

Desenvolvimento de Rotinas de Automação em Microscopia Digital

Aluno: Carlos Alexandre Papani Ferreira

Orientadores: Sidnei Paciornik, Marcos H de Pinho Mauricio

Introdução

A microscopia digital [1] é a integração entre microscópio, aquisição digital de imagens, procedimentos de automação e análise de imagens. Ao longo dos anos tem se tornado uma ferramenta fundamental na caracterização de materiais, trazendo maior velocidade ao processo, melhorando a qualidade dos dados obtidos e permitindo realizar medidas impossíveis de se obter com os métodos manuais tradicionais. Os softwares para microscopia digital já dispõem de uma grande quantidade de funções, mas em muitos casos, há necessidade de se criar rotinas específicas para atender necessidades dos usuários.

No presente trabalho é apresentado o início do desenvolvimento de uma rotina de microscopia digital que permite automatizar a captura de imagens de amostras de sedimentos gerados durante a sondagem de poços de petróleo. A partir destas imagens, especialistas realizam a datação geológica do terreno através da identificação de nanofósseis presentes nos sedimentos. O presente trabalho faz parte de um projeto desenvolvido sob solicitação do CENPES/Petrobras. Atualmente, amostras de sedimentos são obtidas nos navios-sonda e enviadas para análise por especialistas no CENPES. Este processo é lento e custoso. A rotina de automação aqui proposta permitirá reduzir os tempos envolvidos e otimizar o processo de identificação dos fósseis.

Objetivos

A rotina em desenvolvimento deverá controlar a operação de um microscópio óptico motorizado e de uma câmera digital para capturar um grande número de imagens cobrindo completamente uma amostra de sedimentos. Para cada imagem capturada, 4 condições distintas de polarização da luz devem ser utilizadas, permitindo uma melhor discriminação dos objetos de interesse nas imagens.

Rotina em Desenvolvimento

O desenvolvimento utiliza um notebook IBM, o software AxioVision, uma câmera “firewire” AxioCam e um microscópio motorizado Zeiss AxioPlan.

A rotina possuirá diversos módulos independentes entre si, organizados e agrupados em funções. Estas, por sua vez, serão chamadas a partir da função principal. Esta forma permite uma maior organização e torna o código mais legível, para futuras atualizações ou para o entendimento por outro programador se for o caso.

Este é um projeto de longo prazo e se encontra em andamento. Atualmente os módulos de captura, movimentação, controle das polarizações, armazenamento das imagens, e módulo principal já estão concluídos.

Estrutura da Rotina

A rotina foi dividida em três etapas:

1. Configurações Iniciais

Nesta primeira parte, a rotina é responsável por calibrar o estágio e o foco, caso os mesmos não estejam calibrados, adequar a iluminação a cada amostra e definir o pacote de inicializações padrão, ou seja, lente objetiva, polarização, filtros e condensar, logo em seguida a rotina solicita que a lâmina seja posicionada no estágio.

2. Captura das Imagens

Após a configuração ser iniciada, começa a etapa de captura, onde o início da captura é definido no canto inferior direito e a partir deste ponto, é feita uma varredura seguindo uma linha de 30 campos na horizontal indo da direita para a esquerda, logo após 30 campos no sentido contrário na linha acima da primeira, dando um total de 60 imagens, mas este processo repete-se quatro vezes nas mesmas coordenadas x-y anteriores.

- Primeira Etapa

Numa primeira varredura é capturado um conjunto de imagens sem nenhum tipo de polarização, apenas com as configurações padrão de iluminação.

- Segunda Etapa

Em seguida há um retorno à posição inicial e é realizada uma nova captura nas mesmas coordenadas x-y anteriores, usando o primeiro modo de polarização à 0°. Neste caso, as imagens capturadas são muito diferentes das obtidas sem polarização. Assim, é necessário realizar um novo procedimento de auto-foco em cada campo, e as novas posições do foco são armazenadas para as subseqüentes polarizações.

Após esta etapa o estágio move-se novamente para a posição inicial e recaptura as imagens com o segundo e o terceiro modos de polarização, importando as posições x-y-z armazenadas na segunda etapa. Este processo de importação das posições, especialmente da posição z (foco) visa acelerar o processo, visto que o auto-foco neste tipo de imagens é bastante demorado.

- Terceira Etapa

Nesta etapa, as posições z, são importadas do arquivo e é realizada uma captura para o 3° modo de polarização, que esta a 22.5°.

- Quarta Etapa

Idem ao 3° tipo, mas com uma angulação de 45°.

Ao final do processo, são capturadas 4 imagens para cada posição x-y sobre a amostra, sem polarização e com 3 tipos diferentes de polarização. Tipicamente são capturadas 600 imagens em cada condição para um total de 2400 imagens. Em cada imagem, são gravadas as coordenadas x-y-z e a condição de polarização.

3. Envio de Imagens

Este é um processo crítico, devido à limitada banda que é utilizada por diversos aplicativos na sonda, então a melhor maneira encontrada foi dividir o envio de imagens em pacotes de sub-imagens, ou seja, a cada 240 imagens obtidas um pacote é enviado para o CENPES/Petrobras.

Resultados e Discussão

Como já mencionado, a variação de polarização é necessária para a identificação de determinados fósseis que são mais visíveis em luz polarizada. A Figura 1 mostra duas imagens de um mesmo campo sem e com polarização.

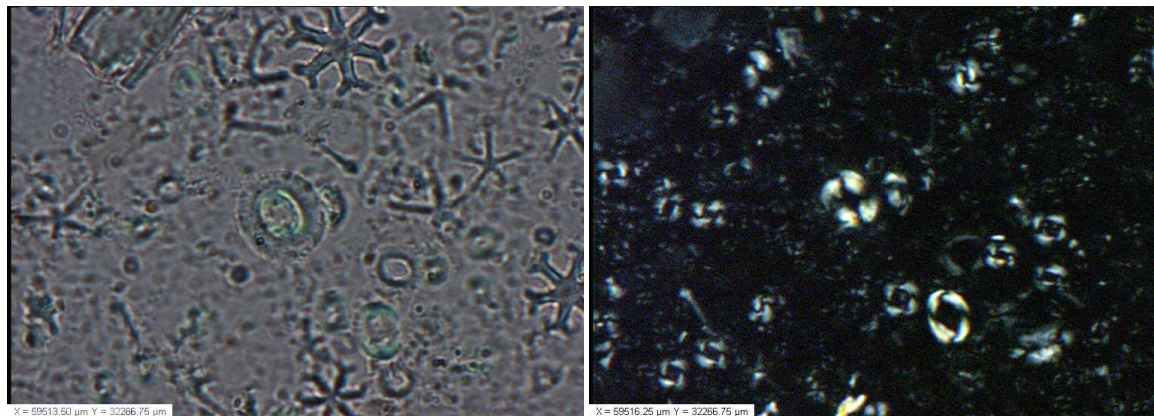


Figura 1 - Par de fotos de um mesmo campo de uma lâmina delgada obtidos pelo sistema. Observe que alguns fósseis são mais visíveis e facilmente identificáveis em luz polarizada (formas circulares, foto da direita), enquanto outros somente aparecem em luz não polarizada (formas estelares, foto da esquerda).

Uma primeira versão desta rotina, desenvolvida em um ambiente de programação mais limitado (KS400) foi testada em um navio sonda. Os resultados preliminares indicaram dificuldades na rotina de auto-foco, possivelmente causadas por vibração mecânica. Isto levou à necessidade de utilizar câmeras digitais mais velozes, com conexão “firewire”, que só podem ser controladas com o software AxioVision.

Uma das dificuldades encontradas estava associada à precisão mecânica do estágio motorizado. Numa primeira versão da rotina optou-se por capturar todas as 600 imagens de cada modo de polarização antes de trocar de modo. No entanto, o deslocamento do estágio para cobrir as posições correspondentes às 600 imagens (20 no eixo y versus 30 no eixo x) levava a um erro relevante de posicionamento quando o sistema retornava à posição inicial. Trabalhando no aumento máximo do microscópio óptico, um pequeno erro de posição do estágio gerava grandes deslocamentos nas imagens capturadas.

A primeira solução encontrada foi, para cada posição x-y, realizar a captura dos 4 tipos de imagens. No entanto, o controle das 3 condições de polarização implica em girar, eletromecanicamente, dois dispositivos do microscópio, que contém os polarizadores. Determinou-se que demanda de girar constantemente estes dispositivos para cada um dos 600 campos poderia gerar erros de funcionamento do equipamento.

Assim, optou-se por uma solução intermediária que equilibra os requisitos de precisão mecânica com uma menor demanda sobre o equipamento. Ao capturar 60 imagens (2 no eixo y versus 30 no eixo x), reduz-se a frequência com que os polarizadores devem ser girados. Simultaneamente, reduz-se o erro de posicionamento ao retornar à origem de cada grupo de 60 imagens.

Esta solução também é compatível com o envio das imagens em pacotes menores o que, em princípio, pode permitir que um técnico responsável pela análise das imagens para identificação das espécies de fósseis possa iniciar seu trabalho enquanto o restante da varredura da lâmina está sendo realizado.

A rotina em desenvolvimento permitirá uma maior velocidade na captura e análise das imagens pelos técnicos do CENPES, diminuindo os custos envolvidos no processo. Além disso, a rotina é essencialmente automática, com a interferência do operador restrita à

colocação inicial da amostra na platina do microscópio. A partir daí, o sistema automaticamente captura, grava e transmite os conjuntos de imagens para o laboratório de análise.

Referências

1 - PACIORNIK, S.; MAURÍCIO, M. H. P. Digital Imaging. Digital Imaging. In: VOORT, George Vander (Org.). ASM Handbook, Volume 9, Metallography and Microstructures. Materials Park, 2004, v. 9, p. 368-402.

Apêndice – Rotinas Desenvolvidas

Módulo para controle do posicionamento do estágio

Attribute VB_Name = "Posicao"

'Move a bandeja para uma posição bem afastada

Public Sub Calibra()

Dim pstage As ZiStageDevice

If pstage Is Nothing Then

Set pstage = ZiApplication.devices.Open("Stage")

End If

pstage.MoveTo -67000, -50000, True

End Sub

'Seta a posição corrente como sendo a (0,0)

Public Sub SetHome()

Dim Stage As ZiStageDevice

Dim devices As ZiDevices

Set devices = ZiApplication.devices

Set Stage = devices.Open("Stage")

With Stage

.SetHome True

.UpdateParameters

End With

End Sub

'Seta a posição para o início da captura

Public Sub SetPosicao()

Dim job As Long

Dim pstage As ZiStageDevice

If pstage Is Nothing Then

Set pstage = ZiApplication.devices.Open("Stage")

End If

pstage.MoveTo 41000, 30000, True

MsgBox "Coloque óleo no canto inferior direito.", vbExclamation, "LmdNanoFosseis"

End Sub

'Rotina utilizada para aquisição das posições correntes

Public Sub ZMgetXYPos(xpos As Double, ypos As Double)

Dim pstage As ZiStageDevice

If pstage Is Nothing Then

Set pstage = ZiApplication.devices.Open("Stage")

End If

With pstage

xpos = .XPosition

ypos = .YPosition

End With

End Sub

'Rotina utilizada para aquisição das posições dos focos correntes

Public Sub ZMgetZPos(zpos As Double)

Dim Focus As ZiFocusDevice

Dim devices As ZiDevices

Dim zposition As Double

Set devices = ZiApplication.devices

Set Focus = devices.Open("Focus")

zposition = Focus.Position

End Sub

'Move o foco para uma posição escolhida

Public Sub ZMsetZPos(zpos As Double)

Dim Focus As ZiFocusDevice

Dim devices As ZiDevices

Set devices = ZiApplication.devices

Set Focus = devices.Open("Focus")

With Focus

.Step zpos, True

.UpdateParameters

End With

End Sub

'Verifica posição inicial da bandeja motorizada

Public Sub Inicializacao()

Dim Stage As ZiStageDevice

Dim devices As ZiDevices

Dim xpoint As Double, ypoint As Double, zpoint As Double

Set devices = ZiApplication.devices

Set Stage = devices.Open("Stage")

If Stage.XPosition <> 44000 Or Stage.YPosition <> 31000 Then

Calibra

SetHome

SetPosicao

End If

End Sub

' Controla o pacote de polarização

' Polarização(1: Sem Pol, 2: Pol 0°, 3: Pol 22.5°, 4: Pol 45°)

Public Sub Seta_Pol(pol As Integer)

Select Case pol

'eliminar ref a tempo expos porque já faz automático

Case 1

Camera.Tempo_Exp

Polar.Condenser ziCondenserContrastMethodDIC1

Polar.Reflector "4 vazio"

Exit Sub

Case 2

```
Camera.Tempo_Exp
Polar.Condenser ziCondenserContrastMethodDIC1
Polar.Reflector "Analyzer 0"
Exit Sub
Case 3
Camera.Tempo_Exp
Polar.Condenser ziCondenserContrastMethodDIC2
Polar.Reflector "Analyzer 22.5"
Exit Sub
Case 4
Camera.Tempo_Exp
Polar.Condenser ziCondenserContrastMethodDIC3
Polar.Reflector "Analyzer 45"
Exit Sub
End Select
End Sub
'Desenha as coordenadas x,y e z correntes na imagem
Public Sub ShapePosição(x As Double, y As Double)
Dim Layer As ZiLayer
Dim Layers As ZiLayers
Dim Image As ZiImage
Dim Shape As ZiShape

Set Image = ZiApplication.ActiveDocument
Set Shapes = Image.Layers.Item(1).Shapes
Set Shape = Shapes.Add("MyText", ziShapeText)

With Shape
.SetRectangle 10, 990, 600, 1030
.Text = "" & "X = " & x & ";" & "Y = " & y & ""
.FONTSIZE = 15
.TextColor = 0
.TextStyle = ziTextStyleLeft
.DrawStyle = ziDrawStyleNone
End With
End Sub
'Rotina utilizada para aquisição da lente objetiva corrente
Public Function ZMgetObjective() As String
Dim pObjective As ZiObjectiveDevice
Dim pMicroscope As ZiMicroscopeDevice

If pMicroscope Is Nothing Then
Set pMicroscope = ZiApplication.devices.Open("Microscope")
End If

Set pObjective = pMicroscope.Objective
ZMgetObjective = pObjective.Objective

If ZMgetObjective <> ("Plan Neofluar 100x/1.30 Oil Pol (DIC III)") Then
ZMsetObjective ("Plan Neofluar 100x/1.30 Oil Pol (DIC III)")
```

```
End If
End Function
'Controle das lentes objetivas do microscópio
Public Sub ZMsetObjective(ByRef Name As String)
  Dim pMicroscope As ZiMicroscopeDevice
  Dim pObjective As ZiObjectiveDevice

  If pMicroscope Is Nothing Then
    Set pMicroscope = ZiApplication.devices.Open("Microscope")
  End If

  Set pObjective = pMicroscope.Objective

  pObjective.Objective = Name
  pObjective.UpdateParameters False
End Sub
'Funcao responsável pela movimentação espaçada ao longo da amostra
Public Sub StepPosition(x As Double, y As Double)
  Dim Stage As ZiStageDevice
  Dim devices As ZiDevices

  Set devices = ZiApplication.devices
  Set Stage = devices.Open("Stage")

  With Stage
    .Step x, y, True
    'testar veloc max
    .XSpeed = 1100
    .YSpeed = 1100
    .UpdateParameters
  End With

End Sub
'Função que realiza uma calibragem no stage do microscópio
Public Sub calibrateStage()
  Dim Stage As ZiStageDevice
  Dim devices As ZiDevices

  Set devices = ZiApplication.devices
  Set Stage = devices.Open("Stage")

  'If Stage.Calibrated = False Then
  With Stage
    .Calibrate True
    .UpdateParameters
  End With
  'End If
End Sub
```


Módulo para controle dos polarizadores

Attribute VB_Name = "Polar"

'Controle dos Refletores do Microscópio

Public Sub Reflector(Filt As String)

Dim Reflector As ZiReflectorDevice

Dim devices As ZiDevices

Set devices = ZiApplication.devices

Set Reflector = devices.Open("Reflector")

Reflector.Reflector = Filt

Reflector.UpdateParameters

End Sub

'Controla Transmitted Light Filter 1

Public Sub Filter1()

Dim Filt As ZiFilterWheelDevice

Dim devices As ZiDevices

Set devices = ZiApplication.devices

Set Filt = devices.Open("TransmittedLightFilter1")

Filt.Filter = "100"

Filt.UpdateParameters

End Sub

'Controla Transmitted Light Filter 2

Public Sub Filter2()

Dim Filt As ZiFilterWheelDevice

Dim devices As ZiDevices

Set devices = ZiApplication.devices

Set Filt = devices.Open("TransmittedLightFilter2")

Filt.Filter = "100"

Filt.UpdateParameters

End Sub

'Controle dos Condensers do microscópio

Public Sub Condenser(cond As String)

Dim Condenser As ZiCondenserDevice

Dim devices As ZiDevices

Set devices = ZiApplication.devices

Set Condenser = devices.Open("Condenser")

'verificar se NA deve mudar. Talvez dependa da lente objetiva.

If Condenser.NA <> 0.19 Then

Condenser.NA = 0.19

End If

If Condenser.Initialize = ziDeviceInitStatusInitialized Then

Condenser.Contrast = cond

Condenser.UpdateParameters

End If

End Sub