

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2012.02.29	(73) Titular(es): TRINEAN NV DULLE-GRIETLAAN 17 BUS 3 9050 GENTBRUGGE BE
(30) Prioridade(s): 2011.03.01 US 2011.05.29 EP 11168005 2012.01.03 GB 201200031	(72) Inventor(es): TOM BOONEFAES BE
(43) Data de publicação do pedido: 2014.01.08	(74) Mandatário: MARIA TERESA DELGADO AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2015.04.08 164/2015	

(54) Epígrafe: **DETERMINAÇÃO DE ADN E/OU ARN A PARTIR DE DADOS DE ESPETROFOTÓMETRO UV-VIS**

(57) Resumo:

É DESCRITO UM MÉTODO PARA ANALISAR DADOS DE ESPETROFOTÓMETRO UV-VIS DE UMA AMOSTRA QUE COMPREENDE ADN E/OU ARN. O MÉTODO COMPREENDE RECEBER DADOS DE ESPETROFOTÓMETRO UV-VIS, AJUSTAR OS DADOS DE ESPETROFOTÓMETRO UV-VIS TENDO EM CONSIDERAÇÃO PELO MENOS UM ESPETRO REPRESENTATIVO DE UM PAR DE BASES SENDO QUALQUER UM DE MAIS DE ADENINA-TIMINA (AT) OU GUANINA-CITOSINA (GC) OU ADENINA-URACILO E DERIVAR DO AJUSTE UMA QUANTIFICAÇÃO DE UMA QUANTIDADE DE ADN E/OU ARN.

RESUMO**"DETERMINAÇÃO DE ADN E/OU ARN A PARTIR DE DADOS DE
ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS"**

É descrito um método para analisar dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma amostra que compreende ADN e/ou ARN. O método compreende receber dados de espectrofotómetro UV-VIS, ajustar os dados de espectrofotómetro UV-VIS tendo em consideração pelo menos um espectro representativo de um par de bases sendo qualquer um de mais de adenina-timina (AT) ou guanina-citosina (GC) ou adenina-uracilo e derivar do ajuste uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN.

DESCRIÇÃO

"DETERMINAÇÃO DE ADN E/OU ARN A PARTIR DE DADOS DE ESPETROFOTÓMETRO UV-VIS"

Campo da Invenção

A invenção relaciona-se com o campo de caracterização de amostras. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a métodos e sistemas para analisar amostras utilizando espectros gravados, tais como, por exemplo, para analisar amostras que compreendem ADN e/ou ARN.

Antecedentes da invenção

Apesar de existirem numerosas técnicas de análise para qualificação e quantificação de amostras, apenas poucas técnicas de análises são tão simples de realizar, rápidas e precisas como a espectrofotometria. Um exemplo de espectrofotometria é a espectroscopia de absorvância UV-VIS. Durante tais experiências, as amostras são irradiadas com radiação UV-VIS de diferentes comprimentos de onda, sendo detetada a radiação remanescente após passagem através da amostra e determinada a absorvância a diferentes comprimentos de onda. Como componentes particulares mostrarão uma absorvância particular a comprimentos de onda particulares, pode ser utilizado tal perfil específico de absorvância como uma impressão digital que permite, na comparação com espectros de referência, identificar os componentes. Quando são estudadas amostras mais complexas, as características de absorvância no espectro podem ser mais amplas, tornando a interpretação dos espectros substancialmente mais difícil.

Várias técnicas de análise espectrais diferentes foram descritas no passado. Alguns métodos são providenciados permitindo a determinação da concentração ou concentração relativa dos componentes de uma amostra com base na aproximação dos espectros medidos com uma combinação linear

de espectros padrão, também referidos como de referência, dos componentes individuais. Pode ser realizada uma aproximação do espectro medido com espectros de referência utilizando técnicas de minimização para ajustar os espectros de referência aos espectros de absorção, tais como, por exemplo, regressão dos mínimos quadrados ou regressão dos mínimos desvios absolutos. Tais métodos também podem ser aplicados iterativamente.

Também são conhecidos métodos mais complexos, tais como métodos que utilizam derivados de um espectro, como entre outros o último pode permitir aumentar a insensibilidade a alterações de comprimento de onda. Um exemplo de um método que utiliza derivados é a análise de uma mistura de proteínas que utiliza o segundo espectro derivado da amostra. Outro método conhecido baseia-se na computação de matriz para determinar a concentração de um número de componentes químicos usando um número de dados espectrais pré-determinados de cada componente químico, pelo que o número de dados espectrais pré-determinados é superior ao número de componentes químicos a ser determinado. Alguns dos métodos conhecidos são baseados na correlação cruzada de amostras e espectros de referência, sendo ambos ponderados através da transmitância média por comprimento de onda. Foram descritas aplicações particulares para analisar amostras com composição conhecida, tais como, por exemplo, análise da composição de uma proteína utilizando espectroscopia eletromagnética, análise de ARN em que as amostras são divididas quimicamente em frações AC e GU e a composição AC e GU é depois determinada com base na absorção a 260nm.

Além disso, também se conhecem alguns métodos que lidam com espectros de componentes desconhecidos. São conhecidos métodos em que a separação de espectros de componentes desconhecidos de amostras é baseada na programação de restrição linear ou quadrática e transformados da amostra,

isto é, transformadas de onduletas. Outros métodos utilizam espectros aproximados de componentes por correlação cruzada em relação aos pontos da absorvância e utilizam concentração conhecida. Várias técnicas utilizam a análise de componentes principais (PCA) para obter espectros de referência diagnosticamente relevantes de uma base de dados de espectros associados com estados de doença pelos quais a correlação com espectros de referência é utilizada para auxiliar o diagnóstico de uma nova amostra.

Spjøtvoll et al. descrevem em *Technometrics* 24 (1982) uma técnica para determinar espectros e concentrações de misturas com dois constituintes baseada num estimador de mínimos quadrados. Um método é discutido para identificação de dois compostos químicos desconhecidos e de uma estimativa da sua proporção num conjunto de misturas desconhecidas dos dois compostos. É baseada num ajuste de mínimos quadrados e análise de componentes principais para separação, pela qual são introduzidas restrições adicionais, tais como sendo a soma das concentrações iguais à unidade e sendo as concentrações e espectros não negativos.

A utilização de dados de espectrofotómetro UV-VIS para quantificação ou análise de ADN e/ou ARN ainda não encontrou o seu avanço devido à falta de uma técnica de análise precisa e eficiente para os resultados obtidos.

O documento US7786295 descreve um método implementado por computador para analisar dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma amostra que compreende ADN e/ou ARN, sendo o método adequado para isolar ADN de amostras biológicas. O documento EP1524514 descreve um método de medir uma concentração de ADN que utiliza dados de espectrofotómetro UV-VIS.

Portanto, existe uma necessidade de um método permitir análises de amostras que compreendem componentes ADN e/ou ARN, particularmente utilizando espectroscopia UV-VIS.

Sumário da invenção

É um objeto de modalidades da presente invenção providenciar bons métodos e sistemas para analisar espectros de espectroscopia UV-VIS de amostras e bons métodos e sistemas correspondentes para caracterizar amostras que compreendem ADN e/ou ARN. A amostra compreende, com vantagem, ADN de cadeia dupla, apesar de a técnica também poder ser utilizada para amostras que compreendem apenas ARN. Os espectros de espectroscopia UV-VIS podem ser espectros de absorvância UV-VIS.

É uma vantagem das modalidades, de acordo com a presente invenção, que sistemas e métodos sejam providenciados permitindo assistir na análise PCR, por exemplo, sem a necessidade de purificar a mistura da reação, mesmo se a mistura da reação é uma mistura de 4 dNTP, iniciador oligo, enzima polimerase e ADN na amostra.

É uma vantagem que métodos e sistemas, de acordo com modalidades da presente invenção, permitam obter resultados relevantes e conclusivos.

O objetivo anterior é atingido por um método e dispositivo, de acordo com a presente invenção.

A presente invenção refere-se a um método implementado por computador para analisar dados de espectrofotômetro UV-VIS de uma amostra que compreende pelo menos ADN e/ou ARN, sendo, com vantagem, pelo menos ADN e/ou ARN pelo menos ADN de cadeia dupla, compreendendo o método receber dados de espectrofotômetro UV-VIS, ajustar os dados de espectrômetro UV-VIS tendo em consideração pelo menos um espectro representativo para um par de bases sendo qualquer um de adenina-timina (AT) ou guanina-citosina (GC) ou adenina-uracilo (AU) e derivar do ajuste uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN, sendo o derivar, com vantagem, derivar do ajuste uma quantificação de uma quantidade de ADN de cadeia dupla. É uma vantagem das modalidades da presente invenção que dados de espectrofotômetro UV-VIS

possam ser utilizados para caracterizar, sem muito conhecimento prévio, uma amostra que contém ADN e/ou ARN. A quantificação pode ser quantificação de uma quantidade de ADN de cadeia dupla (dsADN).

O dito ajuste pode compreender ter em consideração um conjunto de espectros de referência representativos para dois conteúdos de pares de bases diferentes. Os espectros representativos para conteúdos de pares de bases diferentes podem ser representativos para conteúdos de pares de bases que diferem pelo menos 20%, com vantagem, pelo menos 30%, com mais vantagem, pelo menos 40%, por exemplo, pelo menos 50%.

O dito ajuste pode compreender tomar em consideração um conjunto de dois espectros de referência representativos de dois conteúdos em GC distintos.

O dito ajuste pode compreender tomar em consideração um conjunto de exatamente dois espectros de referência representativos para dois conteúdos em GC distintos.

O dito ajuste pode compreender ajustar dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma amostra que compreende ADN e/ou ARN com pelo menos 50 pares de bases, com vantagem, pelo menos 100 pares de bases. É uma vantagem, de acordo com modalidades da presente invenção, que um ajuste possa ser obtido utilizando um número restrito de espectros de referência para pares de bases, resultando num ajuste preciso e eficiente.

A amostra pode compreender ADN e o ajuste pode compreender utilizar uma combinação de um conjunto de espectros de referência representativos para pares de bases e sendo os espectros de referência representativos para bases azotadas separadas.

Dito ajuste utilizando uma combinação de espectros de referência representativos para pares de bases e sendo os espectros de referência representativos para bases azotadas separadas pode compreender ajustar utilizando espectros

sendo a diferença de espectros entre espectros de referência representativos para pares de bases e espectros de referência representativos para bases azotadas separadas. É uma vantagem das modalidades, de acordo com a presente invenção, que para a análise de uma amostra que compreende ADN, o equilíbrio AT e GC seja automaticamente tido em consideração. É uma vantagem das modalidades da presente invenção que apenas o ADN de cadeia dupla formado seja quantificado e não uma mistura dos dsADN e os amplicões formados que podem ocorrer, por exemplo, em PCR.

A diferença de espectros entre espectros de referência representativos para pares de bases e espectros de referência representativos para bases azotadas separadas podem ser espectros obtidos subtraindo de um determinado espectro de referência representativo para um determinado par de bases, sendo os espectros de referência representativos para as correspondentes bases azotadas separadas.

O conjunto de espectros representativos para pares de bases pode consistir em dois espectros de referência representativos para amostras com dois, por exemplo, dois conteúdos em GC extremos diferentes.

Os espectros de referência representativos de bases azotadas separadas podem ser espectros de referência para adenina, guanina, timina, citosina e/ou uracilo.

O método pode ser adaptado para analisar uma reação PCR de uma amostra que compreende ADN, pela qual o derivar pode compreender determinar uma quantidade de ADN de cadeia dupla formado durante ou após uma reação PCR. É uma vantagem das modalidades, de acordo com a presente invenção, que a análise possa ser feita de uma reação PCR de uma amostra que compreende ADN utilizando espectrometria UV-VIS, sem a necessidade de purificar primeiro a mistura da reação formada durante a reação PCR.

Ajustar pode ainda compreender ter em conta um

componente espectral para um componente de contaminação.

Ter em consideração um componente espectral para um componente de contaminação pode compreender ter em consideração um componente espectral, por exemplo, para um ou mais de trimetilglicina, guanidinatiocianato, fenol, ácido etilenodiaminatetracético, proteínas ou hemoglobina. É uma vantagem das modalidades, de acordo com a presente invenção, que possa ser obtida compensação para um dos contaminantes mais importantes na reação PCR.

Ajustar os dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma amostra pode compreender ajustar dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma mistura que compreende trifosfatos de desoxinucleotídeos, iniciadores oligo e polimerase e ADN. É uma vantagem das modalidades, de acordo com a presente invenção, que possam ser utilizados os dados de espectrofotómetro UV-VIS gravados diretamente na mistura de partida da PCR, apesar de ter um valor de densidade ótica elevada a 260nm, evitando, assim, a necessidade de processamento, por exemplo, purificação, da mistura de partida da PCR antes da caracterização.

Ajustar pode ainda compreender ter em consideração um ou mais componentes espectrais representativos para dispersão na amostra.

Ajustar pode ainda compreender ter em consideração um ou mais componentes espectrais representativos para turbidez na amostra.

A presente invenção também se refere a um sistema implementado por computador para analisar dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma ou mais amostras que compreendem ADN e/ou ARN, com vantagem, uma ou mais amostras que compreendem pelo menos ADN de cadeia dupla, compreendendo o sistema um meio de entrada para receber ditos dados de espectrofotómetro UV-VIS, um meio de processamento programado para ajustar os dados de espectrofotómetro UV-VIS tendo em consideração pelo menos um

espectro representativo para um par de bases sendo qualquer um de adenina-timina (AT) ou guanina-citosina (GC) ou adenina-uracilo (AU) e derivar do ajuste uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN, com vantagem uma quantidade de ADN de cadeia dupla e um meio de saída para produzir uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN, com vantagem, a quantidade de ADN de cadeia dupla para ditas uma ou mais amostras sob estudo.

Dito meio de processamento pode ser adaptado para realizar o ajuste, conforme descrito em qualquer um dos métodos anteriormente mencionados.

A presente invenção também se refere à utilização de um método, conforme descrito anteriormente, para quantificar uma quantidade de ADN e/ou ARN.

A presente invenção refere-se ainda a um produto de programa de computador para, se implementado numa unidade de processamento, realizar um método conforme descrito anteriormente.

A presente invenção também se refere a um meio transportador de dados que compreende tal produto de programa de computador e/ou à transmissão do mesmo por uma rede de área local ou global.

O aspeto anteriormente descrito pode fazer parte de, pode corresponder a, pode compreender as etapas ou características de, ou pode utilizar os aspetos seguintes da presente invenção.

Também é descrito um método para analisar dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma ou mais amostras, consistindo uma ou mais amostras num número de constituintes, compreendendo o método obter informação prévia para ditas uma ou mais amostras em relação aos seus constituintes, obter dados de espectrofotómetro UV-VIS para ditas uma ou mais amostras, definir um número de componentes sobrepostos que contribuem nos dados de espectrofotómetro UV-VIS, compreendendo o número de

componentes sobrepostos um ou mais componentes atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras e compreendendo o número de componentes um ou mais componentes que não pode ser atribuído a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras, utilizar a informação prévia para uma ou mais amostras em relação aos seus constituintes e utilizar os dados de espectrofotômetro UV-VIS, estimar a composição dos constituintes e as contribuições dos componentes aos dados de espectrofotômetro UV-VIS para o número de componentes para uma ou mais amostras minimizando um resíduo entre os dados de espectrofotômetro UV-VIS e um ajuste baseado em dita composição constituinte e ditas contribuições dos componentes, obtendo, assim, informação relativa ao um ou mais componentes que não pode ser atribuída a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras. É uma vantagem que o método de análise permita a detecção precisa de contribuições ao espectro que decorrem de constituintes modificados, da interação de diferentes constituintes ou de contaminações em dita uma ou mais amostras.

A estimativa da composição dos constituintes e das contribuições dos componentes aos dados de espectrofotômetro UV-VIS para o número de componentes para dita uma ou mais amostras minimizando um resíduo entre os dados de espectrofotômetro UV-VIS e um ajuste baseado em dita composição constituinte e ditas contribuições dos componentes pode ser realizada iterativamente até que é obtido um resíduo mais pequeno do que um nível pré-determinado. É uma vantagem que utilizando um método iterativo se pode obter uma precisão aumentada para o ajuste e para as correspondentes composição constituinte e contribuição dos componentes.

O método pode ainda compreender a verificação cruzada da informação prévia com base em qualquer ou mais das composições dos constituintes, contribuição dos componentes

ou do resíduo entre os dados de espectrofotômetro UV-VIS e o ajuste. É uma vantagem que uma verificação cruzada dos resultados obtidos possa ser realizada utilizando a informação prévia relativa a uma ou mais amostras.

Dita informação prévia pode compreender contribuições de referência nos dados de espectrofotômetro UV-VIS para componentes atribuídos a constituintes conhecidos e dita estimativa da composição dos constituintes e das contribuições dos componentes pode compreender estimar as contribuições dos componentes ao espectrofotômetro UV-VIS para todos os componentes baseadas nas contribuições de referência e determinar uma estimativa para a composição dos constituintes com base na minimização do resíduo entre o espectrofotômetro UV-VIS e o ajuste com base em ditas contribuições dos componentes aos dados de espectrofotômetro UV-VIS estimadas para todos os componentes. É uma vantagem que possa ser obtida informação da composição precisa da uma ou mais amostras com base nos espectros de referência dos constituintes presentes na uma ou mais amostras, tendo em consideração a presença de contribuições desconhecidas nos dados de espectrofotômetro UV-VIS.

Dita informação prévia pode compreender informação sobre a composição constituinte para dita uma ou mais amostras para os constituintes conhecidos e dita estimativa da composição dos constituintes e das contribuições dos componentes pode compreender estimar a composição constituinte para todos os constituintes com base na informação prévia na informação sobre a composição constituinte para a uma ou mais amostras para os constituintes conhecidos e determinar um valor para a contribuição dos componentes aos dados de espectrofotômetro UV-VIS com base na minimização do resíduo entre os dados de espectrofotômetro UV-VIS e o ajuste com base em dita estimativa da composição constituinte para todos os constituintes. É uma vantagem que possa ser obtida

informação precisa sobre a composição de uma ou mais amostras com base nos espectros de referência dos constituintes presentes na dita uma ou mais amostras, tendo em consideração a presença de contribuições desconhecidas nos dados de espectrofotómetro UV-VIS.

A composição constituinte e as contribuições dos componentes podem ser inter-relacionadas por um modelo que define fatores de ponderação para as contribuições dos componentes como função da composição constituinte e em que a determinação de um valor para a composição constituinte ou para a contribuição dos componentes compreendes tem em consideração os fatores de ponderação. É uma vantagem que a composição dos constituintes nas amostras possa ser tida em conta.

A análise pode ser realizada com os dados de espectrofotómetro para uma pluralidade de amostras e dita estimativa iterativa pode ser realizada para aquelas amostras com o resíduo mais pequeno.

Os componentes que não podem ser atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras podem ser representativos para qualquer um ou mais dos constituintes modificados, efeitos de vizinhança dos diferentes constituintes ou contaminações na uma ou mais amostras. Outro componente que, com vantagem, pode ser tido em consideração por componentes que não podem ser atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras pode ser representativo para a turbidez causada pela concentração ou efeitos de agregação. O método pode compreender produzir uma contribuição relacionada com tal turbidez. É uma vantagem que possa ser obtida uma quantificação boa e/ou precisa dos componentes nas amostras que mostram elevada turbidez, por exemplo, com base no conhecimento prévio dos espectros de referência de componentes na amostra. Outro componente que, com vantagem, pode ser tido em consideração por componentes que não podem ser atribuídos a

constituintes conhecidos de uma ou mais amostras pode ser representativo para dispersão por micropartículas residuais. Tais partículas podem estar presentes de forma não intencional na amostra, tal como, por exemplo, introduzidas pelo processamento prévio da amostra. Num exemplo tais partículas residuais podem ser micropartículas magnéticas. O método pode compreender produzir uma contribuição relacionada com tal dispersão de partículas residuais. É uma vantagem que possa ser obtida uma quantificação boa e/ou precisa dos componentes nas amostras que compreendem partículas residuais, por exemplo, com base no conhecimento prévio dos espectros de referência dos componentes na amostra.

O método pode compreender utilizar dados espectrofotométricos de uma pluralidade de amostras, em que as amostras compreendem pelo menos uma amostra em que pelo menos um constituinte desconhecido está presente e pelo menos uma amostra em que pelo menos dito constituinte desconhecido está ausente.

O número de componentes pode ser determinado por análise de componentes.

O número de componentes pode ser determinado com base numa análise de componentes principais.

Também é descrito um sistema para analisar dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma ou mais amostras, consistindo dita uma ou mais amostras num número de constituintes, compreendendo o sistema um meio de entrada para obter informação prévia para a uma ou mais amostras relativamente aos seus constituintes e para obter dados de espectrofotómetro UV-VIS para dita uma ou mais amostras, um meio de processamento programado para definir um número de componentes que contribuem nos dados de espectrofotómetro UV-VIS, compreendendo o número de componentes um ou mais componentes atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras e compreendendo o número de componentes um ou

mais componentes que não podem ser atribuídos a constituintes conhecidos de uma ou mais amostras, sendo o meio de processamento ainda programado para utilizar a informação prévia para dita uma ou mais amostras relativa aos seus constituintes e utilizar os dados de espectrofotómetro UV-VIS, estimando a composição dos constituintes e as contribuições dos componentes aos dados de espectrofotómetro UV-VIS para o número de componentes para dita uma ou mais amostras minimizando um resíduo entre os dados de espectrofotómetro UV-VIS e um ajuste baseado em dita composição constituinte e ditas contribuições dos componentes, obtendo, assim, informação referente a um ou mais componentes que não podem ser atribuídos a constituintes conhecidos de uma ou mais amostras.

Também é descrita a utilização de um método, conforme descrito anteriormente, para identificar e/ou quantificar contaminantes em amostras de ADN e/ou ARN. Ditos contaminantes podem ser contaminação por proteínas. Os contaminantes podem ser contaminantes inibidores de PCR. Também é descrita a utilização de um método, conforme descrito anteriormente, para quantificar uma quantidade de ADN de cadeia dupla numa mistura de ADN de cadeia dupla e ARN e/ou ADN de cadeia simples.

Também é descrita a utilização de um método, conforme descrito anteriormente, para obter a composição de um polinucleotídeo ou proteína.

Também é descrita a utilização de um método, conforme descrito anteriormente, para quantificação da eficiência de modificação numa amostra.

Também é descrita a utilização de um método, conforme descrito anteriormente, para validar uma composição de amostra ou constituinte da mesma.

Também é descrito um produto de programa de computador para, se implementado numa unidade de processamento, realizar um método conforme descrito anteriormente. Também

se refere a um transportador de dados que armazena o produto de programa de computador e à transmissão do produto de programa de computador por uma rede.

É uma vantagem que seja obtida uma análise de dados poderosa de espectros de espectroscopia UV-VIS.

É uma vantagem que possa ser obtida boa quantificação, tanto para aplicações de rotina como para aplicações mais complexas.

É uma vantagem que, com base no conhecimento prévio de uma ou mais amostras, possam ser obtidos espectros de referência precisos para componentes na amostra.

É uma vantagem que, com base no conhecimento prévio dos espectros de referência de um ou mais componentes numa ou mais amostras, possa ser obtida informação precisa sobre a concentração para componentes na amostra.

É uma vantagem que métodos e sistemas sejam providenciados que permitem obter resultados relevantes e conclusivos.

Aspetos particulares e preferidos da invenção são apresentados nas reivindicações independentes e dependentes em anexo. Características das reivindicações dependentes podem ser combinadas com características das reivindicações independentes e com características de outras reivindicações dependentes, conforme apropriado, e não meramente conforme explicitamente apresentadas nas reivindicações. Estes e outros aspetos da invenção serão aparentes de, e elucidadas com referência à(s), modalidade(s) descritas nas partes que se seguem.

Breve descrição dos desenhos

A FIGURA 1 ilustra um fluxograma de um método para analisar espectros, de acordo com uma modalidade da presente invenção. A FIGURA 2 ilustra um exemplo de fluxo de dados como podem ser obtidos utilizando modalidades da presente invenção.

A FIGURA 3 ilustra um exemplo de fluxo de dados como

podem ser obtidos utilizando modalidades da presente invenção.

A FIGURA 4 ilustra as diferentes formas espectrais para nucleotídeos livres, nucleotídeos em ADN de cadeia simples e ADN de cadeia dupla para adenina e timina (gráfico de cima) e para guanina e citosina (gráfico de baixo), como pode ser utilizado de acordo com modalidades da presente invenção.

As FIGURA 5a a FIGURA 5f ilustram resultados de simulação que ilustram a variação espectral para diferentes comprimentos de cadeias de par de bases em função do conteúdo em GC, como pode ser utilizado de acordo com modalidades da presente invenção.

A FIGURA 6 é outra ilustração da variação espectral em função do comprimento das cadeias de pares de bases, como pode ser utilizado de acordo com modalidades da presente invenção.

As FIGURA 7a, FIGURA 7b, FIGURA 8a e FIGURA 8b ilustram resultados de medição obtidos com diferentes técnicas de ajuste para distinguir entre uma amostra que compreende ADN de cadeia dupla e uma amostra que não compreende ADN de cadeia dupla, como pode ser utilizado em modalidades da presente invenção.

A FIGURA 9 ilustra espectros espectroscópicos de ARN e ADN misturados, conforme pode ser analisado utilizando métodos de acordo com modalidades da presente invenção.

A FIGURA 10 a FIGURA 11 ilustram exemplos de deconvolução de duas amostras que compreendem ARN, analisadas utilizando métodos de acordo com modalidades da presente invenção.

Os desenhos são apenas esquemáticos e são não limitantes. Nos desenhos, o tamanho de alguns dos elementos pode ser exagerado e não desenhado à escala para fins ilustrativos.

Quaisquer sinais de referência nas reivindicações não

serão interpretados como limitantes do âmbito.

Nos diferentes desenhos, os mesmos sinais de referência referem-se aos mesmos elementos ou a elementos análogos.

Descrição detalhada das modalidades ilustrativas

A presente invenção será descrita em relação a modalidades particulares e com referência a certos desenhos, mas a invenção não está limitada aos mesmos mas apenas pelas reivindicações. Os desenhos descritos são apenas esquemáticos e não são limitantes. Nos desenhos, o tamanho de alguns dos elementos pode ser exagerado e não desenhados à escala para fins ilustrativos. As dimensões e as dimensões relativas não correspondem a reduções reais para prática da invenção.

Além disso, os termos primeiro, segundo e afins na descrição e nas reivindicações, são utilizados para distinguir entre elementos semelhantes e não necessariamente para descrever uma sequência, seja temporalmente, espacialmente, na classificação ou de qualquer outra forma. É para ser entendido que os termos assim utilizados são intercambiáveis nas circunstâncias apropriadas e que as modalidades da invenção descritas aqui são capazes de operação noutras sequências além das descritas ou ilustradas aqui.

Além disso, os termos acima, abaixo e afins na descrição e nas reivindicações são utilizados para fins descritivos e não necessariamente para descrever posições relativas. É para ser entendido que os termos assim utilizados são intercambiáveis nas circunstâncias apropriadas e que as modalidades da invenção descritas aqui são capazes de operação noutras orientações além das descritas ou ilustradas aqui.

De notar que o termo "que compreende", utilizado nas reivindicações, não deveria ser interpretado como sendo restrito aos meios listados daí em diante; não exclui

outros elementos ou etapas. É, assim, para ser interpretado como especificando a presença das características, números inteiros, etapas ou componentes declarados como referidos, mas não impede a presença ou adição de uma ou mais outras características, números inteiros, etapas ou componentes ou grupos dos mesmos. Assim, o âmbito da expressão "um dispositivo que compreende os meios A e B" não deveria estar limitado a dispositivos consistindo apenas nos componentes A e B. Isto significa que em relação à presente invenção, os únicos componentes relevantes do dispositivo são A e B.

Referência ao longo desta especificação a "uma modalidade" ou "a modalidade" significa que uma característica, estrutura ou funcionalidade particular descrita em ligação com a modalidade é incluída em pelo menos uma modalidade da presente invenção. Assim, aparências das frases "numa modalidade" ou "em uma modalidade" em vários lugares ao longo desta especificação não se referem necessariamente todas à mesma modalidade, apesar de o poderem. Além disso, as características, estruturas ou funcionalidades particulares podem ser combinadas de qualquer maneira adequada, como seria aparente a alguém com habilitação comum na arte a partir desta revelação em uma ou mais modalidades.

Da mesma forma, deveria ser apreciado que na descrição de modalidades exemplares da invenção, várias características da invenção são por vezes agrupadas juntas numa única modalidade, figura ou descrição da mesma com o fim de simplificar a revelação e ajudar no entendimento de um ou mais dos vários aspetos inventivos. Este método da revelação, contudo, não é para ser interpretado como refletindo uma intenção que a invenção reivindicada requer mais características além das que são expressamente recitadas em cada reivindicação. Em vez disso, como as seguintes reivindicações refletem, os aspetos inventivos

recaem em menos do que todas as características de uma única modalidade revelada anterior. Assim, as reivindicações a seguir à descrição detalhada são aqui expressamente incorporadas nesta descrição detalhada, com cada reivindicação a manter-se por si só como uma modalidade separada desta invenção.

Além disso, ao passo que algumas modalidades descritas aqui incluem algumas, mas não outras, características incluídas noutras modalidades, pretende-se que combinações das características de diferentes modalidades estejam dentro do âmbito da invenção e formem diferentes modalidades, como seria entendido por aqueles na arte. Por exemplo, nas seguintes reivindicações, qualquer uma das modalidades reivindicadas pode ser utilizada em qualquer combinação.

Onde em modalidades da presente invenção é feita referência a dados de espectrofotómetro, a referência é feita a uma refletância, transmitância ou intensidade de absorvância a um dado comprimento de onda ou em função do comprimento de onda. Com vantagem, o método pode ser aplicado a dados de espectrofotómetro sendo um espectro de espectrofotómetro, indicando uma intensidade em função do comprimento de onda. Em modalidades vantajosas, os dados são dados de absorvância, representativos da absorção que ocorreu em uma ou mais amostras.

Modalidades da presente invenção são dirigidas a métodos e sistemas para analisar dados de espectrofotómetro UV-VIS. Onde é feita referência a UV-VIS, a referência é feita a uma região de comprimento de onda com um comprimento de onda superior na região 700nm a 1100nm e um comprimento de onda inferior na região 150nm a 300nm.

Onde em modalidades da presente invenção é feita referência a componentes que contribuem para dados de espectrofotómetro UV-VIS, a referência é feita a componentes para uma fração da intensidade para um ou mais comprimentos

de onda nos dados de espectrofotómetro, por exemplo, espectro de espectrofotómetro. Tal componente pode ser atribuída diretamente a um constituinte na uma ou mais amostras ou pode não ser ou não atribuída diretamente a um constituinte em dita uma ou mais amostras.

Onde em modalidades da presente invenção é feita referência a componentes que não podem ser atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras, é feita referência a componentes que não correspondem com ou para os quais não se sabe ainda que estes correspondem com uma característica de absorção físico-química dos constituintes da uma ou mais amostras. Os componentes não correspondem, assim, necessariamente, a uma característica de absorção físico-química dos constituintes. Os componentes não precisam de corresponder com constituintes com uma contribuição significativa, por exemplo absorvância, dentro da região de comprimento de onde sob estudo.

Onde em modalidades da presente invenção é feita referência a constituintes de uma ou mais amostras, é feita referência a elementos biológicos ou não biológicos, tais como elementos químicos que estão presentes na amostra. Tais constituintes podem, por exemplo, ser um dos seguintes ou elementos ou grupos de elementos dos mesmos: biopolímeros, pequenas moléculas orgânicas, metabolitos, tais como glicose ou etanol, proteínas, péptidos, segmentos de ácidos nucleicos, oligonucleotídeos, oligonucleotídeos contendo uma ou mais modificações, tais como, por exemplo, rótulos de corante fluorescente ou cromóforos, modificações de ligante químico tais como modificações aldeído, fosfato, amina ou tiol, rótulos de afinidade tais como biotina, componentes reativos tais como enzimas (ALP, HRP), bases alternativas tais como deoxiuracilo, deoxiinosina, fosfotiolatos, ácidos nucleicos fechados, polinucleotídeos, nucleotídeos, oligos, ácidos nucleicos peptídicos, anticorpos e variações dos mesmos tais como, por exemplo,

nanocorpos ou alfacorpos, micro e nanopartículas adicionadas seja intencionalmente ou sem intenção, partículas magnéticas ou não magnéticas, lípidos, micelas, vesículas, partículas virais, complexos de metal, corantes intercalados e polímeros, tais como derivados de politiofeno, cromogénios, tais como p-NPP, sais de tetrazólio, reagentes de coloração, tais como Coomassie, azul de metilo, eosina, moléculas tais como pequenas moléculas de produtos farmacêuticos, antibióticos ou fármacos, moléculas com um efeito regulador em processos enzimáticos tais como promotores, ativadores, inibidores ou co-fatores, vírus, bactérias, células, componentes celulares, membranas celulares, esporos, ADN, ARN, micro-organismos e fragmentos e produtos. Tais constituintes também podem ser, por exemplo, elementos químicos, tais como elementos químicos presentes num produto farmacêutico ou produto químico.

Onde em modalidades, de acordo com a presente invenção, é feita referência a componentes sobrepostos, é feita referência ao facto de que a contribuição dos componentes ao espectro de tais componentes é significativa ao mesmo comprimento de onda ou no mesmo intervalo de comprimento de onda.

Onde em modalidades da presente invenção é feita referência a turbidez, é feita referência a enevoamento ou nebulosidade de um fluido causada pelas partículas individuais que são geralmente invisíveis ao olho nu.

Num primeiro aspeto, a presente invenção refere-se a um método para analisar dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma ou mais amostras. Uma desvantagem típica de dados de espectrofotómetro UV-VIS de dados complexos é que diferentes contribuições, por exemplo, correspondendo com diferentes constituintes na amostra ou com constituintes desconhecidos, resultarão em contribuições sobrepostas. Isto resulta em espectros de banda larga, em que as

diferentes contribuições não são identificáveis como tal dos espectros na forma de ombros ou picos. Modalidades da presente invenção permitem analisar os dados de espectrofotômetro UV-VIS de tais amostras complexas resultando em espectros com absorção de banda larga construídos sobrepondo contribuições. Podem ser utilizados métodos de acordo com modalidades da presente invenção para análise de uma ou mais amostras. Ainda que seja possível a análise de uma única amostra, o método é especialmente adequado para analisar dados de espectrofotômetro de múltiplas amostras. A uma ou mais amostras compreende um número de constituintes. Os métodos de acordo com modalidades da presente invenção são especialmente adequados para analisar dados para amostras com dois ou mais, com vantagem, três ou mais constituintes. De acordo com modalidades da presente invenção, os métodos são especialmente adequados para analisar dados de espectrofotômetro UV-VIS de uma amostra que compreende pelo menos ADN e/ou ARN. O método de acordo com modalidades da presente invenção, sendo um método implementado por computador, compreende receber dados de espectrofotômetro UV-VIS, ajustando os dados de espectrofotômetro UV-VIS tendo em consideração, pelo menos, um espectro representativo para um par de bases sendo qualquer um de adenina-timina (AT) ou guanina-citosina (GC) ou adenina-uracilo e derivando do ajuste uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN. Receber dados de espectrofotômetro UV-VIS pode compreender obter dados de espectrofotômetro UV-VIS pré-armazenados ou medir dados de espectrofotômetro UV-VIS para a uma ou mais amostras que compreendem ADN e/ou ARN. Tais dados de espectrofotômetro UV-VIS podem ser tipicamente um espectro de espectrofotômetro, apesar também poder ser utilizada informação a um ou mais comprimentos de onda individuais ou intervalos de comprimento de onda. A amostra que compreende ADN e/ou ARN pode compreender ADN de cadeia simples, ADN de

cadeia dupla (dsADN) e/ou ARN.

De acordo com modalidades da presente invenção, uma etapa do método compreende ajustar os dados de espectrómetro UV-VIS tendo em consideração pelo menos um espectro representativo para um par de bases sendo qualquer um de adenina-timina (AT) ou guanina-citosina (GC) ou adenina-uracilo. Nalgumas modalidades, de acordo com a presente invenção, são utilizados exatamente dois espectros representativos para um par de bases sendo qualquer um de adenina-timina (AT) ou guanina-citosina (GC) ou adenina-uracilo. Mais particularmente, nalgumas modalidades será feito uso de dois espectros de referência representativos para amostras com diferentes conteúdos em GC. Noutras modalidades exemplares, tais componentes espectrais são utilizados em combinação com outros espectros ou são combinados com outros espectros para que sejam obtidos novos espectros que possam ser utilizados para o ajuste. Um exemplo de diferentes formas espectrais em que os nucleotídeos adenina, timina, guanina e citosina podem ocorrer é mostrado na FIGURA 4, ilustrando a ocorrência da adenina e timina por um lado (desenho no cima) e da guanina e citosina por outro lado (desenho em baixo) como, respetivamente, uma combinação de nucleotídeos livres (A+T curva 402; G+C curva 412), conforme ocorrendo em ADN de cadeia simples (A+T curva 404; G+C curva 414) e ocorrendo como pares de bases em ADN de cadeia dupla (A+T curva 406; G+C curva 416). As diferentes formas espectrais podem ser claramente identificadas. Onde em modalidades de acordo com a presente invenção é feita referência a um espectro representativo para um par de bases, é feita referência ao espectro onde os nucleotídeos ocorrem como pares de bases no ADN de cadeia dupla ou a um espectro que compreende características espectrais para a situação onde os nucleotídeos ocorrem como pares de bases no ADN de cadeia dupla.

O método de acordo com modalidades da presente invenção também compreende derivar do ajuste uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN. Derivar uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN pode, por exemplo, compreender derivar uma quantidade de ADN de cadeia simples, uma quantidade de ADN de cadeia dupla e/ou uma quantidade de ARN. Modalidades da presente invenção podem ser adaptadas para determinar uma quantidade de ADN de cadeia dupla e derivar da mesma uma quantidade de ADN de cadeia simples ou uma quantidade de ARN.

A título ilustrativo, não estando as modalidades da presente invenção limitadas às mesmas, será adicionalmente descrito a seguir um número de modalidades particulares.

Num primeiro conjunto de modalidades particulares de acordo com a presente invenção, é revelado um método implementado por computador conforme descrito anteriormente, pelo qual o ajuste de dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma amostra que compreende ADN e/ou ARN compreende ajustar os dados de espectrofotómetro UV-VIS utilizando exatamente dois espectros de referência representativos para pares de bases. Na presente modalidade, estes dois espectros de referência são espectros representativos para duas amostras com conteúdo em pares de bases particular distinto, tal como, por exemplo, conteúdo em GC. Tipicamente, em tais modalidades um espectro de referência será representativo de uma amostra com um conteúdo em GC superior, ao passo que outro espectro de referência será representativo de uma amostra com um conteúdo em GC menor. Onde é feita referência a distintos conteúdos em GC, a diferença no conteúdo pode ser, por exemplo, pelo menos 20%, com vantagem pelo menos 30%, com mais vantagem pelo menos 40%, por exemplo pelo menos 50%. Tais modalidades podem ser especialmente adequadas para ajustar amostras que compreendem cadeias de ADN e/ou ARN com pelo menos 50 pares de bases, com vantagem, pelo menos 100 pares de bases. Pode, assim, ser obtido ajuste

eficiente. Este último é baseado na observação surpreendente de que a variação espectral para ADN com sequências geradas aleatoriamente com um comprimento suficiente pode ser completamente explicada tendo em consideração o conteúdo em GC e pode ser ajustada com precisão utilizando dois espectros representativos para amostras com distintos conteúdos em GC.

Em modalidades particulares, de acordo com a presente invenção, é revelado um método para analisar uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com base no método implementado por computador descrito anteriormente. Para uma reação PCR, uma amostra tipicamente a partir de uma mistura que compreende trifosfatos de desoxinucleotídeos, iniciadores oligo, polimerase e uma certa quantidade de ADN. Os dNTP na mistura têm tipicamente uma densidade óptica alta a 260nm obscurecendo a contribuição dos iniciadores, alvo e amplificação tornando, assim, difícil analisar tais amostras em relação à discriminação específica entre as diferentes componentes. Utilizando modalidades de acordo com a presente invenção permitirá avaliar e/ou analisar a reação PCR, mesmo sem purificar a mistura da reação, isto é, sem separar componentes na mistura da reação. Utilizando modalidades de acordo com a presente invenção, a quantidade de ADN de cadeia dupla que é formada, que é tipicamente relativamente pequena, pode ser quantificada com precisão bem como a perda de trifosfato de desoxirribonucleotídeo (dNTP). O produto formado pode diferir substancialmente no conteúdo em GC, dependente da sequência final. A forma variável do espectro de ADN de cadeia dupla, estando dependente do conteúdo em GC, conforme indicado anteriormente, pode ser ajustado utilizando modalidades da presente invenção, conforme ilustrado na descrição atual. Além disso, nalgumas modalidades, também pode ser tida em conta a dependência da forma na mistura de dNTP livres. Esta dependência da forma pode, por exemplo, ser causada

pelo grau de consumo ou incorporação de nucleotídeos A+T e G+C.

Num segundo conjunto de modalidades particulares, é descrito um método para analisar uma reação em cadeia da polimerase (PCR), em que para ajustar dois espectros de referência são utilizados para distintas amostras com distintos conteúdos em pares de bases, tais como, por exemplo, distinto conteúdo em CG, em combinação com espectros de referência para bases azotadas separadas. Os últimos espectros de referência podem, por exemplo, ser espectros de referência para, respetivamente, componentes A&T e G&C, sendo combinações de espectros individuais para bases azotadas e não sendo o espectro de dinucleotídeos. Ao utilizar estes espectros de referência, pode ser obtido um ajuste apropriado. Além disso, outros componentes também podem ser tidos em consideração para o ajuste, tais como, por exemplo, um componente para dispersão ou turbidez, um componente para uma contaminação tal como por exemplo para uma ou mais de trimetilglicina, guanidinatiocianato, fenol, ácido etilenodiaminatetraacético, proteínas ou hemoglobina, etc.

Num terceiro conjunto de modalidades particulares, é descrito um método para analisar uma reação em cadeia da polimerase (PCR), em que é utilizado para o ajuste um espectro da amostra antes da ação PCR ter ocorrido e dois espectros de referência sendo a diferença espectros expressando a incorporação de bases azotadas, por exemplo nucleotídeos A&T e G&C. Tal diferença de espectros é obtida como a diferença do espectro de par de bases de pares de bases, por exemplo AT, respetivamente, GC numa molécula de cadeia dupla, por um lado, e o espectro obtido para bases azotadas separadas, por exemplo, misturas de nucleotídeos de A&T, respetivamente, G&C por outro lado.

A título ilustrativo, não sendo as modalidades da presente invenção limitadas pelos mesmos, são

providenciados resultados de simulação, ilustrando como as técnicas de deconvolução descritas anteriormente podem, com vantagem, ser utilizadas para analisar amostras que compreendem ADN.

Um primeiro conjunto de resultados de simulação ilustra que para ADN de cadeia dupla longa, todas as diferenças espectrais podem ser explicadas utilizando dois componentes espectrais, por exemplo um componente espectral AT e um componente espectral GC. O conjunto de resultados de simulação compreende ajustar para moléculas de ADN de cadeia dupla com tamanhos entre 10 pares de bases a 500 pares de bases, com incrementos de 10 pares de bases. O conteúdo em CG para estas partículas oscila de 20% a 80% com incrementos de 10%. Para cada classe de amostras são geradas, 200 sequências aleatórias.

Depois disso, uma previsão dos espectros de absorção foi feita para todas as sequências utilizando um método conforme descrito em "Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids", Biophysical Chemistry 133 (2008) páginas 66-70 por Tataurov et al. Os diferentes espectros são mostrados na FIGURA 5 para uma seleção de diferentes comprimentos de ADN de cadeia dupla. As FIGURAS 5(a), 5(b), 5(c), 5(d), 5(e), 5(f) ilustram espectros para dsADN com um comprimento de, respetivamente 10, 20, 50, 100, 200 e 500 pares de bases. Para cada classe, a dispersão dos 200 espectros em cada classe foi estudada e foi identificado se poderia ou não ser observada uma dependência em função de diferentes conteúdos em CG. Pode ser observado que para moléculas de ADN de cadeia dupla curtas, está presente uma grande variação. Não pode ser derivada uma dependência clara do conteúdo em CG para moléculas de ADN de cadeia dupla curtas e é concluído que o efeito do conteúdo em CG é obscurecido pela variação do conteúdo do vizinho mais próximo. Contrariamente, para moléculas de ADN de cadeia dupla

longas, a variância na forma espectral para os 200 espectros em cada classe pode ser principalmente explicada pela variância no conteúdo em CG. Por outras palavras, a variância na forma espectral pode ser explicada substancialmente por uma única variável sendo o conteúdo em CG. A título ilustrativo, para ADN de cadeia dupla com um comprimento de 500 pares de bases, é ilustrada a possibilidade para ajustar todos estes diferentes espectros com um de dois espectros de referência com um conteúdo em CG particular (um com elevado conteúdo em CG e um com baixo conteúdo em CG).

A FIGURA 6 ilustra para um dado conteúdo em CG (sendo no presente caso 50% do conteúdo em CG), a variância na forma espectral entre diferentes espectros em função do tamanho do fragmento do ADN de cadeia dupla. Pode-se observar que a variância é maior para tamanhos de fragmento entre 1 e 50 pares de bases. Para tamanhos de fragmento 50 pares de bases ou maiores, por exemplo 100 pares de bases ou maiores, a variância na forma espectral é substancialmente inferior, de novo indicativo do facto de que tamanhos mais longos de fragmentos (apesar de gerados aleatoriamente), a forma espectral do espectro de absorção é característica para um dado conteúdo em CG. A título ilustrativo, não sendo as modalidades da presente invenção limitadas pelos mesmos, é discutido a seguir um exemplo da aplicação de um método de análise para analisar uma medição PCR de acordo com uma modalidade da presente invenção com referência à FIGURA 7a e FIGURA 7b. A FIGURA 7a ilustra o produto para análise de um espectro de absorção de uma amostra pelo qual não é formado qualquer ADN de cadeia dupla e a FIGURA 7b ilustra o produto para análise de um espectro de absorção de uma amostra onde é formado ADN de cadeia dupla. Apesar das amostras onde é utilizada PCR terem tipicamente uma alta densidade ótica, os espectros ainda podem ser analisados, conforme mostrado nas FIGURA 7a e FIGURA 7b.

O método de deconvolução utilizado baseia-se na utilização de dois espectros de referência para diferentes concentrações de GC (representativas para pares de bases; referidas como dsADN_AT ou A=T e dsADN_GT ou G=C), por exemplo concentrações de GC extremas e utilizando dois espectros de referência para, respetivamente, componentes A&T e G&C (sendo combinações de espectros individuais e não sendo o espectro de dinucleotídeos; referido como dNTPs_AT e dNTPs_GC). Utilizando estes espectros de referência, no presente exemplo, também tendo em consideração outros componentes tais como por exemplo um componente para turbidez, pode ser obtido um ajuste apropriado e pode, de facto, ser distinguido se é formado ou não ADN de cadeia dupla por uma reação PCR. Das concentrações ajustadas de conteúdo ADN de cadeia dupla AT e GC, também pode ser realizada uma quantificação. O espectro medido 702 e o espectro melhor ajustado 704 coincidem substancialmente. O componente dNTPs_AT 706 e o componente dNTPs_GC 708 também são indicados bem como o componente dsADN_AT 710, o componente dsADN_GC 712, um componente de resíduo 714 e um componente de outros componentes contribuintes conhecidos 716. Os últimos quatro não contribuem quase nada.

A título ilustrativo, não sendo as modalidades da presente invenção limitadas pelo mesmo, outro exemplo da aplicação de um método de análise para analisar uma medição PCR de acordo com uma modalidade da presente invenção é discutido a seguir com referência à FIGURA 8a e FIGURA 8b. As FIGURA 8a e FIGURA 8b ilustram o produto para análise de um espectro de absorção de uma amostra pelo qual não é formado ADN de cadeia dupla (FIGURA 8a) e uma amostra onde é formado ADN de cadeia dupla (FIGURA 8b). Apesar das amostras onde é utilizada PCR terem tipicamente uma alta densidade ótica, os espectros ainda podem ser analisados, conforme mostrado nas FIGURA 8a e FIGURA 8b.

O método de deconvolução utilizado baseia-se na utilização

de um espectro da amostra antes da ação PCR ter ocorrido (referida como mistura PCR) e dois espectros de referência sendo a diferença espectros expressando a construção de A&T e G&C. Tal diferença de espectros para AT e GC é obtida como a diferença do espectro obtido para misturas nucleotídicas separadas de AT respetivamente GC e o espectro de par de bases de AT respetivamente GC numa configuração de cadeia dupla, isto é, como par de bases. O espectro medido 802 e o melhor espectro ajustado 804 são mostrados. Para a FIGURA 8a, os outros componentes e resíduo são substancialmente iguais também. Para a FIGURA 8b, além disso o componente de incorporação AT 806, o GC componente de incorporação 808 e um componente de mistura PCR 810 também são indicados. Os outros componentes e resíduo são substancialmente iguais a 0.

Ao utilizar estes espectros de referência, no presente exemplo, tendo também opcionalmente em conta outros componentes tais como, por exemplo, um componente para turbidez, pode ser obtido um ajuste apropriado e pode, de facto, ser distinguido se é formado ou não ADN de cadeia dupla por uma reação PCR. Das concentrações ajustadas de conteúdo em ADN de cadeia dupla AT e GC, também pode ser realizada uma quantificação. É uma vantagem das modalidades, de acordo com a presente invenção, que o resultado do ajuste seja uma medida para o ADN de cadeia dupla formado e, portanto, permita uma melhor quantificação da reação PCR, do que no caso de um método que providencia como um resultado final a combinação do ADN de cadeia dupla original e os amplicões formados. É, além disso, uma vantagem das modalidades, de acordo com a presente invenção, que automaticamente o equilíbrio dos conteúdos em AT e CG seja tido em conta. As modalidades anteriores ilustram que a utilização de métodos de deconvolução que têm em conta o espectro GC permite a análise adequada do ADN de cadeia dupla e permite ainda a análise das reações PCR.

A título ilustrativo, não sendo as modalidades da presente invenção limitadas pelos mesmos, outro exemplo da aplicação de um método de análise para analisar uma amostra que compreende ADN e ARN, de acordo com uma modalidade da presente invenção, é discutido a seguir com referência à FIGURA 9. A FIGURA 9 ilustra um conjunto de amostras que compreende amostras com diferentes razões de ADN para ARN. As razões ADN/ARN variaram de 4:1 a 1:4. Pode-se observar que as contribuições espectrais de ADN e ARN se sobrepõem significativamente. Quando o conjunto de amostras com as razões ADN/ARN pré-determinadas são deconvoludadas utilizando métodos de acordo com modalidades da presente invenção, são encontradas razões ADN/ARN correspondentes com as razões ADN/ARN pré-determinadas no erro experimental, ilustrando características e vantagens dos métodos de acordo com modalidades da presente invenção.

Ainda a título ilustrativo, a deconvolução de duas amostras que contêm ARN é ilustrada na FIGURA 10 e 11. A FIGURA 10 ilustra a deconvolução de uma amostra que compreende ambos nucleotídeos ARN, ARN e ADN, pelo qual o espectro medido 1002 é indicado, o melhor ajuste 1004 é indicado, o componente ARN 1006 é indicado, o componente ADN 1008 é indicado, um componente de nucleotídeos ARN 1010 é indicado bem como uma fração de resíduo 1012 é indicada. Poderia ser observado que a fração de resíduo é mais pequena do que 3%, o que indica que o ajuste é preciso. A inserção ilustra resultados de medição alternativos com base na separação eletroforética e análise de fluorescência e confirma a presença de ARN (a classificação RIN de 10 correspondente com elevada integridade do ARN), conforme detetado utilizando a técnica de deconvolução de acordo com uma modalidade da presente invenção. A FIGURA 11 ilustra a deconvolução de outra amostra que compreende ARN, pelo qual o espectro medido 1002 é indicado, o melhor ajuste 1004 é indicado, o componente ARN 1006 é indicado, um componente

de tiocianato de guanidínio também é indicado, rotulado como componente de guanidínio 1014 e o resíduo 10012 também é indicado. A fração de ADN e proteína é insignificante. Pode ser observado que a fração de resíduo é apenas 0,83%, sendo indicativo de um ajuste suficientemente bom. A inserção ilustra resultados de medição alternativos com base na separação eletroforética e análise de fluorescência e confirma a qualidade da amostra ARN (a classificação RIN de 10) correspondente com elevada integridade do ARN, conforme detetado utilizando a técnica de deconvolução, de acordo com uma modalidade da presente invenção.

Modalidades da presente invenção também podem, além disso, fazer parte de, podem corresponder com, podem compreender uma ou mais etapas ou características de ou podem utilizar um ou mais dos seguintes aspetos, sendo também modalidades da presente invenção.

A título ilustrativo, um fluxograma exemplificativo de um método de acordo com uma modalidade da presente invenção, que compreende etapas convencionais e opcionais é mostrado na FIGURA 1 e será ainda descrito com referência ao mesmo a seguir. O método 100 de acordo com modalidades da presente invenção compreende obter 120 informação prévia para dita uma ou mais amostras em relação aos seus constituintes. Tal informação prévia para dita uma ou mais amostras em relação aos seus constituintes pode compreender nalgumas modalidades um ou mais espectros de referência. Tal informação prévia, em alternativa ou além de, também pode compreender informação de composição esperada, tal como, por exemplo, concentrações esperadas, razões esperadas entre constituintes diferentes, etc. Um exemplo de tal informação de composição pode, por exemplo, ser a presença de um polinucleotídeo conhecido, pela qual o polinucleotídeo conhecido é uma sequência conhecida de nucleotídeos de tal forma que razões conhecidas de constituintes, sendo no presente exemplo nucleotídeos,

estão disponíveis. Nalgumas modalidades, a informação prévia pode ser obtida com base nas amostras sob estudo. Nalgumas modalidades, a informação prévia pode ser informação previamente armazenada, tal como, por exemplo, espectros de referência previamente armazenados para constituintes. Nalgumas modalidades, também pode ser utilizada uma combinação de tal informação prévia.

O método também compreende obter 110 dados de espectrofotómetro UV-VIS para a uma ou mais amostras. Tais dados de espectrofotómetro UV-VIS tipicamente podem ser um espectro de espectrofotómetro, apesar de também poder ser utilizada informação em um ou mais comprimentos de onda individuais ou intervalos de comprimento de onda.

O método de acordo com a presente invenção também compreende definir 130 um número de componentes sobrepostos que contribuem para os dados de espectrofotómetro UV-VIS, o número de componentes sobrepostos que compreende um ou mais componentes atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras e o número de componentes que compreende um ou mais componentes que não podem ser atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras. Os componentes de acordo com modalidades da presente invenção que expressam a contribuição aos dados de espectrofotómetro UV-VIS podem, nalgumas modalidades, compreender uma contribuição espectral com uma forma que difere de uma Gaussiana, Lorentziana ou uma mistura das mesmas. A forma da contribuição espectral pode ser uma contribuição mais ampla. Tal um ou mais componentes que não podem ser atribuídos a constituintes conhecidos de dita uma ou mais amostras pode ser, conforme descrito anteriormente, tal como, por exemplo, constituintes modificados, efeitos de vizinhança entre dois constituintes ou contaminantes. Definir o número de componentes sobrepostos pode ser baseado num algoritmo pré-determinado, numa rede neural, etc. O método pode utilizar uma análise de componentes para

definir o número de componentes sobrepostos, tal como, por exemplo, utilizando uma técnica de análise de componentes principais. Nalgumas modalidades, o número de componentes independentes pode ser obtido colocando um número grande de espectros de absorvância da amostra numa matriz e calculando uma ordenação da matriz.

O método de acordo com a presente invenção compreende ainda utilizar a informação prévia para a uma ou mais amostras em relação aos seus constituintes e utilizar os dados de espectrofotómetro UV-VIS, estimando a composição dos constituintes e as contribuições dos componentes aos dados de espectrofotómetro UV-VIS para o número de componentes para a uma ou mais amostras minimizando um resíduo entre os dados de espectrofotómetro UV-VIS e um ajuste baseado em dita composição constituinte e ditas contribuições dos componentes. Para minimizar um resíduo podem ser empregues diferentes técnicas, tais como, por exemplo, um método dos mínimos quadrados, minimização do erro iterativa, minimização da entropia do erro, minimização do erro ponderada...

Nalgumas modalidades, a informação prévia compreende contribuições de referência nos dados de espectrofotómetro UV-VIS, tais como, por exemplo, espectros de referência, para componentes atribuídos a constituintes conhecidos. Estimar a composição dos constituintes e as contribuições dos componentes pode depois compreender estimar as contribuições dos componentes aos dados de espectrofotómetro UV-VIS para todos os componentes com base nas contribuições de referência. Com base nas contribuições dos componentes, é depois feita uma estimativa da composição constituinte com base na minimização do resíduo entre o espectrofotómetro UV-VIS e o ajuste com base nas contribuições estimadas dos componentes aos dados de espectrofotómetro UV-VIS para todos os componentes.

Nalgumas modalidades, a informação prévia compreende

informação sobre a composição constituinte para dita uma ou mais amostras para os constituintes conhecidos. Estimar a composição dos constituintes e as contribuições dos componentes compreende, assim, estimar a composição constituinte para todos os constituintes com base na informação prévia na informação sobre a composição constituinte para dita uma ou mais amostras para os constituintes conhecidos e determinar uma estimativa para a contribuição dos componentes aos dados de espectrofotómetro UV-VIS com base na minimização do resíduo entre os dados de espectrofotómetro UV-VIS e o ajuste com base em dita composição constituinte estimada para todos os constituintes.

Nalgumas modalidades, é obtida uma mistura de informação prévia, pela qual a mistura da informação permite determinar uma estimativa da composição dos constituintes e das contribuições dos componentes.

A composição constituinte e as contribuições dos componentes podem ser inter-relacionadas por um modelo que define fatores de ponderação para distribuições de componentes em função da composição constituinte. Tais fatores de ponderação podem ser tidos em consideração ao determinar uma estimativa para a composição constituinte ou para a contribuição dos componentes.

O método também pode compreender repetir 150 a etapa de estimativa e etapa de ajuste para minimizar ainda mais o resíduo total aplicando iterativamente estas etapas. Tal processo de iteração pode ser realizado até o resíduo remanescente entre os dados de espectrofotómetro UV-VIS e o ajuste com base na composição constituinte ser mais pequeno do que um valor pré-determinado ou até ser atingido um número máximo de etapas de iteração. O valor pré-determinado referido pode ser baseado em regras pré-determinadas, com base numa rede neural, baseado em algoritmos pré-determinados, baseado em informação relativa

a uma ou mais amostras, etc. Nalgumas modalidades, a minimização do resíduo pode ser realizada apenas para aquelas amostras com o resíduo mais pequeno, permitindo obter resultados mais precisos e/ou uma convergência mais rápida.

O método permite providenciar como uma informação de saída em relação à composição da amostra e/ou informação relativa à contribuição espectral de constituintes aos espectros de absorvância. Nalguns exemplos, a informação obtida pode permitir derivar espectros de referência para um constituinte, um constituinte modificado, um contaminante, um efeito de vizinhança... Este último pode ser utilizado para montar uma biblioteca de diferentes espectros de referência compatíveis com diferentes constituintes ou efeitos dos mesmos.

Numa modalidade, o método também compreende utilizar o resíduo de cada amostra ou informação relacionada com o mesmo para verificar a informação disponível *a priori*. Por outras palavras, os resultados obtidos utilizando o método podem ser utilizados para verificar de forma cruzada a informação disponível *a priori*.

O método de acordo com modalidades da presente invenção pode ser especialmente adequado para analisar uma pluralidade de amostras, pelo qual numa parte das amostras o componente desconhecido está presente e noutra parte das amostras o componente desconhecido está ausente.

O método de acordo com modalidades da presente invenção pode ser implementado como software, bem como como hardware. A título ilustrativo, não sendo as modalidades da presente invenção limitadas aos mesmos, um exemplo de como os dados podem ser combinados e obtidos é ilustrado na FIGURA 2. A FIGURA 2 ilustra como, de acordo com modalidades da presente invenção, com base em dados de espectrofotómetro e informação da composição (por exemplo, obtida com base em conhecimento prévio), podem ser

determinadas as contribuições dos componentes, por exemplo, na forma de espectros de referência minimizando o resíduo. Com base nas contribuições dos componentes obtidas e utilizando os dados de espectrofotômetro, podem ser obtidas estimativas melhoradas da composição. A FIGURA 3 ilustra uma modalidade adicional da presente invenção, pela qual no momento do cálculo da informação sobre a composição ou da informação sobre a contribuição dos componentes, pode ser decidido adicionar um componente adicional ou remover um componente através da avaliação dos dados da contribuição dos componentes obtidos, por exemplo, à luz dos resultados esperados considerando os dados anteriores ou pode ser decidido remover uma amostra na avaliação com base na informação sobre a composição obtida, por exemplo, à luz dos resultados esperados considerando os dados anteriores. O método pode ser adequado extraíndo informação quantitativa sobre um ou mais constituintes na amostra e sobre a contribuição dos componentes correspondente no espectro UV-VIS. Nalgumas modalidades, podem ser utilizados espectros de referência correspondentes de componentes conhecidos e desconhecidos suspeitos do presente na amostra para ajustar os dados de espectrofotômetro UV-VIS. As contribuições dos componentes podem não estar limitadas aos espectros de referência dos componentes puros individuais, mas ser estendidas com funções espectrais corretivas de componentes que não correspondem necessariamente a uma característica de absorção físico-química do componente, nem o próprio componente precise de mostrar características de absorção significativas dentro da região de comprimento de onda sob estudo. Num exemplo, uma das contribuições dos componentes pode ser uma contribuição correspondente com turbidez causada por efeito de concentração ou agregação. Num exemplo, uma das contribuições dos componentes pode ser uma contribuição correspondente dispersão causada por partículas residuais, por exemplo, partículas presentes

devido ao pré-processamento da amostra.

A título ilustrativo, não sendo as modalidades da presente invenção limitadas ao mesmo, será descrito um algoritmo que compreende um número de etapas particulares ilustrando uma forma exemplar de implementar o método, de acordo com modalidades da presente invenção, ou que pode ser utilizado em modalidades para ajuste em métodos para analisar amostras que compreendem ADN e/ou ARN. O método será descrito utilizando um formalismo de matriz matemática particular, apesar de também poderem ser utilizadas modalidades da presente invenção que não estão limitadas a esse outro formalismo matemático. O exemplo ilustra os métodos utilizados para a deconvolução de dados espectralfotométricos. Os princípios aplicam-se para diferentes tipos de amostras.

Para ilustrar o algoritmo, é providenciado primeiro um número de definições:

A_i : isto é uma medida (expressa em absorvâncias, OD10mm) onde o subscrito i indica os comprimentos de onda (oscilando de 220nm a 360nm em etapas de 1 nm, no caso dos ácidos nucleicos)

Q_j : esta matriz contém as presenças relativas dos diferentes constituintes conhecidos e desconhecidos, efeitos de interação, modificações ou contaminações da mistura. No presente exemplo, estes podem ser, por exemplo, os nucleotídeos A, G, C e T, mas também modificações (como rótulos) ou dinucleotídeos, tais como, por exemplo, AG, porque alguns espectros dinucleotídicos diferem dos espectros combinados dos seus constituintes. No algoritmo atual, os dinucleotídeos são tratados de forma idêntica a modificações e contaminantes. j é o número de subcomponentes na mistura.

R_{ij} : os espectros de referência. Estes são os espectros (conhecidos) dos nucleotídeos e os espectros das modificações, dinucleotídeos e contaminantes. Com i os

comprimentos de onda e j os subcomponentes.

Ao trabalhar com espectros de referência armazenados, R_j , os coeficientes de cada espectro de referência, Q_{ij} , podem ser os desconhecidos. Ao medir componentes conhecidos, Q_{ij} já é especificado e os espectros de referência R_i podem ser derivados.

Na realidade, será utilizado um procedimento iterativo onde numa primeira etapa, R_j é determinado e em etapas subsequentes Q_{ij} é sucessivamente encontrado novamente.

As medições, presenças relativas e contribuições (sendo no presente exemplo espectros de referência conhecidos) são dadas como

$$R_{ij}Q_j = A_i \text{ ou } RQ = A \quad [1]$$

As definições, no caso de uma pluralidade de amostras serem medidas, resultam na matriz de medição que se torna

A_{ik} : isto é uma medida (expressa em absorvâncias, OD10mm) onde o subscrito i indica os comprimentos de onda (oscilando de 220nm a 360nm em etapas de 1 nm, no caso dos ácidos nucleicos) e k o número das medições, tornando-se a matriz de coeficiente

Q_{jk} : esta matriz contém os coeficientes (as presenças relativas) de cada subcomponente da mistura. Aqui subcomponentes podem ser os nucleotídeos A, G, C e T, mas também modificações (como rótulos) e dinucleotídeos (por exemplo, AG) e contaminantes. De novo j é o número de subcomponentes e k o número de medições.

Resultando na equação seguinte que expressa a relação entre os componentes (no presente exemplo, conhecidos de informação prévia e sendo espectros de referência R) a matriz de coeficiente (no presente exemplo, que expressa a composição constituinte) e a matriz de medição.

$$R_{ij}Q_{jk} = A_{ik} \text{ ou } RQ = A \quad [2]$$

No presente exemplo, a informação prévia disponível corresponde com os espectros de referência para os constituintes na amostra. Em tal caso, ambos informação

sobre a contribuição dos componentes R e os dados de espectrofotómetro A na equação [2] são conhecidos. Para determinar a composição da amostra Q primeiro multiplicar o lado esquerdo da equação com a informação sobre a contribuição dos componentes R transposta e depois multiplicar ambos lados à esquerda da equação com o inverso do produto da matriz da contribuição dos componentes R transposta e da contribuição dos componentes R

$$(R^T \cdot R)^{-1} \cdot R^T \cdot R \cdot Q = (R^T \cdot R)^{-1} \cdot R^T \cdot A \quad [3]$$

$$Q = (R^T \cdot R)^{-1} \cdot R^T \cdot A = \text{pinv}(R) \cdot A \quad [4]$$

Esta é, de facto, a equação para a regressão linear da matriz ou linear dos mínimos quadrados. A expressão no lado direito antes dos dados de espectrofotómetro A é conhecida como a pseudo-inversa da matriz R e pode, por exemplo, ser calculada utilizando decomposição do valor singular.

A título ilustrativo, será discutido um exemplo adicional para a situação inversa, pelo qual a composição dos constituintes é conhecida e pelo qual os espectros de referência precisam de ser determinados.

Assim, é discutido a seguir o problema inverso onde os coeficientes dos subcomponentes são conhecidos, as medições são conhecidas e o objetivo é obter os espectros de referência.

Ao transpor a equação inteira [1] é obtida a seguinte relação.

$$Q^T \cdot R^T = A^T \quad [5]$$

e os espectros de referência podem ser encontrados por

$$R^T = \text{pinv}(Q^T) \cdot A^T \quad [6]$$

Nos dois exemplos anteriores, é mostrada a situação dos constituintes conhecidos.

O algoritmo anterior indica características e vantagens que podem ser obtidas utilizando um método conforme descrito numa modalidade da presente invenção.

Num aspeto, a presente invenção também se refere a um sistema para analisar dados de espectrofotómetro UV-VIS de

uma ou mais amostras que compreendem ADN e/ou ARN, compreendendo o sistema um meio de entrada para receber ditos dados de espectrofotómetro UV-VIS, um meio de processamento programado para ajustar os dados de espectrofotómetro UV-VIS tendo em consideração pelo menos um espectro representativo para um par de bases sendo qualquer um de adenina-timina (AT) ou guanina-citosina (GC) ou adenina-uracilo e derivar do ajuste uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN e um meio de saída para produzir uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN para a uma ou mais amostras sob estudo. Características e vantagens adicionais opcionais podem corresponder com componentes para realizar a funcionalidade das etapas expressas nos métodos descritos anteriormente. Além disso, características e vantagens de sistemas ou componentes adicionais dos mesmos descritos a seguir, sendo também aspetos da presente invenção, também podem ser parcialmente ou totalmente incorporadas em sistemas para analisar dados de espectrofotómetro UV-VIS de uma ou mais amostras que compreende ADN e/ou ARN referidas acima. Tais sistemas adicionais podem ser, por exemplo, um sistema para realizar análise de dados de espectrofotómetro de uma ou mais amostras consistindo num número de constituintes. O sistema compreende um meio de entrada para obter informação prévia para a uma ou mais amostras em relação aos seus constituintes e para obter dados de espectrofotómetro UV-VIS para a uma ou mais amostras. Este último pode ser uma porta de entrada para receber informação prévia e dados do espectrofotómetro. Em alternativa, o meio de entrada pode também compreender um sistema de medição para registar dados de espectrofotómetro UV-VIS tal como, por exemplo, um espectrofotómetro. O sistema compreende ainda um meio de processamento programado para definir um número de componentes sobrepostos que contribuem nos dados de espectrofotómetro UV-VIS, compreendendo o número de

componentes um ou mais componentes atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras e compreendendo o número de componentes um ou mais componentes que não podem ser atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras. Tal meio de processamento pode ser, por exemplo, uma unidade CPU, apesar das modalidades da presente invenção não estarem limitadas a isso. O meio de processamento, de acordo com modalidades da presente invenção, é ainda programado para utilizar a informação prévia para a uma ou mais amostras em relação aos seus constituintes e utilizar os dados de espectrofotómetro UV-VIS, estimar a composição dos constituintes e as contribuições dos componentes aos dados de espectrofotómetro UV-VIS para o número de componentes para dita uma ou mais amostras minimizando um resíduo entre os dados do espectrofotómetro UV-VIS e um ajuste baseado em dita composição constituinte e ditas contribuições dos componentes, obtendo, assim, informação relativa a um ou mais componentes que não podem ser atribuídos a constituintes conhecidos da uma ou mais amostras. Tal informação pode ser disponibilizada utilizando um meio de saída, tal como, por exemplo, uma memória, um monitor, uma impressora ou uma plotter.

Noutro aspeto, a presente invenção refere-se a um método para extrair contribuições dos componentes, por exemplo, espectros de referência para constituintes particulares da amostra para contribuições de tais constituintes sendo modificados, perturbados ou estando num ambiente particular. Os espectros de referência podem ser extraídos utilizando método conforme descrito anteriormente. Tal método para extrair contribuições dos componentes podem corresponder com um método para analisar dados do espectrofotómetro UV-VIS de uma amostra que compreende ADN e/ou ARN conforme descrito anteriormente.

Num aspeto, a presente invenção também se refere à

utilização de um método, conforme descrito anteriormente, para aplicações particulares. Uma destas aplicações pode ser identificar e/ou quantificar contaminantes em amostras com ADN ou ARN. Os contaminantes podem ser por contaminação proteica. Os contaminantes numa aplicação podem ser contaminantes inibidores de PCR. Outra aplicação prevista é a quantificação de uma quantidade de ADN de cadeia dupla numa mistura de ADN de cadeia dupla e ARN ou ADN de cadeia simples. Ainda uma aplicação adicional é a determinação da composição de um polinucleotídeo ou proteína. Uma aplicação adicional é a quantificação da eficiência de modificação numa amostra. O método também pode ser aplicado para validar uma composição de amostra ou um constituinte do mesmo ou grupo de constituintes dos mesmos. Por extensão, o método permite extrair informação mais detalhada sobre a composição de um componente, em particular de polímeros e mais especificamente em biopolímeros, tais como polinucleotídeos e proteínas. De forma inversa, o método também permite extrair informação quantitativa de polímeros com base no conhecimento prévio da composição dos componentes conhecidos, em vez do conhecimento do espectro do componente.

Ainda noutro aspeto, modalidades da presente invenção também se referem a métodos implementados por computador para realizar pelo menos parte dos métodos para analisar dados de espectrofotómetro. Modalidades da presente invenção também se referem a produtos de programa de computador correspondentes. Os métodos podem ser implementados num sistema de computador. Podem ser implementados como software, como hardware ou como uma combinação dos mesmos. Tais métodos podem ser adaptados para serem realizados num computador de uma forma automática e/ou automatizada. No caso de implementação ou implementação parcial como software, tal software pode ser adaptado para ser executado num computador adequado ou plataforma de computador, com

base em um ou mais processadores. O software pode ser adaptado para utilização com qualquer sistema operativo adequado, tal como, por exemplo, um sistema operativo Windows ou sistema operativo Linux. O meio de computação pode compreender um meio de processamento ou processador para processar os dados. De acordo com algumas modalidades, o meio de processamento ou processador pode ser adaptado para analisar espectros de acordo com qualquer um dos métodos, conforme descrito anteriormente, ou extraíndo espectros de referência de acordo com qualquer um dos métodos, conforme descrito anteriormente. Além de um processador, o sistema de computação pode ainda compreender um sistema de memória compreendendo, por exemplo, ROM ou RAM, um sistema de saída, tal como, por exemplo, uma *drive* CD-rom ou DVD ou meios de produzir informação numa rede. Componentes de computador convencionais, tais como, por exemplo, um teclado, monitor, dispositivo de apontar, portas de entrada e saída, etc., também podem ser incluídos. O transporte de dados pode ser providenciado com base em *bus* de dados. A memória do sistema de computação pode compreender um conjunto de instruções, que, quando implementadas no sistema de computação, resultam na implementação de parte ou todas as etapas convencionais dos métodos, conforme apresentado anteriormente, e opcionalmente das etapas opcionais, conforme apresentado anteriormente. Os resultados obtidos podem ser produzidos através de um meio de saída, tal como, por exemplo, uma plotter, impressora, monitor ou como dados de saída em formato eletrónico.

Um aspeto adicional das modalidades da presente invenção abrange produtos de programa de computador incorporados num meio de suporte que suporta código legível por máquina para execução num dispositivo de computação, os produtos de programa informático como tal, bem como o suporte dos dados, tal como dispositivos dvd ou cd-rom ou

de memória. Aspectos das modalidades abrangem ainda a transmissão de um produto de programa informático por uma rede, tal como, por exemplo, uma rede local ou uma rede de área alargada, bem como os sinais de transmissão correspondentes com isso.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 7786295 B [0008]
- EP 1524514 A [0008]

Documentos não relacionados com patentes citados na descrição

- **SPJOTVOLL et al.** *Technometrics*, 1982, 24 [0006]
- **TATAUROV.** Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophysical Chemistry*, 2008, vol. 133, 66-70 [0077]

REIVINDICAÇÕES

1. Um método implementado por computador para analisar dados de espectrofotômetro UV-VIS de uma amostra que compreende ADN e/ou ARN, compreendendo o método

- receber dados de espectrofotômetro UV-VIS da amostra,
- ajustar os dados de espectrofotômetro UV-VIS tendo em consideração pelo menos um espectro representativo de uma amostra com um conteúdo em pares de bases, sendo o par de bases qualquer um de adenina-timina (AT) ou guanina-citosina (GC) ou adenina-uracilo (AU) e
- derivar do ajuste uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN.

2. Um método implementado por computador de acordo com a reivindicação 1, em que o dito ajuste compreende ter em consideração um conjunto de espectros de referência representativos para dois conteúdos diferentes de pares de bases.

3. Um método implementado por computador de acordo com a reivindicação 2, em que o dito ajuste compreende ter em consideração um conjunto de dois ou um conjunto de exatamente dois espectros de referência representativos de dois conteúdos diferentes de GC.

4. Um método implementado por computador de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o dito ajuste compreende ajustar dados de espectrofotômetro UV-VIS de uma amostra que compreende ADN e/ou ARN com pelo menos 50 pares de bases, vantajosamente pelo menos 100 pares de bases e/ou em que a dita amostra compreende ADN e o dito ajuste compreende utilizar uma combinação de um conjunto de espectros de referência representativos de pares de bases e sendo os espectros de referência representativos das bases

azotadas em separado.

5. Um método implementado por computador de acordo com a reivindicação 4, em que o dito ajuste utilizando uma combinação de espectros de referência representativos dos pares de bases e sendo os espectros de referência representativos das bases azotadas em separado, compreende um ajuste utilizando espectros que são espectros de diferença entre os espectros de referência representativos dos pares de bases e espectros de referência representativos das bases azotadas em separado.

6. Um método implementado por computador de acordo com a reivindicação 5, em que os espectros de diferença entre espectros de referência representativos de pares de bases e espectros de referência representativos das bases azotadas em separado são espectros obtidos subtraindo de determinados espectros de referência representativos de um determinado par de bases, sendo os espectros de referência representativos para as bases azotadas correspondentes em separado.

7. Um método implementado por computador de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, em que os espectros de referência representativos das bases azotadas em separado são espectros de referência para adenina, guanina, timina, citosina e/ou uracilo.

8. Um método implementado por computador de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, sendo o método adaptado para analisar uma reação de PCR de uma amostra que compreende ADN, em que a dita derivação compreende determinar uma quantidade de ADN de cadeia dupla formado durante ou após uma reação de PCR.

9. Um método implementado por computador, de acordo com a reivindicação 8, em que o ajuste compreende ainda ter em consideração um componente espectral para um componente de contaminação.

10. Um método implementado por computador, de acordo com a reivindicação 9, em que ter em consideração um componente espectral para um componente de contaminação compreende ter em consideração um componente espectral para um ou mais de trimetilglicina, guanidinatiocianato, fenol, ácido etilenodiaminatetracético, proteínas azida de sódio ou hemoglobina e/ou em que ajustar dados de espectrofotômetro UV-VIS de uma amostra compreende ajustar dados de espectrofotômetro UV-VIS de uma mistura que compreende trifosfatos de desoxinucleotídeos, iniciadores oligo, polimerase e ADN.

11. Um método implementado por computador de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que ajustar compreende ainda ter em consideração um ou mais componentes espectrais representativos da dispersão na amostra e/ou ter em consideração um ou mais componentes espectrais representativos da turbidez na amostra e/ou em que o ADN e/ou ARN é pelo menos uma quantidade de ADN de cadeia dupla.

12. Um sistema implementado por computador para analisar dados de espectrofotômetro UV-VIS de uma amostra que compreende ADN e/ou ARN, compreendendo o sistema

- um meio de entrada para receber os ditos dados de espectrofotômetro UV-VIS,
- um meio de processamento programado para ajustar os dados de espectrômetro UV-VIS tendo em consideração pelo menos um espectro representativo para um par de bases que é qualquer um de adenina-timina (AT) ou guanina-citosina

(GC) ou adenina-uracilo e derivar do ajuste uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN e
- um meio de saída para produzir uma quantificação de uma quantidade de ADN e/ou ARN para a amostra sob estudo.

13. Um sistema implementado por computador de acordo com a reivindicação 13, em que o dito meio de processamento é adaptado para realizar o ajuste conforme descrito em qualquer um dos métodos das reivindicações 1 a 11.

14. Um produto de programa informático para, se implementado numa unidade de processamento, executar um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

15. Um meio de suporte de dados que compreende um produto de programa informático, de acordo com a reivindicação 14.

16. Transmissão de um produto de programa informático, de acordo com a reivindicação 14, ao longo de uma rede de área local ou alargada.

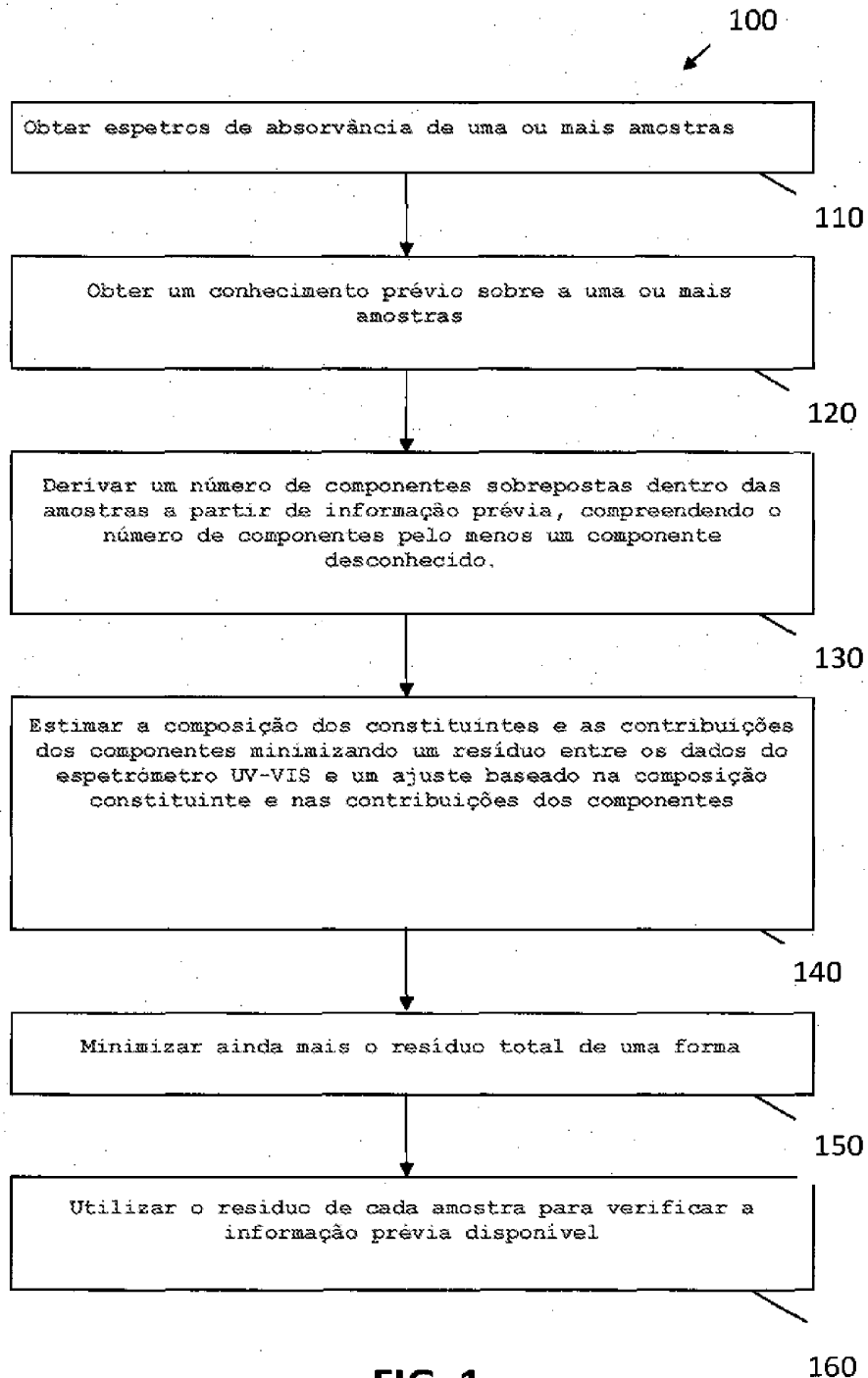


FIG. 1

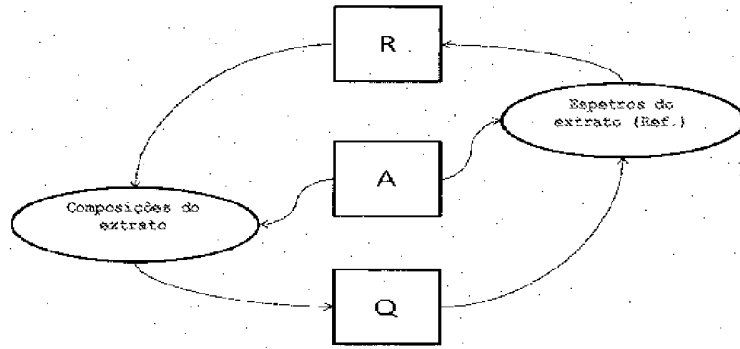


FIG. 2

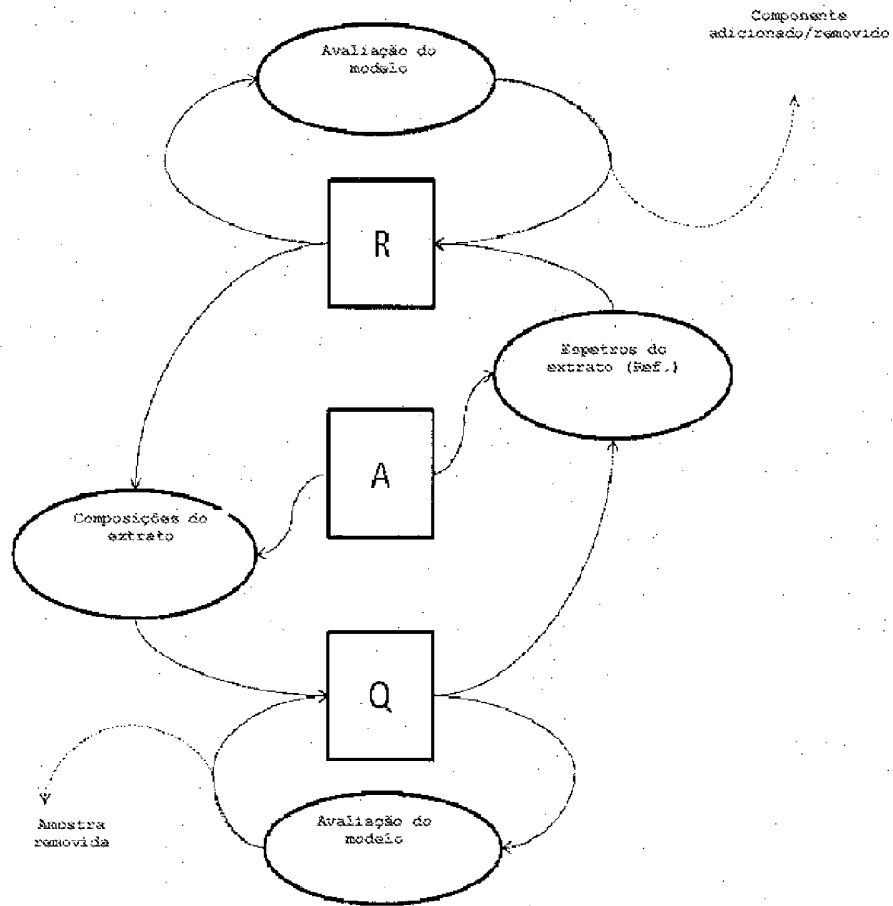


FIG. 3

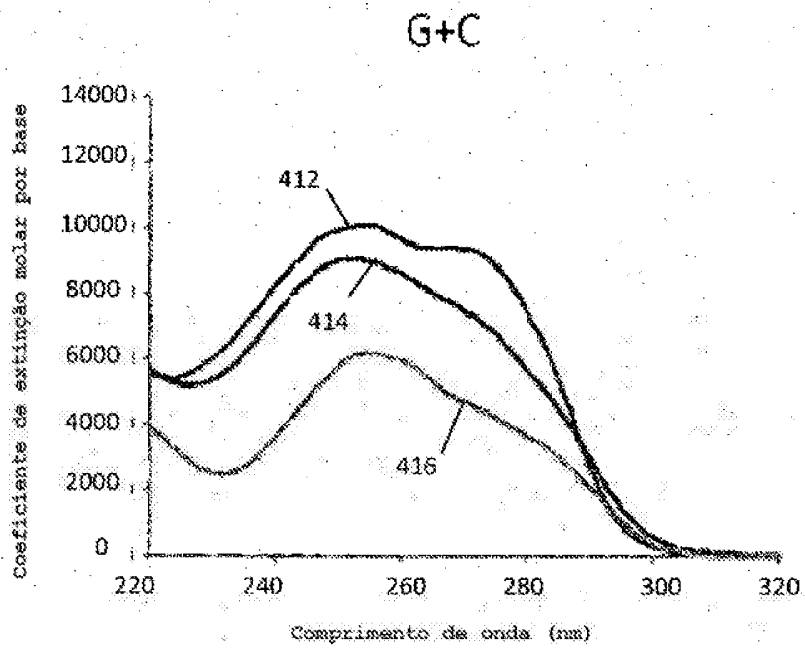
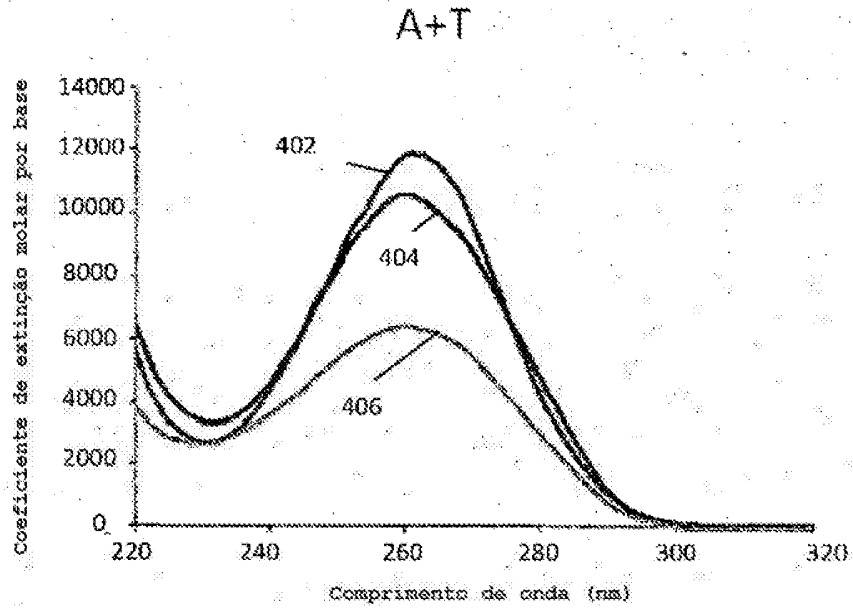


FIG. 4

Espetros previstos

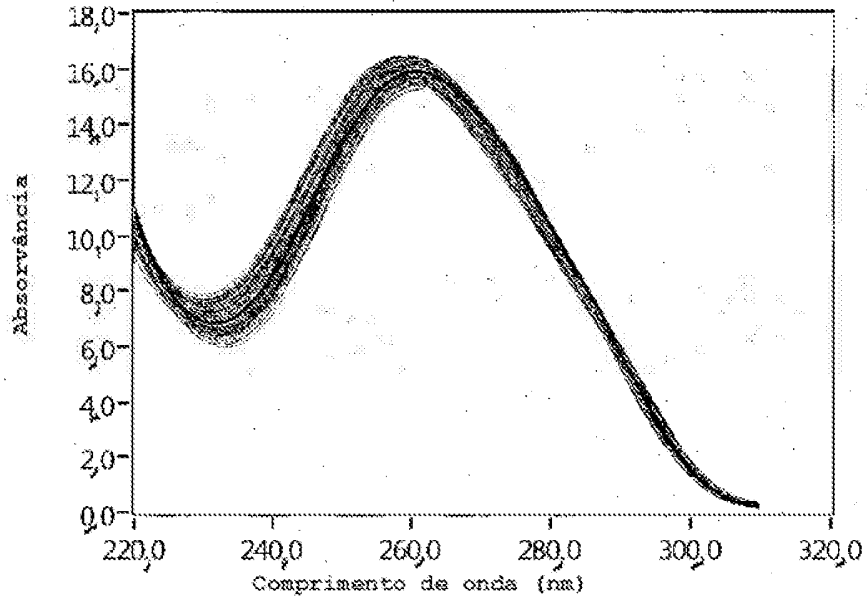


FIG. 5a

Espetros previstos

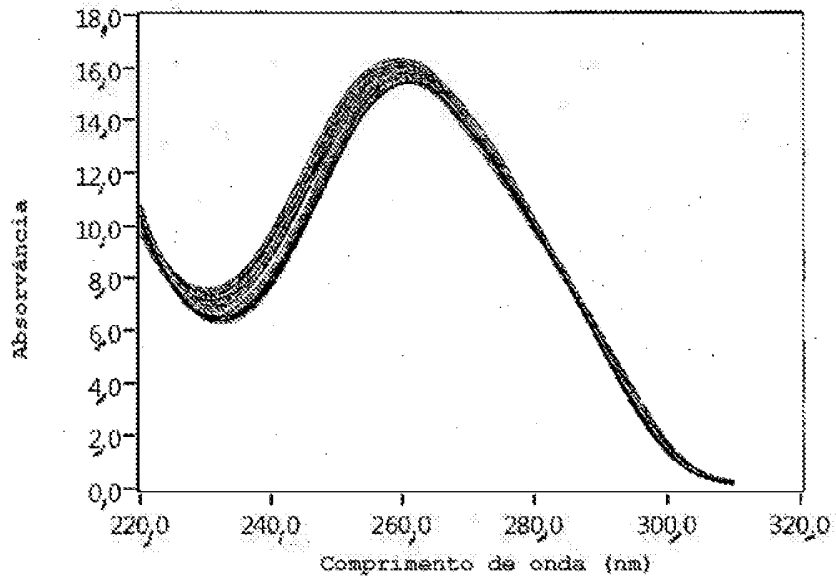


FIG. 5b

Espectros previstos

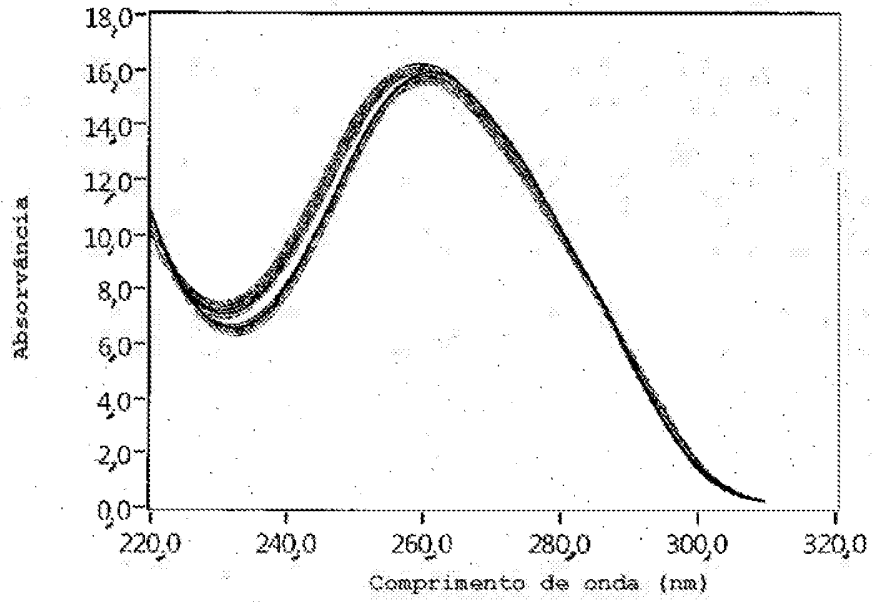


FIG. 5c

Espectros previstos

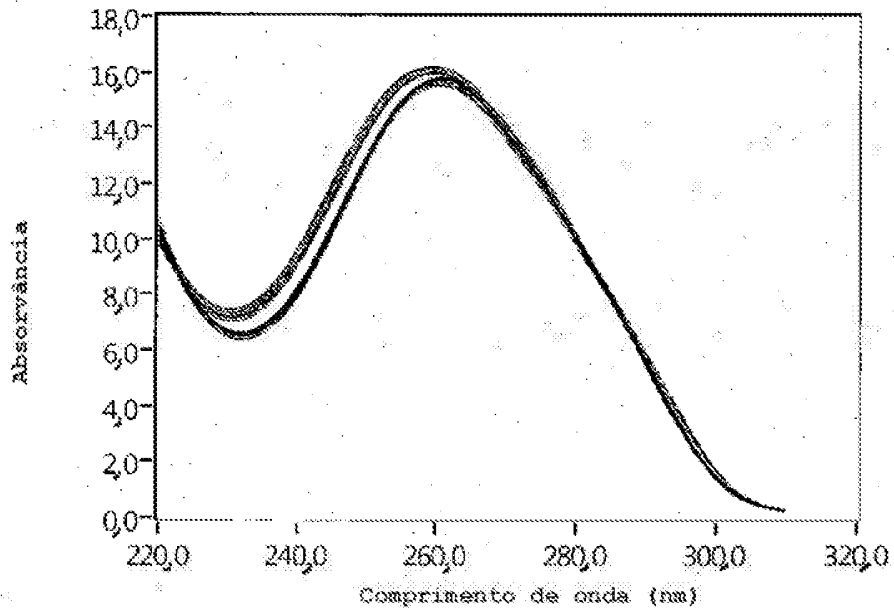


FIG. 5d



Espetros previstos

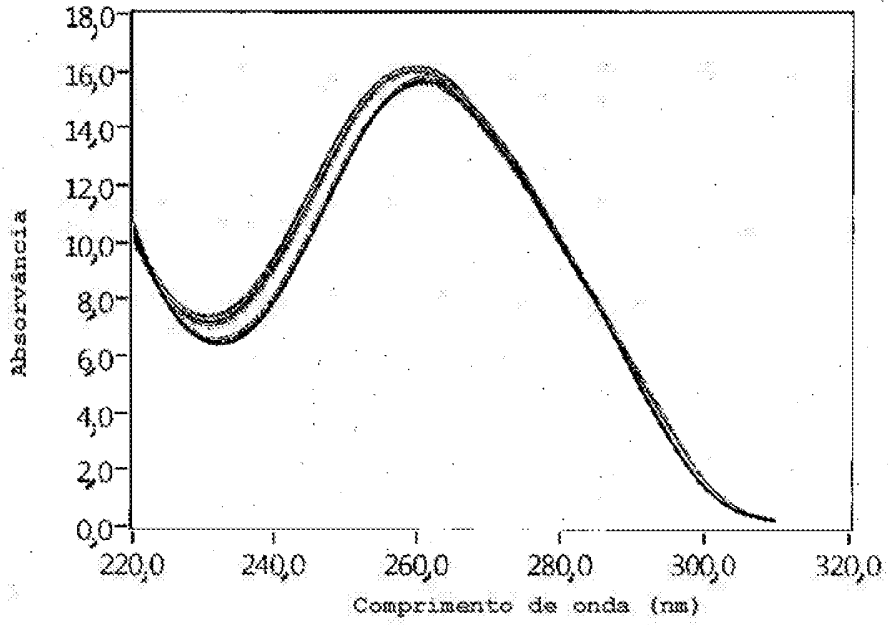


FIG. 5e

Espetros previstos

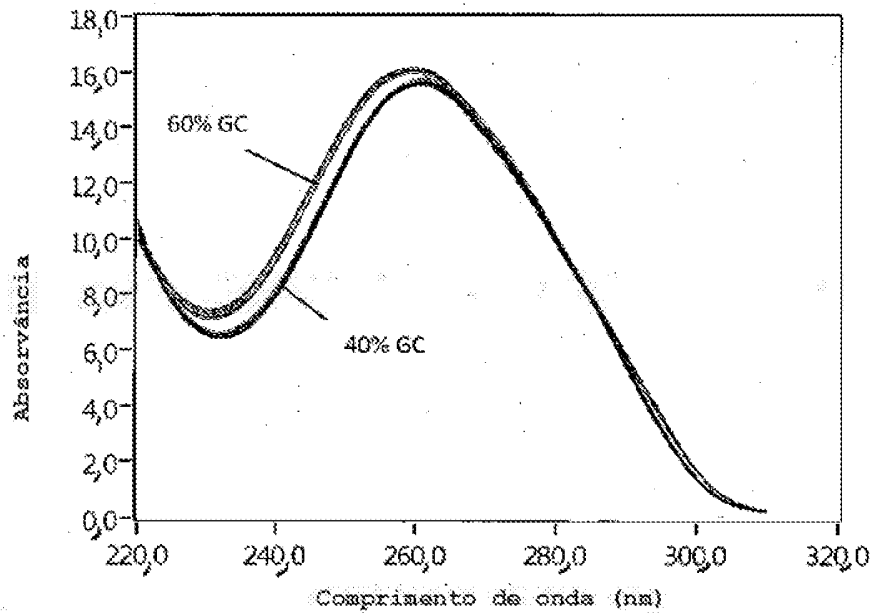


FIG. 5f



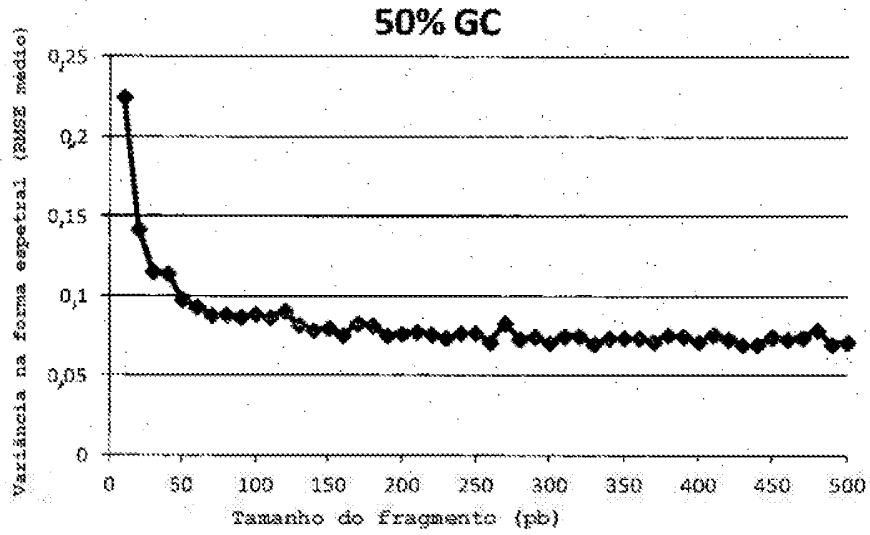


FIG. 6

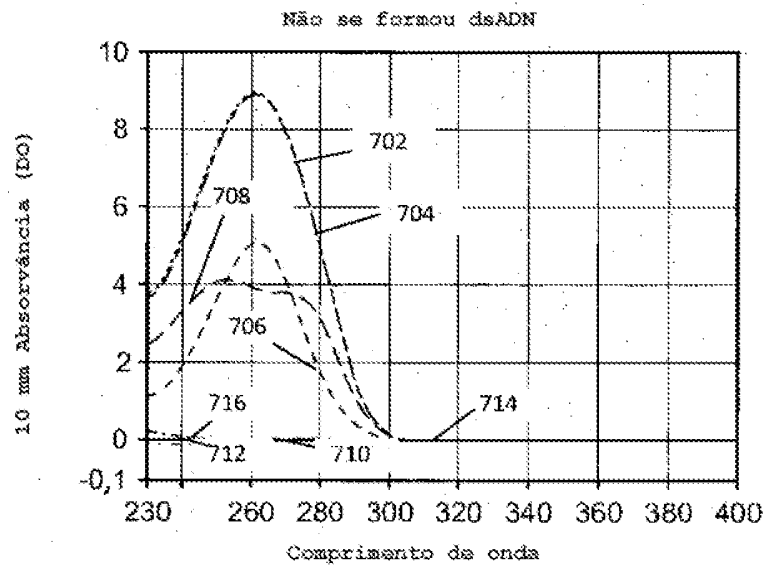


FIG. 7a

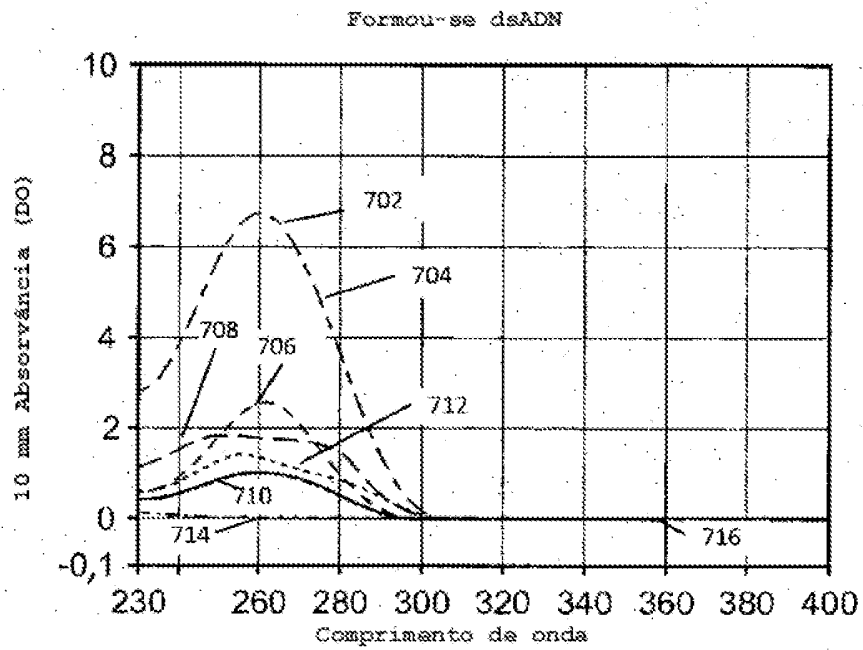


FIG. 7b

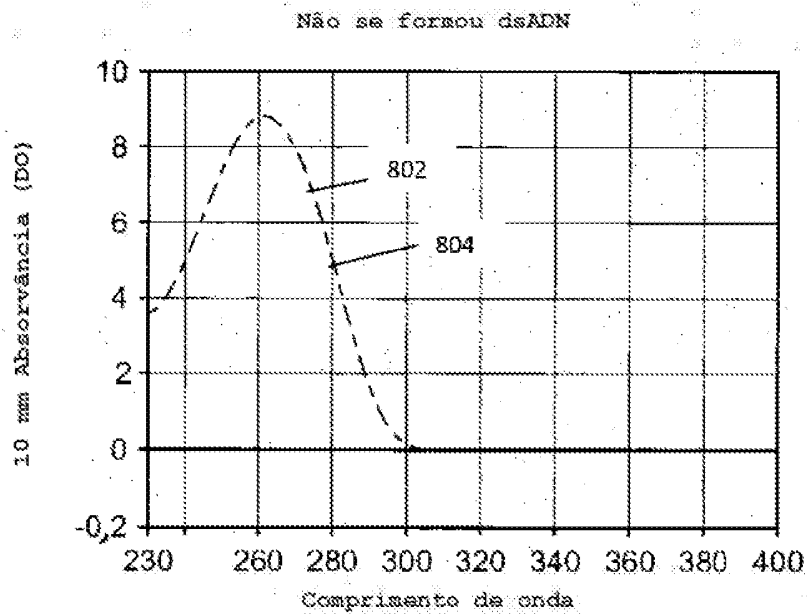


FIG. 8a

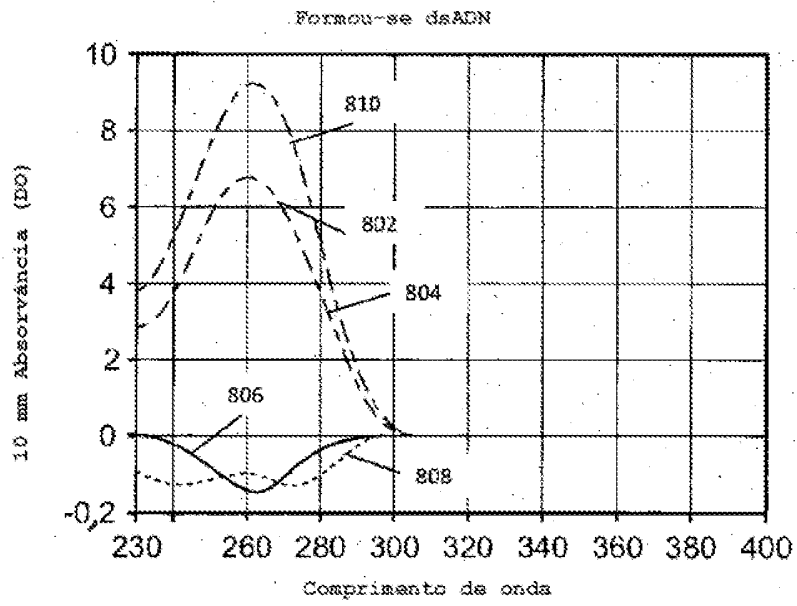


FIG. 8b

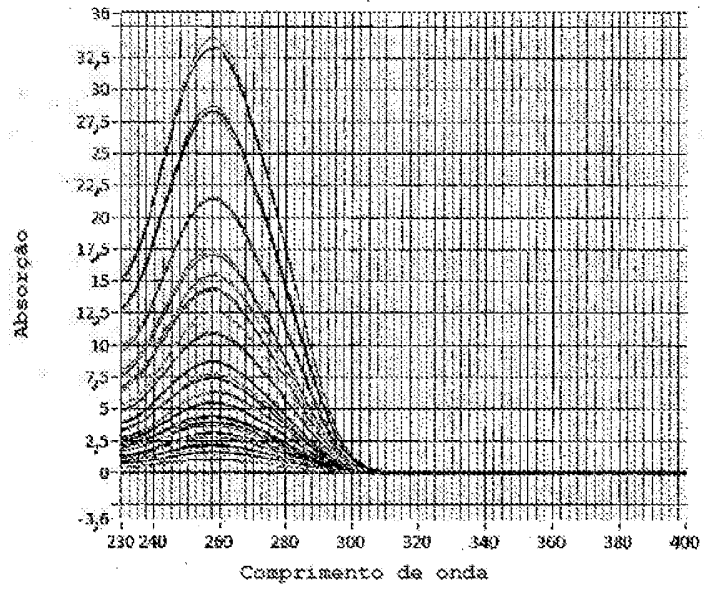


FIG. 9

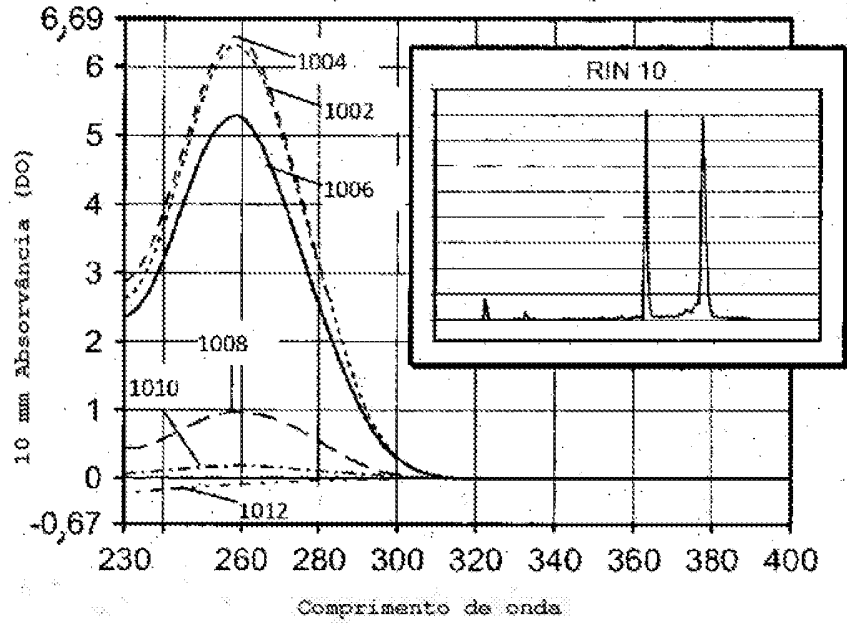


FIG. 10

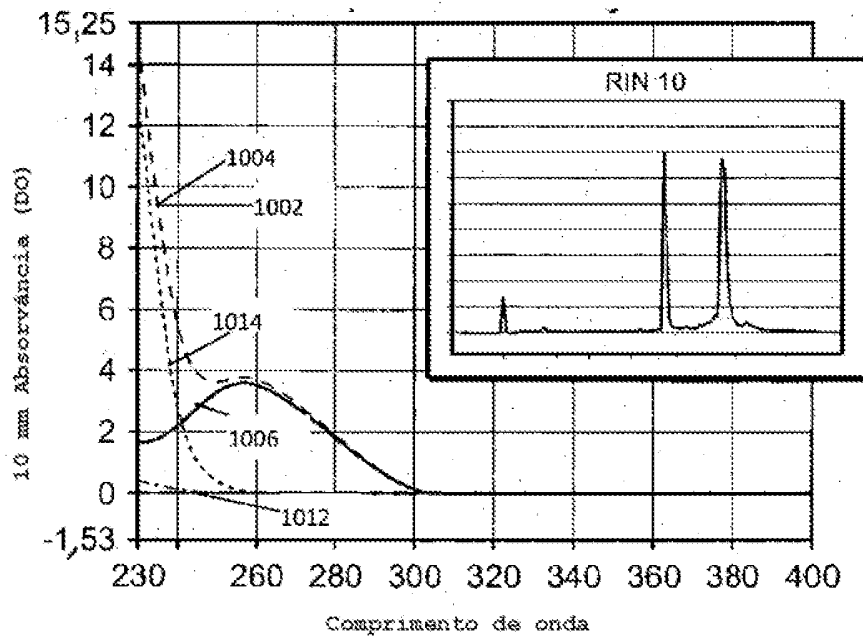


FIG. 11