

El procesamiento de imágenes de TLC como una nueva vía para la identificación de sustancias

TLC Image Processing as a New Way for Substances Identification

MSc. Francisco J. Silva-Mata, Ing. Dania Porro-Muñoz, Dra. Isneri Talavera-Bustamante,
Dra. Noslen Hernández-González, MSc. René Antonio Vázquez-Vallejo, Lic. Yenisel Pérez-Pérez
fjsilva@cenatav.co.cu; dpmunoz@cenatav.co.cu; italavera@cenatav.co.cu;
nhernandez@cenatav.co.cu



Centro de Aplicaciones de Tecnologías de Avanzada (CENATAV), La Habana, Cuba

● Resumen

La técnica analítica de cromatografía de capa fina es una de las más utilizadas actualmente para el análisis de sustancias. Este trabajo se enfoca en el análisis automático de las imágenes de dichas placas mediante métodos de procesamiento de imágenes y reconocimiento de patrones. El método propuesto consta de varias etapas como la captura, detección, recorte y rotación automática de las imágenes de la placa. Luego, se aplican algunos filtros para su mejoramiento y para poder detectar correctamente las manchas de las sustancias de interés. Por último, a partir de esa imagen se realiza la extracción automática de los descriptores de forma y color, y la determinación del valor del Rf para identificar la sustancia mediante el cálculo de la similitud con las sustancias patrones previamente almacenadas. El método presentado es evaluado mediante su aplicación en la identificación de drogas, obteniéndose resultados satisfactorios en la identificación de 44 drogas de abuso.

Palabras clave: cromatografía, TLC, automático.

● Abstract

The Thin-layer chromatographic analytical technique is one of the most currently used for the analysis of substances. This work is focused on the automatic analysis of such plate's images using image processing methods and pattern recognition methods. The proposed method consists of several steps as capture, detection, automatic cropping and automatic rotation of the mentioned images. Afterwards, a number of filters are applied to improve the image such that the stains of the substances of interest be correctly detected. Finally, from that image automatically extracting descriptors of shape and color, and Rf value determination is performed to identify the substance by calculating the similarity with the patterns substances previously stored. The presented method is evaluated in a drugs identification problem. Good results were obtained for identifying 44 abuse drugs.

Keywords: Chromatography, Thin Layer Chromatography, automatic.

● Introducción

La cromatografía de capa fina (TLC, traducido del inglés Thin-layer chromatography) es uno de los métodos más ampliamente usado para el análisis químico cualitativo /9/. Mediante el mismo es posible identificar sustancias o componentes de sustancias que se encuentren mezclados. A diferencia de otros

métodos como el HPTLC (High performance Thin-layer chromatography) /16/ el cual requiere de equipamientos de alto costo, la cromatografía de capa fina resulta mucho menos costosa /1/.

La utilización del procesamiento digital de las imágenes de TLC /17/ permite aumentar la precisión y velocidad del análisis cualitativo y cuantitativo de

las sustancias, ya que permite la cuantificación de los resultados del proceso y su análisis automático, mediante las técnicas de segmentación, descripción y clasificación de las imágenes de TLC capturadas por un escáner o una cámara digital /4,13/. Se brindan, además, nuevas posibilidades relacionadas con el mejoramiento de las imágenes afectadas por ruidos originados por el propio proceso fisicoquímico, la evaluación de la calidad del mismo y la comparación con resultados previamente almacenados.

Esta investigación ha tenido como objetivo la obtención de las herramientas matemáticas y computacionales necesarias para el análisis automático de las imágenes de TLC, utilizando como ejemplos experimentales, placas resultantes de análisis de drogas y medicamentos. En el presente artículo se presentan los métodos propuestos para la alineación y recorte automático de la imagen de la placa, así como el mejoramiento de las imágenes, la segmentación de las manchas propias de proceso y su descripción.

Resulta importante el cálculo automático del Rf (factor de retardo) /2/. Se proponen, además, diferentes medidas de similitud con el objetivo de

ayudar a identificar los componentes químicos. Por último, se presenta una propuesta de un método de la evaluación automática aproximada de la calidad del proceso de TLC basada en el análisis estadístico de la imagen /4/. Los resultados obtenidos son ejemplificados en las figuras y tablas presentadas en el documento.

Fundamentación teórica

La cromatografía de capa fina /5, 9/ tiene una **fase estacionaria** (un sólido o líquido depositado sobre un sólido) y una **fase móvil** (un líquido o gas). La **fase móvil** viaja a través de la **fase estacionaria** y junto con ellas se desplazan los componentes químicos mezclados a diferentes velocidades. La **fase estacionaria** es comúnmente un gel de silica (o alúmina) depositado sobre un papel o cristal. La **fase móvil** es un disolvente o una mezcla de disolventes /9/. Las figuras 1 y 2 muestran básicamente el proceso y los resultados.

Cuando el disolvente alcanza la altura máxima de la placa, la misma es extraída del beaker. Luego se miden las distancias recorridas por el disolvente y por

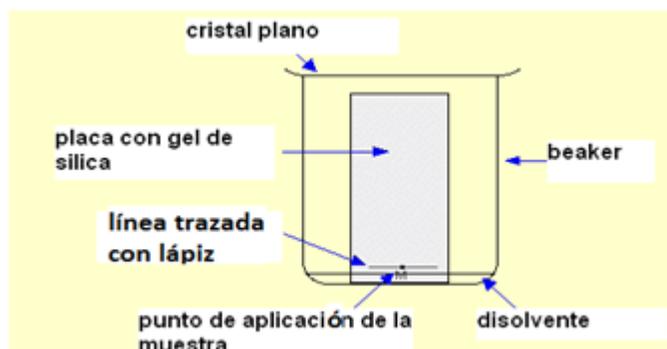


Fig. 1 Diagrama representativo de un proceso de TLC.

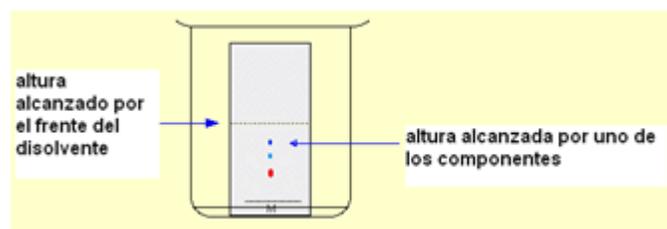
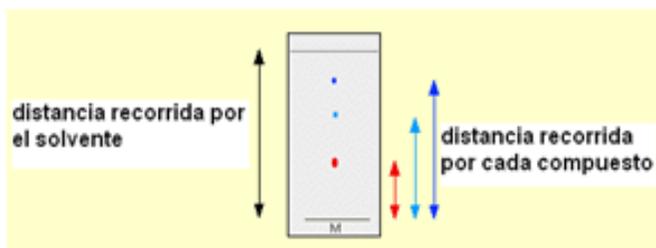


Fig. 2 Diagrama representativo de los resultados de un proceso de TLC.

las diferentes manchas correspondientes a los diferentes compuestos químicos mezclados. Para la identificación de los compuestos químicos se calcula la magnitud del R_f (factor de retardo) a partir de las distancias medidas /2/ según la fórmula 1. La Fig. 3 muestra esquemáticamente las diferentes distancias necesarias para el cálculo de R_f .

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el componente}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$



Aunque el valor del R_f aporta información básica para la identificación de cada compuesto químico de interés, no es el único elemento a tener en cuenta para la identificación final de las sustancias de interés. Esta información se complementa con la determinación del color y la forma de cada mancha. Todo el proceso se realiza originalmente de forma manual/1/.

Nuestro enfoque radica en la utilización de técnicas avanzadas de procesamiento de imagen /4,8/ y reconocimiento de patrones con el objetivo de automatizar el proceso de identificación de sustancias, evitando al unísono los errores que se cometen en la determinación manual de los centroides de las manchas y las mediciones, así como automatizando el proceso de comparación con los patrones previamente almacenados o conocidos /5/. Por otra parte, mediante estos métodos la evaluación de la forma y el color que se realiza bajo el criterio del especialista es sustituida por una evaluación cuantitativa, lo que permite una mayor precisión y estandarización del método de identificación.

Métodos utilizados y condiciones experimentales

A continuación se describen los métodos utilizados para la realización de este trabajo para el cual se contó con un conjunto de 44 drogas de abuso y los reactivos necesarios para la realización de los experimentos de cromatografía de capa fina.

Procesamiento de las imágenes de TLC

Para el procesamiento automático de las imágenes de las placas de TLC se han propuesto los siguientes

pasos descritos en la figura 4, los cuales son explicados en detalle posteriormente.

Descripción detallada de cada paso del procesamiento de la imagen

Captura de la imagen mediante escáner o cámara digital

La captura de la imagen puede realizarse mediante una cámara digital o un escáner, mediante WIA (Windows Image Acquisition) /3/, lo cual permite la utilización directa de una interfaz de Windows, evitando de esta forma el uso de la interfaz Twain que normalmente es propietaria. WIA permite las operaciones de visualización previa, selección del área de interés, y almacenamiento en los formatos necesarios para el trabajo mediante cualquiera de los equipos de captura utilizados, cámaras digitales, escáneres, cámaras de video, etcétera. /3/.

Detección automática de la placa y recorte

El proceso de detección automática de la placa, se realiza mediante la aplicación de la transformada de Hough de la recta /1,10/. De esta forma se detectan las líneas rectas que constituyen los bordes de la placa así como el ángulo (cita) de las mismas que se obtiene

de forma directa de la propia transformada. Este ángulo sirve posteriormente para aplicar el paso 3 y lograr rotar automáticamente la imagen para alinearla correctamente.

Rotación automática

Según el ángulo obtenido mediante el paso anterior se realiza la rotación de la imagen de forma automática sin la intervención del operador.

Detección de la línea base

En el proceso de TLC, la línea base es considerada aquella sobre la cual es depositada la muestra o patrón para ser analizada. La misma es trazada con un lápiz de grafito y se encuentra en la parte inferior de la placa de sílica /9/. La única línea recta interior que es detectada en la placa, es la línea base y, por tanto, también es detectada mediante la aplicación de la transformada de Hough de la recta.

Como puede ocurrir que al realizar este proceso se obtenga más de una recta, se tomará como la coordenada y de esta línea, el valor medio de los valores de R_0 obtenidos de la transformada de Hough. La línea base es fundamental porque a partir de ella se realizan las mediciones de distancias necesarias para el cálculo de los factores de retardo /2/.

Detección y segmentación de las manchas

La detección de las manchas se realiza básicamente mediante la siguiente secuencia de pasos /10/.

1. Conversión de la imagen a tonos de grises.
2. Determinación del umbral para la binarización de la imagen.
3. Detección de los bordes de cada mancha.
4. Marcado de los bordes y almacenamiento de la secuencia de píxeles de los mismos.

En el 99 % de las manchas obtenidas en los experimentos, las mismas se produjeron con coloraciones que una vez transformadas en tonos de grises son más oscuras que el fondo de la imagen. Sin embargo el problema de obtener el mejor umbral aunque ha sido enfocado mediante diferentes métodos abordados en la literatura /12/ depende muchas veces del contexto y de los intereses del usuario.

Esta situación ocurre en nuestro caso, en el cual los algoritmos de umbralización que normalmente son recomendados en la literatura no arrojaron buenos resultados, produciéndose errores de umbralización /12/. Con vista a la solución de este problema y teniendo en cuenta las particularidades del histograma promedio de los tonos de grises de estas imágenes, se propuso la siguiente solución que permitió la segmentación exitosa del 99 % de las manchas analizadas, en los casos de imágenes con buena calidad.

A partir del histograma de tonos de grises de la imagen, se busca iterativamente el valor de la pendiente de la envolvente del mismo, en la zona de mayor probabilidad de ocurrencia del umbral que separa las manchas oscuras del fondo de la imagen. Mediante un proceso de aprendizaje se obtuvo el valor de esta pendiente que se obtiene mediante el cálculo de la derivada de la envolvente del histograma, de forma que el valor inicial del umbral será obtenido mediante este criterio. No obstante, si el resultado obtenido mediante el proceso de segmentación no es el adecuado se le da la posibilidad al usuario de ajustarlo mediante un control. En la figura 5 se muestra la determinación del umbral inicial a partir del histograma de tonos de grises de la imagen de TLC.

Sucede que en los casos donde la calidad de la imagen no es buena, las manchas se presentan con tonalidades débiles comparables a las tonalidades del fondo /12/. Estos casos de manchas débiles fueron resueltos mediante una secuencia de pasos diferentes:

1. Aplicación de un algoritmo de segmentación piramidal.
2. Binarización de la imagen.
3. Detección de los bordes de cada mancha.
4. Marcado de los bordes y almacenamiento de la secuencia de píxeles de los mismos.

La segmentación piramidal se basa en la construcción de pirámides hasta determinados niveles, de forma que el enlace entre píxeles en el mismo nivel, se produce si los píxeles adyacentes cumplen determinadas relaciones.

Filtraje y mejoramiento

Como resultado del proceso químico de las placas de TLC se producen ruidos que pueden afectar el proceso de detección y segmentación de las manchas

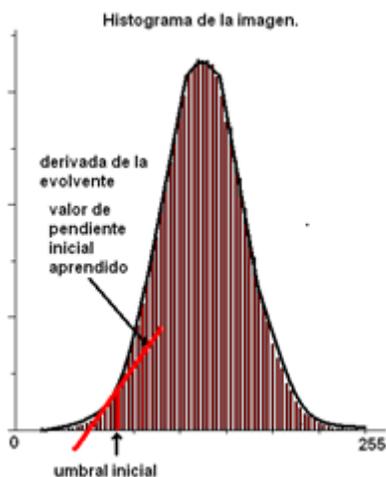


Fig. 5 Determinación del umbral inicial.

de interés /11,15/. En tal caso, se aplican filtros de suavizamiento que disminuyen el efecto negativo de estos ruidos. Como ejemplo se puede ver en la siguiente imagen de TLC (figura 6) el ruido presente antes y después de la aplicación de un filtro gaussiano.

El resto de las operaciones de mejoramiento y filtrado consiste en la eliminación de aquellas manchas que por sus características, específicamente por sus dimensiones no pueden ser manchas correspondientes a sustancias. La forma de eliminarlas es sumamente simple ya que son suprimidas cuando superan un umbral de tamaño (área de la mancha) mayor que los valores máximos previamente acordados.

Determinación de la calidad mediante análisis del histograma

Con el objetivo de medir la calidad del proceso químico y de la imagen obtenida se realizó el estudio de diferentes medidas estadísticas. Como resultado de este estudio y mediante la realización de experimentos comprobatorios se demostró que en el 98 % de los casos estudiados, las medidas estadísticas conocidas como Esbeltez (Kurtosis) y Excentricidad (Skewdness)

/18/, pueden ser muy útiles para evaluar la calidad de las imágenes tomadas de las placas. Esa calidad puede evaluarse de forma

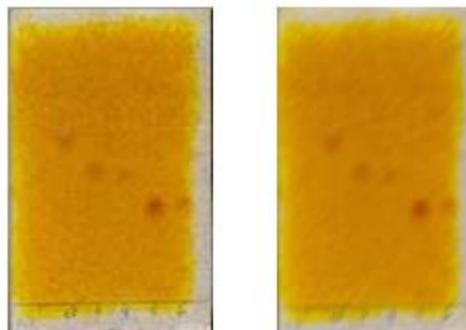


Fig. 6 Presencia de ruido antes y su disminución después de la operación de filtrado mediante suavizado gaussiano.

aproximada si se conoce la forma del histograma de la imagen, en particular las características mencionadas anteriormente.

En la imagen de la placa de la izquierda puede observarse la presencia de ruido que afecta la calidad de la imagen, lo que se expresa en los valores relativamente bajos de la esbeltez y la excentricidad

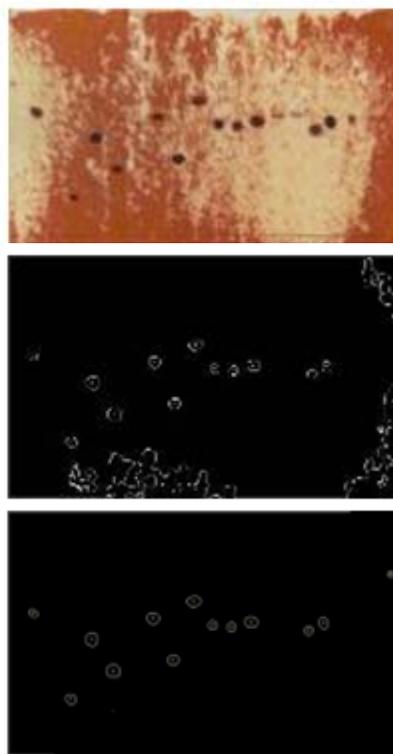


Fig. 7 Eliminación de las manchas que superan el tamaño permitido.

acordes a su histograma de tonos de grises. En la imagen de la placa de la derecha pueden observarse los altos valores de estas medidas y su correspondiente histograma que corresponde a una alta calidad de la imagen.

Determinación de los centroides y cálculo del Rf

La determinación de los centroides y la correspondiente medida de las distancias para el

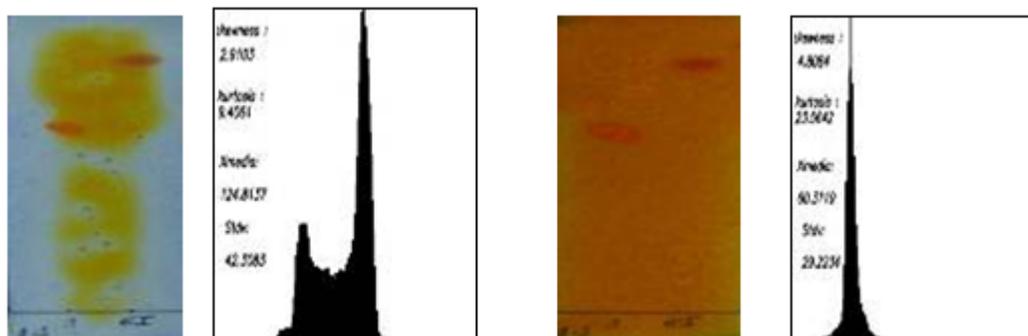


Fig. 8 Imágenes y sus histogramas con los valores correspondientes de estas dos medidas estadísticas.

cálculo del Rf se realiza de forma automática. Esto supone una ventaja notable respecto al método manual de medición donde la determinación del centro de la mancha se realizaba por apreciación del usuario. En la figura 9 se observa el resultado del proceso, mediante una visualización de las manchas y sus respectivos centroides.

Extracción de rasgos (descriptores de forma)

Una vez segmentadas las manchas se procede a la extracción de los descriptores de forma, correspondientes a la ROI (región de interés). El vector que describe cada mancha está conformado por variables que caracterizan la forma de cada mancha, mostrados en la tabla 1

Extracción de rasgos (descriptores de color)

El color de las manchas en la cromatografía de capa fina brinda información valiosa para la identificación final de las sustancias analizadas /14/. Una vez determinada la ROI (región de interés de la mancha) se procede a extraer los histogramas de color de cada uno de los planos de color R(rojo), G(verde) y B(azul), esta información es guardada y asociada a la mancha de donde fue extraída.

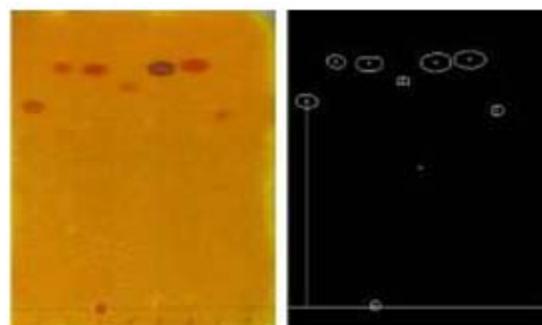


Fig. 9 Obtención de los centroides y medida para el cálculo del Rf.

Cálculo de similitud de Rf, forma, color y similitud conjunta

Para la identificación del componente químico asociado a cada mancha, es necesario determinar el grado de similitud de los valores del factor de retardo, la forma y el color respecto a los patrones de sustancia almacenados previamente. Aunque no se ha encontrado una cuantificación exacta del aporte de cada una de estas similitudes en la toma de la decisión sobre la identidad del componente, se cuenta con valores internacionalmente reconocidos del Rf para cada sustancia en cada uno de los sistemas. Estos valores aparecen reflejados en la literatura especializada. No obstante, la experiencia de los experimentos efectuados demuestra que los valores de Rf absolutos son difíciles de obtener, debido a

TABLA 1. DESCRIPTORES DE FORMA QUE SON EXTRAÍDOS AUTOMÁTICAMENTE DE CADA MANCHA

0. Alto Máximo	(Altura máxima de la mancha)
1. Ancho Máximo	(Ancho máximo de la mancha)
2. Área	(Total de píxeles de la mancha)
3. Perímetro	(Total de píxeles que contiene el contorno de la mancha)
4. Relación Área-Perímetro	(Relación entre los dos anteriores)
5. Área Complementaria	(Diferencia entre el área de la mancha y la caja contenedora)
6. Ángulo(cita)	(Ángulo de inclinación del eje principal de la mancha)
7. Área Caja	(Total de píxeles de la caja contenedora)
(Momentos de Hu)	
8. Hu1	
9. Hu2	
10. Hu3	
11. Hu4	
12. Hu5	
13. Hu6	
14. Hu7	
15. Momentos de legendre	

todos los requerimientos y condiciones para la realización de los experimentos similares a los reportados por la literatura /7/.

Los especialistas en análisis químico han recomendado el cálculo del Rf relativo, que no es

más que la relación entre el Rf absoluto de la sustancia analizada y el Rf absoluto de una sustancia patrón o estándar interno. El resultado de la identificación de la sustancia bajo análisis, de acuerdo al Rf, dependerá de la relación o cociente entre los Rf relativos, el almacenado previamente

TABLA 2. DESCRIPTORES DE COLOR QUE SON EXTRAÍDOS AUTOMÁTICAMENTE DE CADA MANCHA

77.	Histog R	Histograma de 256 bins de componente rojo
85.		
86.	Histog G	Histograma de 256 bins de componente verde
94.		
95.	Histog B	Histograma de 256 bins de componente azul
103.		

para cada sustancia y el obtenido durante el análisis de la imagen.

La importancia de la similitud del Rf es crucial para la identificación de la sustancia, no obstante también se tienen en cuenta las similitudes de forma, basado en el cálculo de la distancia euclidiana

entre los valores de los vectores que describen la sustancia bajo análisis y el vector que describe la sustancia patrón y de color, calculando la distancia entre los histogramas de color obtenidos y almacenados mediante la fórmula de distancia de histogramas /10/.

La decisión final sobre la identidad del compuesto, recae sobre el usuario, pero él mismo cuenta con los tres valores de similitud mencionados y además con un valor de similitud conjunta que reúne el aporte de los tres valores de similitud. Inicialmente esta similitud contendrá el promedio de las tres anteriormente mencionadas, y posteriormente se va asignando a cada una un peso mediante un proceso de aprendizaje supervisado.

Almacenamiento y visualización de los resultados

Como resultado del proceso de identificación de las manchas se obtiene una tabla de las sustancias más similares y una imagen auxiliar con las manchas segmentadas en blanco con el fondo negro y el centroide en rojo, como se muestra en la figura 10.

En el ejemplo de la figura 10, los carriles 1 y 3 arrojaron el resultado de la identificación de la Carbamazepina con más de un 99 % de similitud

respecto al patrón almacenado de esta sustancia. Como resultado complementario puede verse en la figura 11 la tabla con las cinco sustancias más similares respecto a los patrones almacenados.

Resultados

Se realizó mediante cromatografía de capa fina la identificación de 44 sustancias incluidas dentro del grupo de drogas de abuso. En estos experimentos se evaluó el comportamiento del método teniendo en cuenta solamente el valor del Rx.

El Rx se calculó en cada placa como el cociente entre los Rf de la sustancia y el Rf del estándar interno respectivamente. Para todos los experimentos se utilizó como estándar interno la clorpromazina. Se utilizaron como fase móvil acetato de etilo: metanol: amoníaco, metanol: amoníaco, cloroformo n-butanol y tolueno: metanol: dietilamina.



Fig. 10 Respuesta que se obtiene para cada mancha y el por ciento de similitud con el patrón almacenado de la misma.

Como reveladores se usaron, básicamente, yodoplatinato, dragendorff, vainillin, ninhidrin difenilcarbazona y azul rápido B. Para evaluar los

resultados del proceso puede dividirse el mismo en tres etapas básicas: segmentación, análisis de la calidad e identificación.

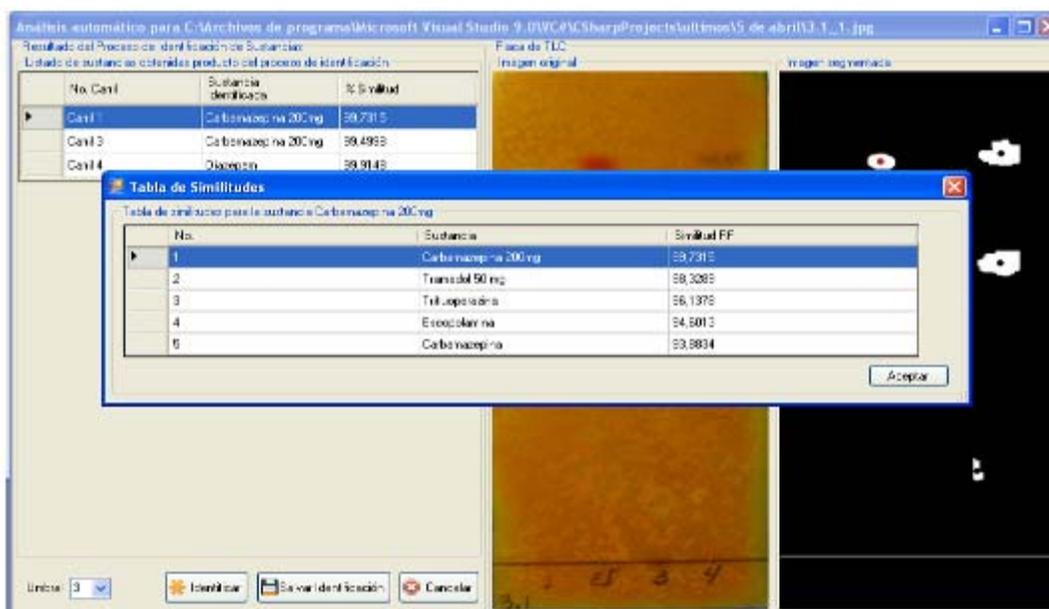


Fig. 11 Tabla con las cinco sustancias más similares a la mancha del carril 1.

Resultados de la segmentación

Tomando como referencia la segmentación manual realizada por los especialistas, el proceso de segmentación arrojó los siguientes resultados:

El 98 % de las manchas verdaderas fueron detectadas y segmentadas. De estas, un 10 % fueron correctamente detectadas, sin embargo no fueron segmentadas de forma similar a la segmentación realizada de forma manual por los especialistas. Debe señalarse que este error no determinó en la identificación, pues los errores de segmentación no variaron significativamente la posición de los centroides a partir de los cuales se calcula el Rf.

Según la evaluación de la calidad de las placas de TLC en tres categorías buena, regular y mala, el proceso de evaluación automática de la calidad proyectó lo siguiente:

En el 95 % de las placas la evaluación propuesta por los especialistas coincidió con la realizada de forma automática.

Como resultado final del experimento se llevó a cabo el análisis de 44 drogas diferentes de forma

manual y automática, obteniéndose los resultados siguientes:

De 44 sustancias se identificaron perfectamente 40 sustancias (95 %) con más del 90 % de similitud. Las sustancias identificadas siempre se encontraron entre las tres más similares.

Las sustancias que fueron mal identificadas o mayormente no identificadas entre las cinco más similares fueron: metilfenidato, flufenazina, amitriptilina y efedrina.

Como razones de los errores de identificación se encontraron fundamentalmente la mala calidad de los patrones y la presencia de ruidos ocasionados por defectos en las placas de silica o debido a la distribución no homogénea de algunos reveladores por defectos en el trabajo con el atomizador.

Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron la efectividad de los métodos propuestos. Sin embargo la experiencia durante la realización de los experimentos aportó elementos que pueden

mejorar los resultados obtenidos hasta el momento. Las principales causas de error tienen su origen en las deficiencias en el proceso químico. En algunos casos, el efecto borde provocó la deformación de las manchas de los carriles más externos; en otros, la existencia de ruidos provocados por errores de iluminación durante la captura de la placa o por el comportamiento no homogéneo del proceso.

No obstante, se demostró la factibilidad de automatización del proceso de análisis de las placas de TLC, con las correspondientes ventajas, relacionada con la eliminación de los errores de medición que introducen los especialistas y el incremento de la eficiencia general del proceso de identificación de sustancias.

El trabajo futuro debe estar dirigido al perfeccionamiento de la disciplina tecnológica del proceso, así como al mejoramiento de los patrones, lo que requiere un mayor conjunto de experimentos que garanticen la repetitividad del proceso. Además, debe evaluarse con un mayor número de ejemplos la validez de la similitud de forma y color, cuyos resultados no se reportan en el presente trabajo, ya que solo se realizaron los experimentos básicos que demostraron la factibilidad del proceso de extracción de los descriptores de estas características.



Bibliografía

1. IRISH HESS, A. V. "Digitally Enhanced Thin-Layer Chromatography: An Inexpensive, New Technique for Qualitative and Quantitative Analysis". *Journal of Chemical Education*. May 2007, vol. 84, No. 5.
2. SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; HOLLER, F. J. *Principios de análisis instrumental*. 6a ed. México: Cengage Learning Editors, 2008. ISBN-13:978-970-686-829-9.
3. CAMAG TLC. "Scanner 3 with winCATS Software". 2012. [ref. de septiembre 2012] Disponible en Internet: <<http://www.kobis.si/material/Scanner3brochure.pdf>>.
4. DOJAN, D. J.; BAHERI, T.; KARIMIAN, G.; SHAHIDI, M. "Forensic discrimination of blue ballpoint pen inks based on thin layer chromatography and image analysis". *Forensic Science International*. 2008, 179, 2-3, p. 199-205.
5. HAHN-DEINSTROP, E.; LEACH, R. G. *Applied thin-layer chromatography: best practice and avoidance of mistakes, second edition*. 2a ed. Alemania: Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. 314 p. ISBN-13: 9783527315536.
6. FERNÁNDEZ CALVO, M. I. *Cromatografía en capa fina de los componentes del Cannabis*. Sector de Enseñanza de CSI-F en Sevilla, 2009. 105 p. ISBN 978-84-692-6534-5.
7. HASSAN, F.; ASKALL; ALAA, S. K.; IBRAHIM, A. D.; RAMADAM, M. "Quantitative Thin-Layer Chromatographic Method for Determination of Amantadine Hydrochloride". *International Journal of Biomedical Science*. 2008, 4, 2, p. 155-160.
8. Interpol. "Thin layer chromatographic and Image Analysis". 2013. [ref. de septiembre de 2012]. Disponible en Internet: <<http://www.interpol.int/Public/Forensic/IFSS/meeting15/posters/ThinLayerChromatographyandImageAnalysis.pdf>>.
9. SHERMA, J.; FRIED, B. *Handbook of Thin Layer Chromatography*. 3a ed. Nueva York: Marcel Dekker Inc., 2003, 1048 p. ISBN 0-203-91243-8.
10. RIESENBERG, L.; VAN PELT, B. "Characterization of Medicinal Properties of Cannabis sativa". L. Roots. [ref. de Septiembre 2012]. Disponible en Internet: <<http://www.hemp-eaze.com/apps/forums/topics/show/71104072>>.
11. SAJEWICS, M.; PIETKA, R.; PIENIAK, A.; KOWALSKA, T. "Application of Thin-Layer Chromatography (TLC) to investigating oscillatory instability of the selected Profen Enantiomers". *Acta Chromatographica*. 2006, 16, p. 181-191.
12. MEDINA-CARNICER, R.; MUÑOZ-SALINAS, R.; CARMONA-POYATO, A.; MADRID-CUEVAS, F. J. "A novel histogram transformation to improve the performance of thresholding methods in edge detection". *Pattern Recognition Letters*. 2011, 32, 5, p. 676-693.
13. LANCASTER, M.; GOODALL, D. M.; EDMUND, T.; BERGSTROM, M.; MCCROSSEN, S.; MYERS, P. "Real-Time Image Acquisition for Absorbance Detection and Quantification in Thin-Layer Chromatography". *Analytical Chemistry*. 2006, 78, 3, p. 905-911.
14. GHEROGHE, M.; BLLU, D.; ILIE, M.; BACONI, D. L.; CIOBANU, A. M. "Qualitative Analysis of

- Confiscated Illegal drugs by Thin-Layer Chromatography". *Farmacia*. 2008, 56, 5, p. 541-546.
15. PROSEK, M.; GOLC-WONDRA, A.; VOVK, I.; ZMITEK, J. "The Importance of Controlled Drying in Quantitative TLC". En: *Symposium Planar Chromatography*. Siófok, Hungary, May 29–31, 2005.
16. BELCHAMBER, R. M, READ, H.; ROBERTS, J. D. M. "Image processing of high-performance thin-layer chromatographic plates". *Journal of Chromatography*. 1987, vol. 395, 12, p. 47-53.
17. MUSTOE, S.; MCCROSSEN, S. "TLC Image Capture and Analysis by use of a Prototype Device for Visualizing Fluorescence". En: *Symposium Planar Chromatography 2001*. Lillafüred, Hungary, June 2001, p. 23–25.
18. SPIEGEL, M. *Teoría y Problemas de Estadística*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1977.