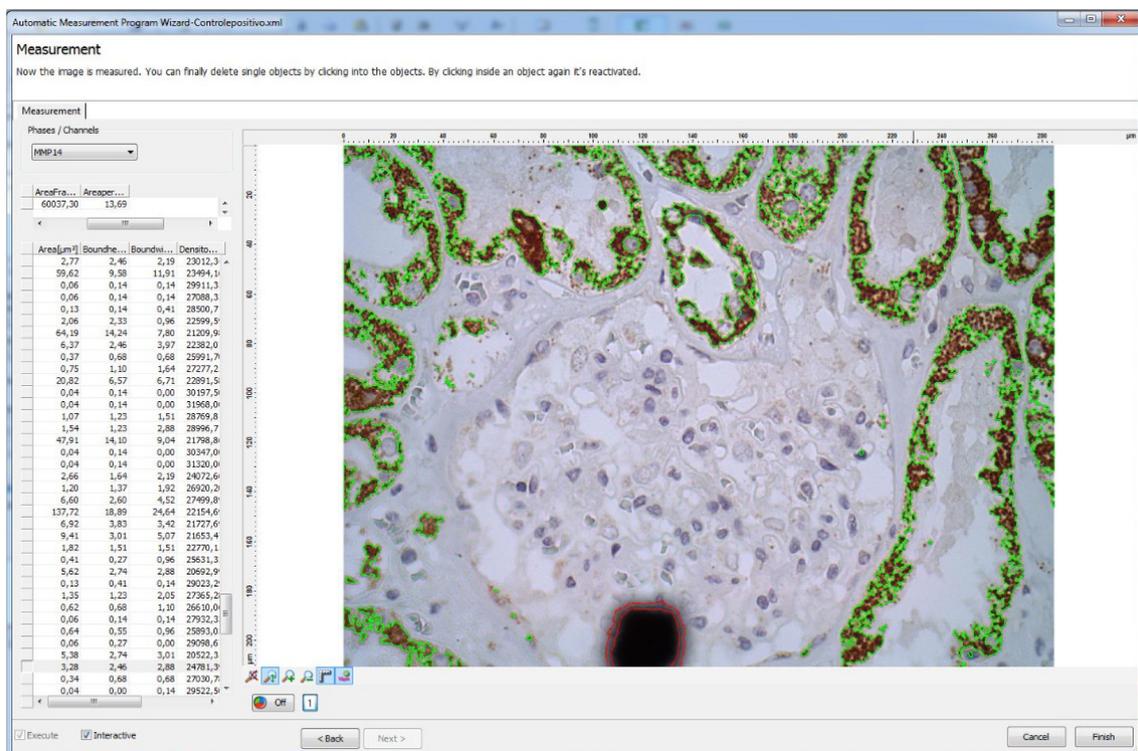


Figura 10.20 – Passo 13, prévia dos resultados obtidos

O último passo da programação de medidas automáticas, mostrado na figura 10.20, apresenta uma prévia dos resultados que serão obtidos com as fotos analisadas, tomando por base a foto utilizada no desenvolvimento. Caso seja habilitado o modo *Interactive*, poder-se-á excluir artefatos que, por ventura, desejou-se eliminar, mas que mesmo assim tenham permanecido como válidos por apresentarem-se semelhantes aos demais. A exclusão é feita por um simples clique sobre o artefato (ex: o artefato na extremidade inferior da imagem é uma sujeira na lente da câmera e, após o *click*, aparece em vermelho e deixa de fazer parte das estatísticas).

Ao término da definição deste passo, clique no botão *Finish* para salvar o programa com o nome dado no início do processo (passo 1, nome 'Controle positivo'). O *AxioVision* retornará à tela de uso normal, mas com duas novas abas, que serão as tabelas com os resultados da análise da foto utilizada na programação.

Para executar a análise de outras imagens de mesma natureza, basta acessar a opção *Run Program*, conforme a ilustração 10.21.

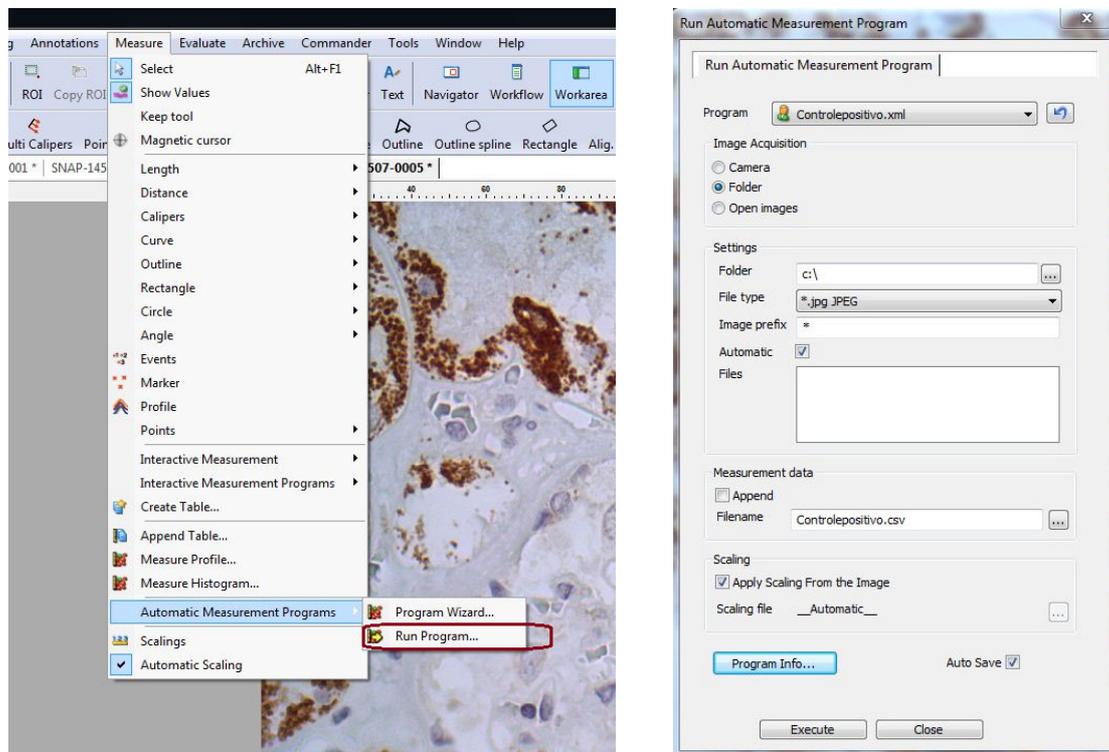


Figura 10.21 – Execução do programa sobre novas imagens, definindo a origem

O item *Program* da janela à direita permite a seleção do programa a se utilizar (para cada **tipo** de imagem diferente, e **não** para cada imagem, desenvolve-se um novo programa, que estará à disposição na lista deste item). Logo abaixo, o item *Image Acquisition* permite a indicação da origem da(s) imagem(ns) a ser(em) analisada(s):

- **CAMERA** – A imagem a ser analisada será obtida diretamente da câmera, ou seja, ao selecionar este item e clicar no botão *Execute*, o campo focalizado diante da câmera neste momento será fotografado e diretamente analisado.
- **FOLDER** – A(s) imagem(ns) contidas na pasta indicada logo abaixo desta seleção serão analisadas de forma sequencial.

**OBS:** Não serão analisadas imagens na pasta-raiz ou em subpastas. A análise sequencial será interrompida em cada imagem analisada se, durante a programação, tenha sido utilizada a opção *Interactive* - ou seja, se o uso da opção *Folder* é desejado para um pesquisador que pretende deixar as análises em processamento sem a necessidade de intervenções constantes (ex: processamento *After-Night*), aconselha-se uma programação sem o uso do item *Interactive* em nenhum dos passos ou a desabilitação do item *Be Always Interactive* mostrado na figura 10.22.

- **OPEN IMAGES** – Todas as imagens abertas na Galeria serão exibidas na lista abaixo desta seleção e serão analisadas por *default*, exceto se, nesta mesma lista, forem manualmente marcadas.



**OBS:** Tanto para a opção *Folder* quanto para a opção *Open Images*, deve-se cuidar da opção *Measurement Data*, responsável pela geração de tabelas de múltiplas análises. Caso o item seja usado de forma incorreta, os dados da análise de uma imagem serão sobrepostos pelos dados da análise da imagem subsequente, e não complementados, conforme se espera.

## 11. Considerações finais

Este manual de referência visa permitir ao usuário a exploração de grande parte dos recursos disponíveis no AxioVision, um software de amplo espectro de aplicações e grande disponibilidade de funções, inclusive na configuração básica.

Nem todos os módulos do AxioVision estão contemplados, por ora, pelos capítulos aqui apresentados. Assim posto, entre em contato com os desenvolvedores do material caso deseje uma atualização da apostila e, eventualmente, o capítulo referente ao vosso módulo já tenha sido desenvolvido. Não obstante, é válido lembrar que o software possui vários outros módulos que podem ser adquiridos a qualquer momento e a ativação dos mesmos requer a reprogramação do Dongle (chaveiro) USB com códigos criptografados enviados pela Matriz.

Não deixe de familiarizar-se com as diferentes técnicas de microscopia oferecidas por cada equipamento instalado e, com isso, utilizar essas poderosas e úteis ferramentas de trabalho de maneira qualitativa e em conjunto.

Tanto para o uso do software quanto para o uso de microscópios e estereomicroscópios, há diversos documentos disponíveis no site [www.zeiss.de](http://www.zeiss.de) que detalham as diferentes técnicas e tecnologias da área desenvolvidas pela Carl Zeiss. Um bom exemplar é o documento denominado *Microscopy From The Very Beginning*, que pormenoriza de maneira técnica a história da microscopia e tipos de observação por nós comercializados. Além disso, leia sobre o portfólio de microscópios disponíveis e o manual do usuário de todo equipamento instalado.

Ao aprofundar-se no software, o cliente pode reconhecer uma nova necessidade ou identificar uma nova aplicação tais que venham a reduzir seus tempos de análise e facilitem as rotinas. Neste caso, os departamentos de Vendas e Assistência Técnica da Carl Zeiss do Brasil estarão sempre à disposição para consultoria técnica, quer seja para uma nova aquisição, quer seja para a solução de dúvidas de uso.

E, dentro de um espírito de cooperação e crescimento contínuos que favoreçam a todos os elos envolvidos na produção de resultados progressivos e de progresso, os desenvolvedores deste material, em nome da Carl Zeiss do Brasil, reafirmam a disponibilidade para suporte e desejam a todos um bom trabalho.



## 12. Bibliografia

SVEDBERG, Brian. AxioVision Users Guide – Release 4.8.1. 1 ed. Jena: Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 2009.

DRÄGER, Bernd. AxioCam IC Installation Flyer. 1 ed. Jena: Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 2008.

LÜTZELBERGER, Axel. AxioVision Takeoff Guide. 1 ed. Bicester: Imaging Associates Ltd., 2009.

KAPITZA, H. G. Microscopy From The Very Beginning. 2 ed. Oberkochen: Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 1994.

ZÖLFFEL, Michael. Clean Microscope. 2 ed. Carl Zeiss MicroImaging GmbH: Göttingen, 1998