



(21) PI 0816274-3 A2



(22) Data do Depósito: 08/09/2008

República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(43) Data da Publicação Nacional: 12/03/2009

(54) Título: MÉTODO E APLICAÇÕES PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALVO

(51) Int. Cl.: C12Q 1/68; G01N 33/53; G06F 19/00.

(30) Prioridade Unionista: 07/09/2007 US 60/970.707.

(71) Depositante(es): THIRD WAVE TECHNOLOGIES, INC..

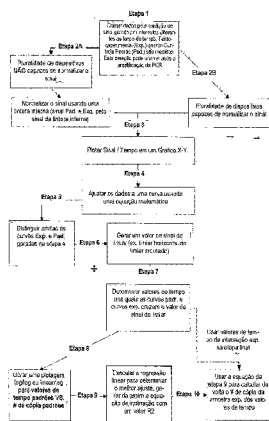
(72) Inventor(es): HATIM T. ALLAWI; VICTOR LYAMICHEV; REX PIPER.

(86) Pedido PCT: PCT US2008075595 de 08/09/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/033156 de 12/03/2009

(85) Data da Fase Nacional: 05/03/2010

(57) Resumo: MÉTODO E APLICAÇÕES PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALVO A presente invenção fornece métodos e aplicativos de software para quantificar um alvo em uma amostra experimental, pela coleta e processamento de dados de sinal iniciais da amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão> contendo os números de cópia do alvo conhecidos. A este respeito, a presente invenção permite a quantificação do número de cópia do alvo na amostra experimental



"MÉTODO E APLICAÇÕES PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALVO"

O presente pedido reivindica a prioridade do Pedido Provisório US Número de Série 60/970.707, depositado em 7 de setembro de 2007, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere aos métodos e aplicativos de software para quantificar um alvo em uma amostra experimental. Preferivelmente, o alvo é uma sequência de ácido nucléico que é detectada por um teste de detecção de ácido nucléico.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

10 A quantificação de ácidos nucléicos desempenha um papel importante nos campos da biologia e medicina. Por exemplo, a quantificação do ácido nucléico é importante no diagnóstico do câncer e prognóstico e diagnóstico viral e julgamentos dos efeitos terapêuticos (por exemplo, para HCV e HIV). A quantificação do RNA do HCV é importante para os pacientes que tomam IFN. O efeito da terapia de IFN pode ser diretamente encontrado pelo monitoramento da quantidade de vírus durante a terapia de IFN. Isso permite a terapia de IFN
15 mais eficaz que é adaptada às condições clínicas de cada paciente. A quantificação de ácido nucléico alvo é importante para o diagnóstico de doenças no futuro. Por exemplo, o diagnóstico precoce pode ser efetivo através do exame do nível de expressão do mRNA que responde a estímulos exógenos, no caso de uma doença que resulta de estímulos exógenos.
20 nos.

A reação de polimerase em cadeia pode ser empregada para a quantificação de ácidos nucléicos. No entanto, quando PCR é utilizado, a quantidade absoluta de amplificação de ácidos nucléicos não reflete com precisão a quantidade do ácido nucléico alvo que existia quando a amplificação foi iniciada. No início, a quantidade do produto amplificado por PCR
25 geralmente aumenta exponencialmente a cada ciclo, no entanto, a taxa de crescimento desacelera e pára quando a quantidade do produto amplificado excede certo nível. Assim, o valor final do produto amplificado é constante, independentemente da quantidade de ácido nucléico alvo quando a reação foi iniciada. Este fenômeno é conhecido como efeito platô, que deve ser levado em consideração na quantificação do produto amplificado por PCR.

30 A técnica conhecida como PCR em tempo real é amplamente empregada para a quantificação da sequência alvo. Nesta técnica, uma diluição em série do ácido nucléico alvo é preparada, cada amostra é submetida a PCR, e o curso do tempo é levado em tempo real. O ciclo do limiar (o valor Ct), com o qual uma determinada quantidade de produto amplificado é obtida em uma região onde a amplificação ocorre exponencialmente antes de
35 atingir o nível do efeito platô, é determinado. O valor determinado é representado em um eixo vertical, e a quantidade de ácido nucléico é plotada em um eixo horizontal. Assim, uma curva de calibração é preparada. Uma amostra desconhecida de interesse é submetida a

PCR, nas mesmas condições e o valor Ct é determinado. Isso permite a quantificação da quantidade de ácido nucléico na amostra desconhecida. Um dispositivo de detecção em tempo real geralmente é caro. Se esta técnica for realizada utilizando um ciclador térmico comercial comum, a amostra deve ser analisada para cada ciclo, a fim de determinar o ciclo do limiar com o qual uma determinada quantidade de produto amplificado é gerada. Assim, essa técnica exige uma grande quantidade de trabalho. PCR quantitativo competitivo também é uma técnica amplamente empregada. Nesta técnica, um ácido nucléico competidor tendo uma sequência similar à do ácido nucléico alvo que é diluído em uma maneira gradual, e os resultantes são adicionados a uma amostra contendo o ácido nucléico alvo a ser quantificado. Dependendo da quantidade de ácido nucléico competidor acrescentado, a razão entre a quantidade do produto amplificado a partir do ácido nucléico alvo para a quantidade do produto amplificado do ácido nucléico competidor acrescentado, é determinada. Assim, o ponto onde a quantidade do produto amplificado do ácido nucléico alvo que foi adicionado se torna igual à quantidade do produto amplificado do ácido nucléico competidor, representa a quantidade do ácido nucléico alvo. Embora esta técnica seja relativamente simples, a necessidade de preparação de competidores para cada primer complica a operação. Além disso, há um problema que a eficiência de amplificação do ácido nucléico alvo pode diferir daquela do ácido nucléico competidor.

Em face ao exposto, o que é necessário são métodos relativamente simples e baratos para a quantificação de ácidos nucléicos, e outros alvos, em uma amostra.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos e aplicativos de software para quantificar um alvo em uma amostra experimental, pela coleta e processamento de dados de sinal iniciais da amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo os números de cópia do alvo conhecidos. Em modalidades particulares, os dados de sinal iniciais são capazes de serem plotados como uma curva experimental (por exemplo, curva sigmoide ou outra curva) e pelo menos duas curvas de controle padrão (por exemplo, curvas sigmoidais ou outras curvas). Em certas modalidades, os dados de sinal iniciais são processados com uma linha de sinal do limiar para gerar valores de tempo de intersecção de controle e experimentais que podem ainda ser processados ainda para gerar dados plotados em log compreendendo as coordenadas para uma plotagem log/log ou plotagem linear/log. Em algumas modalidades, os dados plotados em log podem ser processados para gerar uma equação de inclinação que pode ser usada com o valor de tempo experimental para quantificar o número de cópia do alvo na amostra experimental.

Em algumas modalidades, a presente invenção fornece métodos de quantificar um alvo em uma amostra experimental compreendendo: a) fornecimento: i) de dados de sinal iniciais compreendendo nível de sinal do ensaio detectados em uma pluralidade de interva-

los de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia dos alvos conhecidos que são diferentes, onde os dados de sinal iniciais são capazes de ser plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão, e ii) uma linha de sinal do limiar tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar; onde a linha de sinal do limiar está acima do nível base e intersecta a curva experimental e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão; e b) processamento dos dados de sinal iniciais e a linha de sinal do limiar para gerar um valor de tempo de interseção experimental e pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão; c) processamento de pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão e números de cópia dos alvos conhecidos para gerar dados plotados em log compreendendo coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus os números de cópia dos alvos conhecidos; d) processamento dos dados plotados em log para gerar uma equação de inclinação descrevendo uma inclinação resultante ajustada aos dados plotados em log; e e) processamento do valor de tempo de interseção experimental com a equação de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental. Em outras modalidades, a presente invenção fornece métodos de quantificar um alvo em uma amostra experimental compreendendo: a) fornecimento, i) uma interface de usuário configurada para receber dados de sinal iniciais, e ii) um sistema de computador tendo armazenado no mesmo um aplicativo de software de quantificação alvo, e, b) transmissão dos dados de sinal iniciais da interface de usuário para o sistema de computador, onde o dado de sinal inicial compreende nível de sinal do ensaio detectado em uma pluralidade de intervalos de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia dos alvos conhecidos que são diferentes, onde o dado do sinal é capaz de ser plotado como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão; c) processamento do dado de sinal com o aplicativo de software de quantificação do alvo tal que o software de quantificação alvo: i) gera uma linha de sinal do limiar tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar; onde a linha de sinal do limiar está acima do nível base e cruza a curva experimental e duas ou mais de pelo menos, duas curvas de controle padrão; ii) processa os dados de sinal e linha de sinal do limiar para gerar um valor de tempo de interseção experimental e pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão, iii) processa pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão e os números de cópia alvo conhecidos para gerar dados plotados em log compreendendo coordenadas para uma plotagem log/log, plotagem log/linear, dos valores de tempo de interseção versus os números de cópia dos alvos conhecidos; iv) processa os dados plotados em log para gerar uma equação de inclinação descrevendo uma inclinação resultante para ajustar aos dados plotados em log; e v) proces-

sa os valores de tempo de interseção experimentais com a equação de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental.

Em modalidades adicionais, a presente invenção fornece sistemas para quantificar um alvo em uma amostra experimental compreendendo: a) um dispositivo configurado para
5 ensaio do nível de detecção em uma pluralidade de intervalos de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia do alvo conhecidos que são diferentes, para gerar dados de sinal inicial, b) um aplicativo de software de quantificação de alvo configurado para: i) processar os dados de sinal iniciais para gerar dados de sinal que são capazes de serem plotados como uma curva experimen-
10 tal e pelo menos duas curvas de controle padrão, ii) gerar uma linha de sinal do limiar tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar; onde a linha de sinal do limiar está acima da base e cruza a curva experimental e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão; iii) processar os dados de sinal e linha de sinal do limiar para gerar um valor de tempo de interseção experimental e pelo menos dois valores de tempo
15 de interseção de controle padrão; iv) processar pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão e os números de cópia do alvo conhecidos para gerar dados plotados em log compreendendo as coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus os números de cópia do alvo conhecidos; v) processar os dados plotados em log para gerar uma equação de inclinação descrevendo
20 uma inclinação resultante ajustada aos dados plotados em log; e vi) processar os valores de tempo de interseção experimentais com a equação de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental; e c) um sistema de computador tendo armazenado no mesmo o aplicativo de software de quantificação do alvo, onde o sistema de computador compreende a memória do computador e um processador de compu-
25 tador.

Em modalidades particulares, a presente invenção fornece o dispositivo de memória de computador tendo armazenado no mesmo um aplicativo de software de quantificação de alvo, onde o aplicativo de software de quantificação de alvo é configurado para: a) pro-
30 cessar os dados de sinal iniciais para gerar dados de sinal que são capazes de serem plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão, onde os dados de sinal iniciais compreendem o nível de sinal do ensaio detectado em uma pluralidade de intervalos de tempo a partir de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia do alvo conhecidos que são diferentes; b) gerar uma linha de sinal do limiar tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma
35 inclinação do limiar; onde a linha de sinal do limiar está acima da base e intersecta a curva experimental e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão; c) processar os dados de sinal iniciais e a linha de sinal do limiar para gerar um valor de tempo de inter-

seção experimental e pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão; d) processar pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão e números de cópia do alvo conhecidos para gerar dados plotados em log compreendendo as coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus os números de cópia do alvo conhecidos; e) processar os dados plotados em log para gerar uma equação de inclinação descrevendo uma inclinação resultante ajustada aos dados plotados em log; e f) processar o valor de tempo de interseção experimental com a equação de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental. Em determinadas modalidades, a presente invenção fornece métodos de quantificar um alvo em uma amostra experimental, compreendendo: a) exposição de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão para um teste de detecção do ácido nucléico, onde pelo menos as duas amostras de controle padrão contêm números de cópia do alvo conhecidos que são diferentes; b) ensaio de detecção dos níveis de sinal de: i) amostra experimental, ii) pelo menos duas amostras de controle padrão, e iii) pelo menos duas amostras de controle da tintura internas, onde o ensaio dos níveis de sinal são detectados na pluralidade de intervalos de tempo para gerar os dados de sinal brutos; c) normalização dos dados de sinal brutos para gerar: i) dados de sinal experimentais normalizados, ii) dados de sinal de controle padrão normalizados, e iii) um valor de sinal de controle de tintura interna normalizado; d) processamento dos dados de sinal experimentais normalizados e os dados de sinal de controle padrão normalizados para gerar dados de sinal que são capazes de ser plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão, e) determinação de pelo menos uma linha de sinal do limiar tendo um valor de sinal inicial no tempo zero e uma inclinação do limiar, onde a linha de sinal do limiar: i) está acima do valor de controle de tintura interno normalizado; ii) intercepta a curva experimental e iii) cruza duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão, f) processamento dos dados de sinal e linha de sinal do limiar para gerar um valor de tempo de interseção experimental e pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão; g) processamento de pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão e os números de cópia do alvo conhecidos para gerar dados plotados em log compreendendo coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus os números de cópia do alvo conhecidos; h) processamento dos dados plotados em log para gerar uma equação de inclinação descrevendo uma inclinação resultante ajustada aos dados plotados em log; e i) processamento dos valores de tempo de interseção experimentais com a equação de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental.

Em outras modalidades, a presente invenção fornece métodos de quantificar um alvo em uma amostra experimental compreendendo: a) fornecimento: i) dados de sinal iniciais

compreendendo nível de sinal do ensaio detectado em uma pluralidade de intervalos de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia dos alvos conhecidos que são diferentes, onde os dados de sinal iniciais são capazes de serem plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão, e ii) uma pluralidade de linhas de sinal dos limiares cada uma tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar; onde cada uma das linhas de sinal do limiar está acima do nível base e intercepta a curva experimental e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão; b) processamento dos dados de sinal iniciais e a pluralidade de linhas de sinal dos limiares para gerar um valor de tempo de interseção experimental e valor de tempo de interseção de controle padrão para cada uma das linhas de sinal dos limiares diferentes; c) processamento dos valores de tempo de interseção de controle padrão e números de cópia de alvos conhecidos para gerar dados plotados em log para cada uma das várias linhas de sinal dos limiares diferentes, onde os dados plotados em log compreendem coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus números de cópia dos alvos conhecidos; d) processamento dos dados plotados em log para gerar uma pluralidade de equações de inclinação descrevendo uma pluralidade de inclinações resultantes ajustadas aos dados plotados em log; onde cada uma das várias inclinações resultantes tem um valor de ajuste (por exemplo, um valor R^2) e e) processamento dos valores de tempo de interseção experimentais com pelo menos uma das várias equações de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental.

Em modalidades particulares, a presente invenção fornece métodos de quantificar um alvo em uma amostra experimental compreendendo: a) fornecimento, i) de uma interface de usuário configurada para receber dados de sinal iniciais, e ii) um sistema de computador tendo armazenado no mesmo um aplicativo de software de quantificação alvo, e, b) transmissão dos dados de sinal iniciais da interface de usuário para o sistema de computador, onde o dado de sinal inicial compreende nível de sinal do ensaio detectado em uma pluralidade de intervalos de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia dos alvos conhecidos que são diferentes, onde o dado do sinal é capaz de ser plotado como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão; c) processamento do dado de sinal com o aplicativo de software de quantificação do alvo tal que o software de quantificação de alvo: i) gerar uma pluralidade de linhas de sinal dos limiares diferentes cada uma tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar; onde cada linha de sinal do limiar estão acima do nível base e intercepta a curva experimental e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão; ii) processar os dados de sinal e a pluralidade de linhas de sinal dos limiares para gerar valores de tempo de interseção experimentais e valores de tempo de interse-

ção de controle padrão para cada linha de sinal do limiar diferente; iii) processa os valores de tempo de interseção de controle padrão e os números de cópia dos alvos para gerar dados plotados em log para cada uma da pluralidade de linhas de sinal do limiar diferentes, onde os dados plotados em log compreendem coordenadas para a plotagem log/log ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus os números cópia dos alvos conhecidos; iv) processar os dados plotados em log para gerar uma pluralidade de equação de inclinação descrevendo uma pluralidade de inclinações resultantes ajustadas aos dados plotados em log, onde cada uma das várias inclinações resultantes tem um valor de ajuste (ex., um valor R^2); e v) processar os valores de tempo de interseção experimentais com pelo menos uma das várias equações de inclinação para gerar um números cópia dos alvos quantificados para a amostra experimental.

Em algumas modalidades, a presente invenção fornece sistemas para quantificar um alvo em uma amostra experimental compreendendo: a) um dispositivo configurado para ensaio de detecção do nível de sinal em uma pluralidade de intervalos de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia do alvo conhecidos que são diferentes, para gerar dados de sinal iniciais, b) um aplicativo de software de quantificação de alvo configurado para: i) processar os dados de sinal iniciais para gerar dados de sinal que são capazes de serem plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão, ii) gerar uma pluralidade de linhas de sinal dos limiares diferentes cada uma tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar; onde cada uma das linhas de sinal dos limiares está acima da base e cruza a curva experimental e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão; iii) processar os dados de sinal e a pluralidade de linhas de sinal dos limiares para gerar valores de tempo de interseção experimentais e valores de tempo de interseção de controle padrão para cada uma das linhas de sinal dos limiares diferentes; iv) processar pelo menos os valores de tempo de interseção de controle padrão e os número de cópia do alvo conhecidos para gerar dados plotados em log para cada uma das linhas de sinal dos limiares diferentes, onde os dados plotados em log compreendem coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus os números de cópia do alvo conhecidos; v) processar os dados plotados em log para gerar uma pluralidade de equações de inclinação descrevendo uma pluralidade de inclinações resultantes ajustadas aos dados plotados em log, onde cada uma das várias inclinações resultantes tem um valor de ajuste (ex., um valor R^2); e vi) processar o valor de tempo de interseção experimental com pelo menos uma da pluralidade de equações de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental; e c) um sistema de computador tendo armazenado no mesmo o aplicativo de software de quantificação do alvo, onde o sistema de computador compreende a memória do computador e um

processador de computador.

Em outras modalidades, a presente invenção fornece o dispositivo de memória de computador tendo armazenado no mesmo um aplicativo de software de quantificação de alvo, onde o aplicativo de software de quantificação de alvo é configurado para: a) processar os dados de sinal iniciais para gerar dados de sinal que são capazes de serem plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão, onde os dados de sinal iniciais compreendem o nível de sinal do ensaio detectado em uma pluralidade de intervalos de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo os números de cópia do alvo conhecidos que são diferentes; e b) gerar uma pluralidade de linhas de sinal dos limiares cada uma tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar, onde cada uma das linhas de sinal do limiar está acima da base e intercepta a curva experimental e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão; c) processar os dados de sinal iniciais e a pluralidade de linhas de sinal dos limiares para gerar valores de tempo de interseção experimentais e valores de tempo de interseção de controle padrão para cada uma das linhas de sinal dos limiares diferentes; d) processar os valores de tempo de interseção de controle padrão e números de cópia de alvos conhecidos para gerar dados plotados em log para cada uma das várias linhas de sinal dos limiares diferentes, onde os dados plotados em log compreendem coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus números de cópia dos alvos conhecidos; e) processar os dados plotados em log para gerar uma pluralidade de equações de inclinação descrevendo uma pluralidade de inclinações resultantes ajustadas aos dados plotados em log; onde cada uma das várias inclinações resultantes tem um valor de ajuste (por exemplo, um valor R^2) e f) processar os valores de tempo de interseção experimentais com pelo menos uma das várias equações de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental.

Em determinadas modalidades, a presente invenção fornece métodos de quantificar um alvo em uma amostra experimental, compreendendo: a) exposição de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão para um teste de detecção do ácido nucléico, onde pelo menos as duas amostras de controle padrão contêm números de cópia do alvo conhecidos que são diferentes; b) ensaio de detecção dos níveis de sinal: i) da amostra experimental, ii) pelo menos duas amostras de controle padrão, e iii) pelo menos duas amostras de controle da tintura internas, onde o ensaio dos níveis de sinal são detectados na pluralidade de intervalos de tempo para gerar os dados de sinal brutos; c) normalização dos dados de sinal brutos para gerar: i) dados de sinal experimentais normalizados, ii) dados de sinal de controle padrão normalizados, e iii) um valor de sinal de controle de tintura interna normalizado; d) processamento dos dados de sinal experimentais normalizados e os dados de sinal de controle padrão normalizados para gerar dados de sinal que são capazes

de ser plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão, e) determinação de uma pluralidade de linhas de sinal dos limiares cada uma tendo um valor de sinal inicial no tempo zero e uma inclinação do limiar, onde cada uma das linhas de sinal dos limiares estão: i) acima do valor de controle de tintura interna normalizado; ii) intercepta a curva experimental e iii) cruza duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão, f) processar os dados de sinal e a pluralidade de linhas de sinal do limiar para gerar um valor de tempo de interseção experimental e valores de tempo de interseção de controle padrão para cada uma das linhas de sinal dos limiares diferentes; g) processar valores de interseção de controle padrão e os números de cópia do alvo conhecidos para gerar dados plotados em log para cada uma das várias linhas de sinal dos limiares diferentes, onde os dados plotados em log compreende as coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus os números de cópia dos alvos conhecidos; h) processar os dados plotados em log para gerar uma pluralidade de equações de declive descrevendo uma pluralidade de inclinações resultantes ajustadas aos dados plotados em log, onde cada uma das várias inclinações resultantes tem um valor de ajuste (ex., um valor R^2); e i) processar os valores de tempo de interseção experimentais com pelo menos uma das várias equações de inclinação para gerar um número de cópia do alvo para a amostra experimental.

Em algumas modalidades, pelo menos uma equação de inclinação tem o melhor valor de ajuste de qualquer da pluralidade de inclinações resultantes. Em outras modalidades, a pluralidade de linhas de sinal do limiar diferentes é pelo menos duas linhas de sinal do limiar diferentes (por exemplo, pelo menos, 2, 3, 4 ... 10 ... 15 ... 25 ... 100 ... 1000 ... 10.000 ... todas as linhas de sinal do limiar possíveis que poderiam ser geradas por um computador).

Em certas modalidades, a inclinação do limiar é zero (linha horizontal). Em modalidades adicionais, a inclinação do limiar é negativa (linha inclinada para baixo). Em modalidades particulares, a inclinação do limiar é positiva (linha inclinada para cima).

Em modalidades particulares, o número da cópia do alvo quantificado na amostra experimental é gerado dentro de cerca de 150 segundos ou menos a partir do momento em que um nível de sinal do ensaio é detectado primeiro a partir da amostra experimental (por exemplo, dentro de cerca de 75 segundos ... cerca de 100 segundos. ... cerca de 125 segundos ... ou cerca de 150 segundos). Em modalidades particulares, o número de cópia do alvo quantificado na amostra experimental é gerado dentro de cerca de 45 segundos ou menos a partir do momento em que um nível de sinal do ensaio é detectado primeiro a partir da amostra experimental (por exemplo, dentro de cerca de 15 segundos ... cerca de 30 segundos. ... ou cerca de 45 segundos). Em modalidades particulares, o número de cópia do alvo quantificado na amostra experimental é gerado entre cerca de 2 minutos a cerca de 35 mi-

nutos a partir do momento em que um nível de sinal do ensaio é detectado primeiro a partir da amostra experimental.

Em algumas modalidades, o nível de sinal do ensaio é gerado por um ensaio de detecção do ácido nucléico. Em outras modalidades, o ensaio de detecção do ácido nucléico compreende um ensaio de clivagem invasivo. Em outras modalidades, o ensaio de detecção do ácido nucléico é executado, ou configurado para executar, sob condições isotérmicas. Em modalidades particulares, o alvo compreende uma seqüência de ácidos nucléicos. Em modalidades adicionais, a seqüência de ácido nucléico compreende uma seqüência de RNA ou DNA. Em outras modalidades, a seqüência de ácido nucléico compreende uma seqüência de micro-RNA ou siRNA. Em algumas modalidades, o nível de sinal do ensaio é gerado por uma proteína, carboidrato, ou ensaio de detecção de pequenas moléculas (por exemplo, capaz de gerar dados com o tempo que podem ser plotados em uma curva).

Em certas modalidades, a pluralidade de intervalos de tempo são intervalos de tempo regularmente espaçados (por exemplo, a cada segundo ... a cada 5 segundos ... a cada 30 segundos ... a cada minuto ... a cada 5 minutos). Em outras modalidades, a pluralidade de intervalos de tempo compreende pelo menos 5 intervalos de tempo (por exemplo, pelo menos, 7 ... 15 ... 25 ... 50 ... 100 ... 200 ... 400 ... 600 ... 800 ... 1000 ... 5000 intervalos de tempo). Em modalidades particulares, os intervalos do temporizador são a cada 5 a 30 segundos. Em certas modalidades, a quantidade do alvo na amostra experimental é desconhecida. Em modalidades particulares, pelo menos duas amostras de controle padrão contêm números de cópia do alvo conhecidos que diferem uns dos outros por um fator de pelo menos cerca de dez (por exemplo, diferem em 10 vezes ... 15 vezes ... 20 vezes ... 50 vezes ... 100 vezes ... ou mais) Em outras modalidades, pelo menos duas amostras de controle padrão compreendem 2 a 100 amostras de controle padrão ou mais (por exemplo, 2 ... 5 ... 10 ... 25 ... 50 ... ou 100 amostras de controle padrão). Em certas modalidades, pelo menos, dois, três, quatro ou mais amostras experimentais são analisadas em conjunto. Em outras modalidades, várias amostras experimentais são empregadas e estas amostras são quantificadas com sucesso, mesmo que sejam diferentes no número de cópia uns dos outros por 4, 5 ou 6 logs (por exemplo, a faixa dinâmica dos métodos permite que as amostras experimentais com números de cópia muito diferentes sejam analisadas em conjunto). Em algumas modalidades, a linha de sinal do limiar cruza a curva experimental e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão em uma porção linear destas curvas. Em modalidades particulares, os dados de sinal iniciais compreendem dados de sinal normalizados (por exemplo, normalizados automaticamente por um dispositivo de leitura de sinal do ensaio leitura configurado para normalizar o sinal ou dividindo os sinais do ensaio pelo sinal de uma amostra de controle de sinal interno). Em modalidades adicionais, os dados do sinal iniciais compreendem ainda o nível de sinal de ensaio detectado em uma pluralidade de

intervalos de tempo de uma amostra de controle de sinal interno. Em modalidades adicionais, os dados de sinal iniciais são normalizados com base na amostra de controle de sinal interno ou outra amostra de controle de sinal interno.

Em modalidades particulares, a equação de inclinação é gerada usando regressão linear. Em outras modalidades, a inclinação é mais uma inclinação melhor ajustada.

Em algumas modalidades, os dados de sinal iniciais compreendem ainda o nível de sinal de ensaio detectado em uma pluralidade de intervalos de tempo de pelo menos uma amostra experimental adicional. Em outras modalidades, o processamento em qualquer, todas ou algumas das etapas é realizado por um computador, ou em parte por um computador (por exemplo, o processador de um computador). Em modalidades particulares, o processamento em qualquer, todas ou algumas das etapas é realizado, pelo menos em parte, manualmente.

Em algumas modalidades, a presente invenção fornece sistemas para exibir resultados de saída simultaneamente em uma única tela compreendendo: a) um sistema de computador tendo armazenado no mesmo um aplicativo de software de quantificação de alvo, onde o sistema de computador compreende memória de computador e um processador de computador, e em que o software de quantificação de alvo é configurado para gerar resultados de saída, e b) uma interface de usuário compreendendo uma tela configurada para exibir os resultados de saída do aplicativo de software de quantificação de alvo, onde os resultados de saída são mostrados simultaneamente na tela, e onde os resultados de saída compreendem: i) um primeiro sinal de plotagem de gráfico ao longo do tempo, onde o primeiro gráfico compreende: A) pelo menos duas curvas com base em amostras de controle padrão normalizadas, e B) uma linha de sinal do limiar que cruza pelo menos duas curvas (e pelo menos uma curva com base em uma amostra experimental), e ii) um segundo sinal de plotagem de gráfico ao longo do tempo, onde o segundo gráfico compreende um ajuste de inclinação resultante para os pontos de dados determinados pela localidade onde a linha de sinal do limiar no primeiro gráfico intercepta pelo menos duas curvas.

Em modalidades particulares, os resultados de saída compreendem ainda: iii) um mostrador de placa, onde o mostrador de placa fornece uma representação visual de uma pluralidade de poços de amostras, onde pelo menos uma porção da pluralidade de poços de amostra compreende as amostras de controle padrão normalizadas. Em certas modalidades, os resultados de saída compreendem ainda: uma caixa de resumo das estatísticas, onde a caixa de resumo das estatísticas compreende pelo menos um dos seguintes: A) um valor de sinal inicial para a linha de sinal do limiar; B) uma inclinação do limiar para a linha de sinal do limiar; ou C) valores numéricos das amostras de controle padrão normalizadas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra um fluxograma de uma modalidade exemplar para a implementa-

ção dos métodos e aplicativos de software da presente invenção.

A Figura 2 mostra dados de sinal normalizados de 249 intervalos de tempo (intervalos de 11 segundos) de uma pluralidade de amostras de controle padrão, correm em duplicata, com número de cópias do alvo diferentes. As Figuras 2A, 2B, e 2C mostram os dados para intervalos de tempo 1-29, Figuras 2D, 2E e 2F mostram dados para intervalos de tempo 30-58, Figuras 2G, 2H, e 2I mostram dados para intervalos de tempo 59-87, Figuras 2J, 2K, e 2L mostram dados para intervalos de tempo 88-116, Figuras 2M, 2N, e 2O mostram os dados para intervalos de tempo 117-145, Figuras 2P, 2Q e 2R mostram dados para intervalos de tempo 146-174, Figuras 2S, 2T, e 2U mostram os dados para intervalos de tempo de 175-203, Figuras 2V, 2W e 2X mostram dados para intervalo de tempo 204-232, e Figuras 2Y, 2Z e 2AA mostram dados para os intervalos de tempo 233-249.

A Figura 3 mostra os dados de sinal normalizados de 249 intervalos de tempo (intervalos de 11 segundos) de três amostras experimentais (B4, E4 e F4). A Figura 3A mostram dados para intervalos de tempo 1-44, Figura 3B mostra dados para intervalos de tempo 45-90, Figura 3C mostra dados para intervalos de tempo 91-136, Figura 3D mostra os dados para intervalos de tempo 137-182, e a Figura 3E mostra os dados para intervalos de tempo 183-228, e Figura 3F mostra dados para intervalos de tempo 229-249.

A Figura 4 mostra as curvas geradas a partir dos dados de sinal normalizados. A Figura 4A mostra as curvas geradas a partir dos dados de sinal de controle padrão normalizados, e a Figura 4B mostra as curvas geradas a partir dos dados de sinal experimentais normalizados.

Figura 5A mostra curvas geradas a partir de dados de sinal de controle padrão normalizados, com uma linha de sinal do limiar adicionada (desenhada como uma linha horizontal), e Figura 5B mostra curvas geradas a partir dos dados de sinal experimentais com uma linha de sinal do limiar adicionada (desenhada como uma linha horizontal).

A Figura 6 mostra os valores de tempo de interseção de controle padrão em uma plotagem log/log dos valores de tempo versus os números de cópia do alvo e uma inclinação (e equação de inclinação) ajustada para os valores na plotagem log/log.

A Figura 7 mostra uma captura de tela do Exemplo 2, exibindo os resultados de saída de um aplicativo de software de quantificação de alvo, incluindo: i) um primeiro sinal de plotagem de gráfico ao longo do tempo com uma linha de sinal do limiar que intercepta a maioria das curvas, ii) um segundo sinal de plotagem de gráfico ao longo do tempo (em uma base de log-log), onde o segundo gráfico inclui uma inclinação resultante ajustada aos pontos de dados, determinados por onde a linha de sinal do limiar no primeiro gráfico intercepta as curvas, e iii) um mostrador de placa mostrando a tintura e índice (por exemplo, índice do número de amostra dos poços de controle) de cada poço da amostra.

As Figuras 8 mostram a mesma captura de tela da Figura 7, exceto pelo fato de ne-

nhum mostrador de placa é mostrado e a linha de sinal do limiar é mostrada em um nível mais elevado. Ajustando a linha de sinal do limiar a um nível superior leva à geração de um R^2 diferente para a inclinação resultante.

5 A Figura 9 mostra a mesma captura de tela da Figuras 8, exceto pelo fato de que duas linhas de sinal do limiar são mostradas, o que gera duas inclinações resultantes mostradas lado a lado. Como pode ser visto no painel, no canto superior direito, as duas inclinações resultantes têm valores R^2 diferentes. Em certas modalidades, o usuário opta por utilizar a inclinação resultante com o maior valor de R^2 .

10 A Figura 10 mostra a mesma captura de tela da Figura 8, exceto pelo fato de que a linha de-sinal do limiar tem uma inclinação negativa (para baixo). Como pode ser visto, essa inclinação negativa intercepta todas as curvas mostradas. Usando uma inclinação negativa, ao invés de uma inclinação zero (horizontal) da linha de sinal do limiar, gera um valor R^2 diferente, que podem ser comparado a outros valores R^2 obtidos para selecionar, por exemplo, o valor mais elevado.

15 A Figura 11 mostra a mesma captura de tela da Figura 8, exceto pelo fato de que a inclinação do valor do sinal do limiar foi alterada, e a inclinação resultante ajustada é plotada em uma base de log-linear em vez uma base de log-log.

A Figura 12 mostra a mesma captura de tela da Figura 8, exceto pelo fato de que sete valores de sinal do limiar de inclinação diferentes são mostrados, juntamente com sete inclinações resultantes, cada qual tem um valor R^2 diferente que podem ser comparados. Esta captura de tela ilustra, por exemplo, que o software de computador de busca pode executar pelo treino de muitos (por exemplo, milhares ou milhões) de dos limiares diferentes para encontrar o que gera a inclinação resultante com o maior valor R^2 entre dois ou mais (por exemplo, todos) os pontos de dados.

25 DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos e aplicativos de software para quantificar um alvo em uma amostra experimental, pela coleta e processamento de dados de sinal iniciais da amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo os números de cópia do alvo conhecidos. Em modalidades particulares, os dados de sinal iniciais são capazes de ser plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão. Em certas modalidades, os dados de sinal iniciais são processados com uma linha de sinal do limiar para gerar valores de tempo de intersecção experimentais e de controle que podem ainda ser processados para gerar dados plotados em log compreendendo as coordenadas para uma plotagem log/log ou plotagem linear/log (ou plotagem semelhante). Em algumas modalidades, os dados plotados em log podem ser processados para gerar uma equação de inclinação que pode ser usada com o valor de tempo experimental para quantificar o número de cópia do alvo na amostra experimental.

I. Métodos e Aplicativos para Quantificação da Sequência Alvo Exemplar

A Figura 1 mostra uma modalidade exemplar de como as seqüências alvo podem ser quantificadas em amostras experimentais, utilizando os ensaios de detecção de ácido nucléico e métodos que empregam uma linha de sinal do limiar e uma plotagem log/log gerada a partir das curvas de controle padrão. Nesta modalidade exemplar, o teste de detecção do ácido nucléico é um que pode gerar dados de curso de tempo que pode ser ajustados, usando um modelo linear localizado ou outro modelo, para se ajustar a uma curva (por exemplo, ensaio de detecção INVADER ou outro ensaio baseado em clivagem) Os dez passos exemplar na Figura 1 são descritos abaixo.

Figura 1: Etapa 1

Na Etapa 1 da Figura 1, um ensaio de detecção de ácido nucléico é empregado para detectar uma seqüência alvo em ambas as amostras experimentais e de controle. O ensaio de detecção do ácido nucléico gera um sinal quando o alvo é detectado que pode ser medido ao longo do tempo. O ensaio de detecção do ácido nucléico (por exemplo, ensaio de detecção INVADER) utilizado é também aquele que pode gerar os dados ao longo do tempo, que podem ajustados a uma curva (por exemplo, curva sigmoideal e semelhante a sigmoideal). Em certas modalidades, o ensaio de detecção do ácido nucléico é executado sob condições isotérmicas. As amostras experimentais e de controle padrão podem ser amplificadas em PCR antes ou durante a detecção. Um dispositivo é utilizado para detectar o sinal que é gerado (por exemplo, um dispositivo configurado para ler e registrar um sinal fluorescente em várias amostras). O dispositivo é definido para detectar e registrar o sinal em vários pontos de tempo em cada amostra (por exemplo, a cada 5 segundos, a cada 10 segundos, a cada 30 segundos, ou a cada minuto).

Pelo menos duas amostras de controle padrão são empregadas, cada um contendo diferentes quantidades conhecidas da seqüência alvo. Em certas modalidades, entre duas e dez amostras de controle são empregadas. Preferivelmente, uma amostra de controle padrão com nenhum alvo também é incluída. Em algumas modalidades, o número de cópia do alvo nas amostras de controle padrão varia de centenas a milhões, e valores entre eles. Preferencialmente, as amostras de controle diferem entre si por cerca de um fator de dez.

Em algumas modalidades, cada uma das amostras de controle padrão tem uma amostra de controle de tintura interna correspondente que contém o mesmo (ou cerca do mesmo) número de cópia de alvo como a amostra de controle, mas está faltando um componente necessário para o funcionamento do ensaio de detecção do ácido nucléico. Em certas modalidades em que uma amostra de controle padrão com nenhum alvo é empregada, uma amostra de controle de tintura interna correspondente também é empregada com nenhum alvo. Preferencialmente, as amostras de controle de tintura interna empregam uma tintura diferente do que a utilizada nas amostras de controle padrão. Geralmente, as amos-

tras de controle de tintura internas servem para medir o sinal de base gerado pelo ensaio de detecção do ácido nucléico. Se o ensaio INVADER é utilizado, por exemplo, as amostras de controle de tintura internas podem faltar o oligonucleotídeo INVADER, mas ainda contém o oligonucleotídeo de prova, uma enzima Cleavase, e um cassete FRET ligado a uma tintura diferente da tintura nas amostras de controle padrão. Em certas modalidades, as duplicatas de cada uma das amostras de controle padrão e cada uma das amostras de controle de tintura internas são empregadas. Em certas modalidades, uma segunda sequência do tipo de metabolismo em geral (housekeeping) interno é detectada para permitir, por exemplo, a quantificação relativa.

A sequência alvo que é detectada pode ser qualquer sequência alvo desejada, incluindo, por exemplo, micro RNAs, sequências de siRNA, sequências de DNA, sequências virais ou outras sequências relacionadas a patógenos. Em certas modalidades, a sequência alvo é um gene relacionado ao câncer, ou uma sequência viral, como HCV, HPV, ou HIV. As tinturas ou outros rótulos utilizados podem ser quaisquer tinturas ou rótulos apropriados incluindo, por exemplo, FAM, tintura de normalização interna amarela Yakima, Cy3, Cy5, e outras tinturas conhecidas na técnica.

Figura 1: Etapa 2

Em geral, se os resultados são obtidos em um dispositivo que não é capaz de normalizar o sinal, então, como mostrado na Etapa 2A da Figura 1, os sinais normalizados podem ser obtidos dividindo o sinal das amostras de controle padrão e as amostras experimentais com o sinal correspondente das amostras de controle de tintura internas. Se os resultados são obtidos em um dispositivo capaz de normalizar o sinal automaticamente, como mostrado na Etapa 2B, então nenhum processamento adicional é necessário para obter resultados normalizados. Um exemplo de resultados normalizados para amostras de controle padrão é mostrado na Figura 2, e um exemplo de resultados normalizados para amostras experimentais é mostrado na Figura 3.

Figura 1: Etapa 3

Em determinadas modalidades, as amostras de controle padrão e experimentais normalizados são plotados em um gráfico X-Y em uma maneira sinal versus tempo.

Figura 1: Etapa 4

Os sinais de amostra de controle padrão normalizada e experimentais podem então se ajustar a uma curva usando qualquer número de equações matemáticas conhecidas (há, por exemplo, aproximadamente 50 equações matemáticas conhecidas que podem ser usadas para tal finalidade). Preferivelmente, esta função é executada por um programa de computador configurado para gerar tais curvas. Em determinadas modalidades, as equações são empregadas que ajustam cada dois pontos de dados de sinal para uma linha para gerar a curva, enquanto em outras modalidades a interpolação da régua flexível é empregada. Um

exemplo de ajuste de dados de sinal a uma curva é mostrado na Figura 4, com as curvas de controle padrão mostradas na Figura 4A e as curvas experimentais mostradas na Figura 4B.

Figura 1: Etapa 5

Então, em determinada modalidade (enquanto não necessário em outras modalidades) um método é empregado para distinguir as curvas de controle padrão das curvas experimentais, tais como a utilização da ID de posição da amostra ou outros dados associados.

Figura 1: Etapa 6

Depois, uma linha de sinal do limiar é determinada (por exemplo, ou automaticamente por um aplicativo de software ou por um usuário). Para conveniência, como mostrado na Figura 5, esta linha de sinal do limiar pode ser desenhada como uma linha horizontal nos gráficos da curva de controle padrão e experimental. Nota-se que outras, linhas não-horizontais (por exemplo, dos limiares de inclinação e/ou linhas curvadas) podem ser empregadas. Deve-se compreender que a linha de sinal do limiar não pode realmente ser mostrada (por exemplo, em uma tela de computador) como uma linha, mas preferivelmente pode ser representada na memória de computador como uma equação descrevendo uma linha se tivesse sido desenhada e apresentada a um usuário (por exemplo, em uma tela de computador). Em determinadas modalidades, a linha de sinal do limiar é uma curva (isto é, não uma linha reta).

Uma linha de sinal do limiar terá um valor de sinal inicial no tempo zero. Mesmo se a linha for desenhada agora de volta a zero (por exemplo, a primeira leitura não se realiza até 15 segundos mais ou menos), a linha de sinal do limiar poderia ser estendida de volta até atingir o eixo de Y para determinar que valor de sinal estaria presente para a linha no tempo zero. Uma linha de sinal do limiar também terá uma inclinação, que pode ser zero (linha horizontal), negativa (linha de inclinação descendente) ou positiva (linha de inclinação ascendente). A linha de sinal pode ser linear ou pode ser uma curva. Uma linha do limiar mostrada pode ser movida pelo uso para qualquer posição ou inclinação desejada.

A linha de sinal do limiar pode, por exemplo, ser definida em qualquer nível que: 1) esteja acima dos níveis base (por exemplo, acima do valor de controle da tintura interna normalizado); 2) cruze a curva experimental; e 3) cruze pelo menos duas das curvas de controle padrão. Em determinadas modalidades, critérios adicionais podem ser empregados. Por exemplo, a linha de sinal do limiar pode ser escolhida tal que cruze mais de duas curvas de controle padrão se há mais de duas presentes. Em determinadas modalidades, a linha de sinal do limiar é escolhida tais que cruze todas ou a maioria das curvas de controle padrão. Em outras modalidades, se as curvas experimentais múltiplas estão presentes, a linha de sinal do limiar é escolhida tal que cruze pelo menos duas destas curvas, e preferivelmente todas estas curvas.

Em modalidades particulares, a linha de sinal do limiar é escolhida tal que qualquer

variabilidade entre curvas de controle padrão duplicadas (se as amostras duplicadas são analisadas) seja minimizada. Em outras modalidades, a linha de sinal do limiar é escolhida tal que a porção linear da maioria ou de todas as curvas (por exemplo, as curvas de interesse) seja cruzada. Em determinadas modalidades, as linhas de sinal do limiar múltiplas são

5 escolhidas e empregadas no restante das etapas. Em algumas modalidades, as linhas de sinal do limiar múltiplas são escolhidas (por exemplo, pelo uso ou pelo software de computador) tal que os valores R^2 que resultam possam ser comparados. Em modalidades particulares, a linha de sinal do limiar que dá o valor R^2 mais elevado (por exemplo, mais próximo a 1.0) é escolhida como o valor usado para calcular os números de cópia nas amostras desconhecidas. O R^2 pode ser medido usando todos os pontos na curva ou um subconjunto dos

10 mesmos. Por exemplo, pontos de dados em cada extremo podem ser deselecionados para não serem incluídos no melhor cálculo de ajuste. Isto encontra uso, por exemplo, onde a previsão mais exata é desejada para um subconjunto das amostras dentro de uma faixa de concentração particular.

15 Em determinadas modalidades, uma linha de sinal do limiar em inclinação é empregada. Em modalidades particulares, uma linha de sinal do limiar em inclinação é empregada tal que muitas ou todas as curvas (por exemplo, ambas as curvas de controle e experimentais) sejam cruzadas. Em algumas modalidades, como explicado abaixo, os pontos de interseção resultantes são plotados em um diagrama log/linear (número de cópia vs. tempo) ao

20 invés de diagrama log/log.

Figura 1: Etapa 7

A linha de sinal do limiar (ou valores) é usada então para determinar o valor de tempo onde cada uma das curvas de controle padrão e experimentais relevantes cruza o limiar. Isto pode ser feito, por exemplo, usando um gráfico das curvas de controle padrão

25 (por exemplo, Figura 5A) e curvas experimentais (por exemplo, Figura 5B) e olhando para ver em que ponto no tempo onde o limiar cruza cada curva. Isto pode também ser feito usando um aplicativo de software que calcula automaticamente os pontos de interseção. Os resultados desta determinação podem, por exemplo, ser diagramados em uma tabela listando o número de cópia do alvo para cada uma das curvas de controle padrão e valor de tempo onde as curvas de controle padrão e experimentais hibridizam o limiar.

30

Figura 1: Etapa 8

Os valores de tempo de interseção para cada curva de controle padrão podem então ser plotados contra o número de cópia do alvo de cada controle padrão em uma plotagem log/log, ou uma plotagem log/linear (número de cópia vs. tempo), para gerar os dados

35 plotados em log que podem ser alinhados em uma inclinação geralmente linear. Preferivelmente, a plotagem é gerada com número de cópia ao longo do eixo X e o tempo ao longo do eixo Y. Um exemplo de seis controles padrão plotados em um gráfico é mostrado na Figura

6.

Figura 1: Etapa 9

Depois, os métodos de regressão linear padrão são empregados para determinar o melhor ajuste para uma inclinação entre os pontos de dados plotados da Etapa 8. A determinação desta inclinação gera uma equação de inclinação descrevendo a inclinação, assim como um valor R^2 para a inclinação resultante. Em determinadas modalidades, a linha de sinal do limiar (que pode ser descrita por uma equação de inclinação) é testada em muitas posições diferentes (por exemplo, automaticamente por um computador) tal que os valores R^2 múltiplos sejam determinados. Em determinadas modalidades, a linha de sinal do limiar que tem um valor R^2 que seja o mais elevado (por exemplo, o mais perto ou igual a 1.0) é escolhida para o uso na determinação dos números de cópia nas amostras experimentais (por exemplo, usado na Etapa 10 abaixo).

Figura 1: Etapa 10

Inserindo os valores de tempo de interseção determinados para as amostras experimentais (da Etapa 7) na equação de inclinação determinada na Etapa 9 permite um cálculo de volta traseiro do número de cópia do alvo nas amostras experimentais. Em determinadas modalidades (por exemplo, modalidades ajudadas por software de computador) onde as amostras estão sendo lidas em tempo real, uma vez que um número de cópia do alvo é determinado para a amostra experimental dada (ou todas as amostras experimentais) a coleta de dados pode ser parada (por exemplo, nenhuma necessidade de continuar a leitura da amostra do sinal uma vez que a resposta é conseguida). Isto é útil pois tempo e recursos extras podem ser economizados parando uma leitura em tempo (por exemplo, outro conjunto de amostras poderia ser carregado no dispositivo de leitura). Isto é particularmente útil onde o software é configurado para usar linhas de sinal dos limiares múltiplas, incluindo dos limiares angulares, onde uma resposta é atingida rapidamente (por exemplo, 10-20 minutos), como quando certo valor R^2 é conseguido para um limiar dado.

Em determinadas modalidades onde as linhas de sinal do limiar múltiplas são empregadas, o software pode ser configurado para relatar que um resultado do número de cópia experimental uma vez que um valor R^2 particular é conseguido baseado em qualquer um dos dos limiares. Em outras modalidades, o uso de valores de sinal do limiar múltiplos (por exemplo, todos empregados ou todos que obedecem um valor R^2 mínimo para a inclinação resultante) permite que uma faixa de resultados seja relatada para as amostras experimentais (desconhecidas). Por exemplo, quando os valores do sinal do limiar múltiplos são empregados, pode ser que cinco gerem as inclinações resultantes que têm valores R^2 acima de .98. Estes cinco resultados podem conduzir a um número de cópia experimental em uma amostra de 29, 36, 38, 42, e 45. Por sua vez, isto permite que o software relate uma faixa para a amostra experimental (por exemplo, 29-45 cópias na amostra desconhecida). Do

mesmo modo, a geração de uma faixa pode ser usada conjuntamente com os dos limiares que são definidos (por exemplo, dos limiares comandados por FDA), como, por exemplo, na triagem do sangue. Qualquer amostra de sangue particular que tiver muitos números de cópias do alvo de um alvo particular pode ser julgada como "fracassada" (por exemplo, se a faixa eliminada é 30, e uma faixa de 29-45 é relatada, esta amostra é julgada por ter falhado mesmo que a definição do do limiar em outros níveis mais elevados do valor R^2 fizessem com que a amostra ao "passasse"). Assim, em algumas modalidades, o resultado previsto do número de cópia mais baixo é usado para selecionar um curso de ação. Em outras modalidades, onde uma quantidade mínima de um alvo for exigida, o sistema exige que cada uma das curvas relate um resultado acima de um número de cópia predeterminado na seleção de um curso de ação.

II. Resultados Quantitativos Rápidos

Os métodos e as aplicações da presente invenção permitem a quantificação surpreendentemente rápida do número de cópia em uma amostra experimental. Os métodos conhecidos na técnica exigem frequentemente uma hora ou horas para fornecer resultados quantitativos confiável. Entretanto, a presente invenção permite que os resultados quantitativos confiável sejam atingidos em valores de tempo medidos em segundos ou minutos. Por exemplo, em modalidades particulares, o número de cópia do alvo determinado na amostra experimental é gerado dentro de aproximadamente 150 segundos ou menos do tempo em que um nível de sinal do ensaio é detectado primeiro a partir da amostra experimental (por exemplo, dentro de aproximadamente 75 segundos... aproximadamente 100 segundos... aproximadamente 125 segundos... ou aproximadamente 150 segundos). Em algumas modalidades, o número de cópia do alvo determinado na amostra experimental é gerado dentro de aproximadamente 45 minutos ou menos a partir do tempo em que um nível de sinal do ensaio é detectado primeiro na amostra experimental (por exemplo, dentro de aproximadamente 5 minutos... aproximadamente 15 minutos... aproximadamente 30 minutos... ou aproximadamente 45 minutos). Em determinadas modalidades, o número de cópia do alvo determinado na amostra experimental é gerado entre aproximadamente 2 minutos e aproximadamente 35 minutos do tempo em que um sinal de ensaio é detectado primeiro na amostra experimental.

A quantificação rápida pode ser conseguida com os métodos da presente invenção enquanto a informação quantitativa confiável pode ser produzida uma vez pelo menos duas curvas sigmoidais de controle padrão passam a linha de sinal do limiar, que acontece frequentemente muito cedo para muitas amostras experimentais. Por exemplo, a Figura 5 mostra que as curvas de controle padrão e experimentais do Exemplo 1. A amostra experimental B4 (mostrada na Figura 5B) é considerada por passar o limiar em aproximadamente 110 segundos. Três das curvas de controle padrão, como mostrado na Figura 5A, todas passam

o limiar em aproximadamente 120-130 segundos. Conseqüentemente, o número de cópia do alvo na amostra experimental B4 poderia ser calculado após aproximadamente 130 segundos a partir da detecção de sinal inicial na amostra experimental. Esta quantificação rápida poderia ser ainda mais reduzida para a amostra B4 se a linha de sinal do limiar fosse definida mais baixa do que os 1.6 mostrados na Figura 5. Por exemplo, o limiar poderia ser definido em qualquer lugar acima de 1.0 (que representa o sinal base) e ainda cruzar cada uma das três curvas de controle padrão e da curva experimental B4. Por exemplo, a linha de sinal do limiar poderia ser definida em aproximadamente 1.1, que permitiriam que os resultados quantitativos fossem conseguidos em aproximadamente 105-110 segundos.

Em determinadas modalidades, a linha de sinal do limiar é definida como uma inclinação não-horizontal (por exemplo, inclinação descendente) que pode permitir que mais curvas sejam cruzadas em breve. Em tais modalidades, os resultados quantitativos rápidos podem ser obtidos, porque um não tem que esperar as curvas de interesse para alcançar uma linha de sinal do limiar horizontal. Em tais modalidades, os resultados podem ser conseguidos em 20 minutos ou menos ou em 15 minutos ou menos (por exemplo, entre 12 e 15 minutos; ou entre 5-10 minutos; ou entre 1-5 minutos).

Preferivelmente, os métodos da presente invenção são incorporados em um aplicativo de software em um computador que é ligado operavelmente ao dispositivo de detecção de sinal. Em consideração a isso, as curvas poderiam ser geradas automaticamente (e rapidamente), e uma vez que as curvas necessárias tivessem passado a linha de sinal do limiar, o número de cópia quantitativo final na amostra experimental pode ser calculado rapidamente (por exemplo, em um segundo ou menos), desse modo permitindo que um usuário tenha um número de cópia quantitativo o mais rapidamente possível.

III. Ensaios de Detecção de Ácidos Nucléicos Exemplares

Os métodos e os sistemas da presente invenção podem ser empregados com qualquer ensaio de detecção de ácido nucléico que possa gerar resultados ao longo do tempo que possam ser ajustados a uma curva. Por exemplo, os métodos, sistemas, e aplicativos da presente invenção podem encontrar uso nos ensaios de detecção que incluem, entre outros, métodos de clivagem de divergência de enzima (por exemplo, Variagenics, PAT. US, no. 6.110.684, 5.958.692, 5.851.770, incorporadas aqui por referência em suas totalidades); reação em cadeia da polimerase; métodos de hibridação ramificada (por exemplo, Chiron, PAT. US. no. 5.849.481, 5.710.264, 5.124.246, e 5.624.802, incorporadas aqui por referência em suas totalidades); replicação rolling circle (por exemplo, PAT. US. no. 6.210.884, 6.183.960 e 6.235.502, incorporadas aqui por referência em suas totalidades); NASBA (por exemplo, PAT. US. no. 5.409.818, incorporada aqui por referência em sua totalidade); tecnologia de feixe molecular (por exemplo, PAT. US. no. 6.150.097, incorporada aqui por referência em sua totalidade); tecnologia de E-sensor (Motorola, PAT. US. no. 6.248.229,

6.221.583, 6.013.170, e 6.063.573, incorporadas aqui por referência em suas totalidades); tecnologia de sonda cíclica (por exemplo, PAT. US. no. 5.403.711, 5.011.769, e 5.660.988, incorporadas aqui por referência em suas totalidades); métodos de amplificação de sinal Dade Behring (por exemplo, PAT. US. no. 6.121.001, 6.110.677, 5.914.230, 5.882.867, e 5.792.614, incorporadas aqui por referência em suas totalidades); reação em cadeia da ligase (Barnay Proc. Nacional. Acad. Sci EUA 88, 189-93 (1991)); ensaios FULL-VELOCITY; e métodos de hibridação sanduíche (por exemplo, PAT. US. no. 5.288.609, incorporada aqui por referência em sua totalidade).

Preferivelmente, o ensaio de detecção de ácido nucléico é configurado para funcionar sob condições isotérmicas. Um exemplo de tal ensaio de detecção de ácido nucléico é um ensaio de clivagem invasivo, tal como o ensaio INVADER. No ensaio INVADER, quando dois filamentos do ácido nucléico, ou dos oligonucleotídeos (os oligonucleotídeo da sonda e o oligonucleotídeo INVADER), ambos hibridizam para um filamento de ácido nucléico alvo tais que formam uma estrutura de clivagem invasiva sobreposta, como descrita abaixo, a clivagem invasiva pode ocorrer. Com a interação de um agente de clivagem (por exemplo, uma 5' nuclease) e o oligonucleotídeo a montante (oligonucleotídeo INVADER), o agente de clivagem pode ser feito para clivar o oligonucleotídeo a jusante (sonda) em um local interno de tal maneira que um fragmento distintivo seja produzido. Tais modalidades foram denominadas o ensaio INVADER (Third Wave Technologies) e são descritas nas Patentes US. no. 5.846.717, 5.985.557, 5.994.069, 6.001.567, e 6.090.543, WO 97/27214, WO 98/42873, Lyamichev et al, Nat. Biotech., 17:292 (1999), Hall et al., PNAS, USA, 97:8272 (2000), cada qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade para todas as finalidades). O ensaio INVADER detecta a hibridação das sondas para um alvo pela clivagem enzimática de estruturas específicas por enzimas de estrutura específica.

O ensaio INVADER detecta as sequências de DNA e RNA específicas usando enzimas de estrutura específicas (por exemplo, endonucleases FEN) para clivar um complexo formado pela hibridação das sondas de oligonucleotídeo sobrepostas. A temperatura elevada e um excesso de uma das sondas permitem que múltiplas sondas sejam clivadas para cada sequência alvo presente sem ciclagem de temperatura. Em algumas modalidades, estas sondas clivadas direcionam então a clivagem de uma segunda sonda rotulada (por exemplo, cassete FRET). O oligonucleotídeo de sonda secundário pode ser rotulado na extremidade 5' com fluoresceína que é resfriada rapidamente por uma tintura interna. Mediante a clivagem, o produto rotulado de fluoresceína não resfriada rapidamente pode ser detectado usando um leitor de placa de fluorescência padrão.

O ensaio INVADER pode detectar mutações específicas e SNPs em RNA e DNA não amplificado, assim como amplificado, incluindo o DNA genômico. Em determinadas modalidades, o ensaio INVADER usa duas etapas em cascata (uma reação primária e secundária).

dária) tanto para gerar e para amplificar então o sinal de alvo-específico. Para a conveniência, os alelos na seguinte discussão são descritos como tipo selvagem (WT) e mutante (MT), mesmo que esta terminologia não se aplique a todas as variações genéticas. Na reação primária, a sonda primária de WT e o oligonucleotídeo INVADER hibridizam em conjunto ao ácido nucléico alvo para formar uma estrutura sobreposta. Uma "aba" não pareada é incluída na extremidade 5' da sonda primária WT. Uma enzima de estrutura específica (por exemplo, enzima CLEAVASE, Third Wave Technologies) reconhece a sobreposição e cliva a aba não pareada, liberando-a como um produto de alvo específico. Na reação secundária, este produto clivado serve como um oligonucleotídeo INVADER na sonda de transferência de energia de ressonância por fluorescência do WT (WT-FRET) para criar outra vez a estrutura reconhecida pela enzima de estrutura específica. Quando as duas estruturas em uma única sonda FRET são separadas pela clivagem, um sinal fluorescente detectável acima da fluorescência base é produzida. Conseqüentemente, a clivagem desta segunda estrutura resulta em um aumento na fluorescência, indicando a presença do alelo do WT (ou do alelo mutante se o ensaio for configurado para que o alelo mutante gere o sinal detectável). Em modalidades preferidas, as sondas FRET tendo rótulos diferentes (por exemplo, re-solúvel pela diferença em comprimentos de onda de emissão ou de excitação, ou re-solúvel por detecção de fluorescência resolvida em tempo) são fornecidas para que cada alelo ou locus a serem detectados, tal que os alelos ou locus diferentes podem ser detectados em uma única reação. Em tais modalidades, a sonda primária define e as sondas FRET diferentes podem ser combinadas em um único ensaio, permitindo a comparação de sinais de cada alelo ou locus na mesma amostra.

Se o oligonucleotídeo de sonda primário e a sequência de nucleotídeo do alvo não coincidem perfeitamente no local da clivagem, a estrutura sobreposta não forma e a clivagem é suprimida. A enzima específica da estrutura (por exemplo, enzima CLEAVASE VIII, Third Wave Technologies) usada fende a estrutura sobreposta mais eficientemente (por exemplo, pelo menos 340 vezes) do que a estrutura não sobreposta, permitindo a discriminação excelente dos alelos.

Nos ensaios INVADER, as sondas podem virar sem ciclagem de temperatura para produzir muitos sinais por o alvo (isto é, amplificação linear do sinal). Similarmente, cada produto de alvo específico pode permitir a clivagem de muitas sondas FRET. A reação do ensaio INVADER primário é direcionada contra o DNA do alvo (ou RNA) sendo detectados. O DNA ou RNA do alvo são o componente limitante na primeira clivagem invasiva, desde que o INVASOR e a sonda primária são fornecidos em excesso molar. Na segunda clivagem invasiva, é a aba liberada que está limitando. Quando estas duas reações de clivagem são executadas sequencialmente, o sinal de fluorescência da reação do composto acumula linearmente com relação à quantidade de DNA do alvo.

IV. Aplicações de Genotipagem

Além do uso dos métodos, sistemas, e aplicativos de software da presente invenção para determinar o número de cópia na amostra, a presente invenção também é útil para a genotipagem. Uma modalidade exemplar de tal uso é com o ensaio de detecção INVADER. Uma reação INVADER de genotipagem, eram duas sondas que diferem na base de clivagem e correspondem à mudança de base ou ao genótipo do alvo pode ser usada tendo duas abas 5' diferentes unidas às sondas. Mediante a clivagem da aba 5', uma clivagem secundária de um cassete FRET pode ser obtida usando a aba clivada como um oligo invasivo no cassete FRET. Os cassetes FRET são rotuladas com tinturas diferentes (por exemplo, FAM e RED) correspondendo à sonda primária clivada de genótipo específico.

Um ensaio INVADER em tempo real de genotipagem típico pode ser executado pelo monitoramento do sinal de fluorescência FAM e RED em função do tempo. Um limiar para cada tintura que está acima do nível base é atribuído e os pontos de tempo nos quais cada amostra cruza o limiar para cada tintura são determinados. A plotagem de um diagrama de dispersão de tempos dos limiares de FAM versus RED resultará em um diagrama de dispersão que pode ser usado para determinar genótipos de amostras desconhecidas. As amostras com tempos de FAM baixos e tempos de RED altos correspondem à sonda de FAM ou alelo e aqueles com tempos de FAM altos e de RED baixos correspondem à sonda RED ou ao alelo. Similarmente, as amostras com tempo de FAM e RED moderados (isto é, caem no meio do diagrama de dispersão) são amostras heterozigóticas. Esta mesma abordagem também pode ser empregada com outros ensaios de detecção de ácido nucléico.

EXPERIMENTAL

Os seguintes exemplos são fornecidos a fim de demonstrar e ilustrar mais determinadas modalidades e aspectos preferidos da presente invenção e não devem ser interpretados como limitantes do escopo da mesma.

Na divulgação experimental que segue, as seguintes abreviaturas aplicam-se: N (normal); M (molar); milímetro (milimolar); μ M (micromolar); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); pmol (picomoles); g (gramas); mg (miligramas); μ g (microgramas); ng (nanogramas); l ou L (litros); ml (mililitros); μ l (microlitros); C (graus centígrados); e R^2 (R^2).

EXEMPLO 1

Quantificação da Sequência do Alvo usando um Limiar e Plotagem log/log

Este exemplo descreve a quantificação do número de cópia de uma sequência de alvo em três amostras experimentais desconhecidas usando um ensaio de detecção de ácido nucléico que possa gerar uma curva da detecção e usando métodos que empregam um limiar e uma plotagem log/log gerada das curvas de controle padrão. A sequência do alvo neste exemplo foi micro RNA miR-21, e o ensaio de detecção de ácido nucléico foi o ensaio

de detecção de ácido nucléico INVADER empregando um cassete FRET com um rótulo de FAM.

Os sete padrões conhecidos empregados tiveram os seguintes números de cópia do alvo: 1) 6×10^6 ; 2) 857.143; 3) 122.449; 4) 17.493; 5) 2.499; 6) 357; e 7) 51.

Um oligonucleotídeo rotulado por tintura de normalização foi adicionado à reação para esclarecer as flutuações de sinal devido ao ruído da máquina de erros de pipetagem. Este oligonucleotídeo rotulado por tintura não interfere ou funciona na reação INVADER e é espectralmente distinto e diferenciado da tintura usada no cassete FRET da reação INVADER. O oligonucleotídeo rotulado de amarelo Yakima (T_{10}) foi usado como tintura de normalização interna (25 nM) e foi incluído nos poços de todas as reações. Três amostras experimentais testadas foram rotuladas B4, E4, e F4. Estas amostras foram executadas com o FRET rotulado de FAM assim como com a tintura Amarela interna.

A PCR foi executada inicialmente nos padrões e nos experimentais usando os parâmetros mostrados na Tabela 1.

Tabela 1

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos	Coleta de Dados
1	42 oC	45 min	1	Desligada
	95 oC	2 min		
2	95 oC	30 sec	22	Desligada
	60 oC	1 min		
3	99 oC	10 min	1	Desligada
4	50 oC	11 sec	255	Ligada

Reagentes do ensaio INVADER (por exemplo, oligos de sonda, oligos INVADER, cassetes FRET, e uma enzima Cleavase) foram adicionados então às amostras experimentais, de controle padrão, e às amostras de controle interno. As reações foram executadas em 50 graus Celsius e as leituras de sinal fluorescentes foram tomadas a cada 11 segundos para 249 ciclos.

Os resultados dos controles padrão e controles internos (normalizados com base no controle da tintura interno) são mostrados nas Figuras 2A-22D. Os resultados para as três amostras experimentais (normalizadas com base no controle de tintura interno) são mostradas nas Figuras 3A-3E. Os resultados normalizados das Figuras 2 e 3 foram plotados então (fluorescência versus tempo) em um gráfico X-Y. As plotagens normalizadas das Figuras 2 e 3 foram ajustadas a uma curva usando um programa que ajustasse cada dois pontos de dados a uma linha. Os resultados disso são mostrados na Figura 4. Para a conveniência, as curvas de controle padrão são mostradas na Figura 4A, e as curvas experimentais são mostradas na Figura 4B.

Em seguida, uma linha de sinal do limiar foi determinada, que pode ser desenhada

nos gráficos de curva mostrados na Figura 4. A linha de sinal do limiar é definida para um nível de sinal fluorescente com base nos seguintes critérios exemplares. Primeiro, o valor do limiar é definido em um nível de sinal que é maior do que a base representada pelos controles de tintura internos normalizados (aquelas amostras com a tintura interna Amarela). Neste exemplo, o sinal normalizado dos controles de tintura internos é 1.0 como dividindo os números brutos obtidos por eles mesmos leva a um valor de 1.0. Em seguida, a linha de sinal do limiar é definida de modo que cruze todas as curvas de controle padrão e curvas experimentais que estão acima da base (acima de 1.0 neste exemplo). Neste exemplo, a amostra experimental F4 estende somente até 1.7. Como tal, para cruzar esta curva, e todas as outras curvas, o limiar é escolhido por estar abaixo de aproximadamente 1.7. Outro parâmetro que poderia ser empregado, mas que não afeta o limiar neste exemplo, é escolher um limiar que minimize a variabilidade entre duas curvas duplicadas para cada padrão. À luz dos critérios acima, a linha de sinal do limiar para este exemplo podia ser definida em qualquer lugar entre 1.0 e aproximadamente 1.7. Entretanto, um parâmetro adicional que é empregado preferencialmente, é o ajuste do valor do limiar tal que a porção de crescimento do sinal da maioria ou de todas as curvas for cruzada. Neste exemplo, a fim de assegurar que aquela porção do crescimento do sinal de todas as curvas padrão e curvas desconhecidas foram cruzadas em um ponto de não saturação nas curvas, o valor do limiar final foi ajustado em torno de 1.6. A Figura 5 mostra a linha de sinal do limiar ilustrada como uma linha horizontal definida em aproximadamente 1.6 para ambas as curvas de controle padrão (Figura 5A) e curvas experimentais (Figura 5B).

Uma vez que a linha de sinal do limiar é ajustada, esta permite uma determinação do ponto de tempo onde cada um das curvas de controle padrão cruza a linha de sinal do limiar. Neste exemplo, determinou-se que a linha de sinal do limiar cruza as curvas de controle padrão nos pontos de tempo mostrados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2

	Tempo 1 (seg)	Tempo 2 (seg)	Tempo Médio (seg)	Stdev
cópias miR-21/rxn				
6,000,000	63.0	64.1	63.6	0.4
857,143	108.7	112.0	110.4	1.2
122,449	169.4	163.6	166.5	2.1
17,493	307.5	332.0	319.7	8.7
2,499	722.9	731.5	727.2	3.0
357	1934.8	2036.1	1985.4	35.8

Surpreendentemente, encontrou-se que os valores de tempo de interseção médios para cada um dos seis padrões podem ser plotados contra o número de cópia do alvo dos padrões em um formato log vs. log para gerar uma inclinação geralmente linear. Em particular, o número de cópia e os tempos para cada controle padrão (no formato de log) são plo-

tados primeiro em um gráfico (veja seis pontos de dados na Figura 6). Em seguida, os métodos de regressão linear padrão foram usados para determinar o melhor ajuste para uma inclinação entre estes pontos de dados (veja Figura 6). Esta inclinação é descrita por uma equação de inclinação que é determinada com base na regressão linear. Neste exemplo, a inclinação é descrita pela seguinte equação de inclinação: $y = 11647 X^{-0.3453}$

Em seguida, foi determinado onde a linha de sinal do limiar cruza as curvas experimentais. Neste exemplo, determinou-se que a linha de sinal do limiar cruza as três curvas experimentais nos pontos de tempo mostrados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3

ID da amostra	Tempo 1 (seg)	Cópias calculadas de volta de miR-21
B4	126.0	493,158
E4	795.2	2,377
F4	2367.2	101

Usando a equação de inclinação determinada acima ($y = 11647 X^{-0.3453}$) e os pontos de tempo de interseção apresentados na Tabela 3 como X na equação, permitiu um cálculo de volta das cópias de miR-21 presentes nas amostras experimentais. As quantidades calculadas para cada uma das três amostras experimentais são apresentadas na Tabela 3.

EXEMPLO 2

Quantificação da Sequência do alvo com Limiares Alternados

Este exemplo foi executado em uma maneira similar ao Exemplo 1. Neste exemplo, todos os dados correspondem aos números de cópia conhecidos para o miR-21 (FAM) ou U6 snRNA (ROX). Os dados de FAM correspondem a miR-21 em duplicatas para cada nível. Os níveis de alvo (isto é, cópia #) são mostrados no mostrador de placa na Figura 7 e como segue: 6.000.000; 1.200.000; 240.000; 48.000; 9.600; 1,920; 384; e 0. Os dados de ROX correspondem a U6 e/ou o U24 snRNA em duplicatas para cada nível e os níveis de alvo (isto é, cópia #) são como seguem: 36.000.000; 7.200.000; 1.440.000; 288.000; 57.600; 11.520; 2.304; e 0.

Este exemplo mostra como a seleção de valores de sinal do limiar diferentes pode impactar os resultados, e qualidade dos resultados, que são gerados pelas modalidades dos métodos e aplicativos da presente invenção. A Figura 7 mostra uma captura de tela mostrando as curvas de controle padrão. Também é mostrado um limiar de sinal horizontal que cruza a maioria das curvas. Os pontos de tempo de interseção são plotados (em uma base log-log) em um segundo gráfico mostrado no canto inferior direito da Figura 7. Estes pontos de interseção do tempo são ajustados a uma inclinação resultante que tem um valor R^2 particular. Também é mostrada na Figura 7 no painel esquerdo inferior um mostrador de placa

mostrando a tintura e índice (por exemplo, índice do número de amostra de poços do controle) de cada poço da amostra. Como mostrado na Figura 8, o valor do sinal do limiar pode ser ajustado mais alto que permite mudanças em tempos real em R^2 . O nível do limiar na tela na Figura 8 tem um ajuste pior (R^2 é mais baixo) do que o nível do limiar na Figura 7 da tela.

5 Em alguns casos, um único limiar (linear) não pode cruzar todas as curvas da amostra que tornando-o somente regionalmente aplicável. Em tal caso, mais de um limiar pode ser adicionado ao sistema e a cada um ajustado e aplicado separadamente como mostrado na Figura 9. Em determinadas modalidades, os aplicativos e métodos permitem que a inclinação da linha de sinal do limiar seja inteiramente ajustável. Por exemplo, uma
10 linha de sinal do limiar de inclinação descendente pode ser usada em vez de uma linha de sinal do limiar horizontal. Como mostrado na Figura 10, a linha de sinal do limiar tem agora um R^2 ainda maior (em comparação ao limiar liso do melhor ajuste na Figura 7), e cruza agora todas as curvas da amostra tornando-as úteis na previsão da quantidade de alvo em cada amostra testada. Adicionalmente, o diagrama de "melhor ajuste" log-log (em baixo à
15 direita) pode ser feito log-linear, frequentemente resultando em uma ainda melhor excelência de ajuste (por exemplo, valor R^2) ou pelo menos (como mostrado na tela da Figura 11), uma inclinação muito maior para o melhor limiar de ajuste – significando que tempos de execução exigidos totais são extremamente reduzidos.

 Finalmente, a Figura 12 mostra a mesma captura de tela da Figura 8, salvo pelo fato de que sete valores de sinal do limiar de inclinação diferentes são mostrados, junto com
20 sete inclinações resultantes, cada qual tem um valor R^2 diferente que pode ser comparado. Este captura de tela ilustra, por exemplo, o software de computador de busca que pode executar pela tentativa de muitos (por exemplo, milhares ou milhões) dos limiares diferentes encontrar o que gera a inclinação resultante com o valor R^2 mais elevado.

25 Todas as publicações e patentes mencionadas na especificação acima são incorporadas aqui por referência. As várias modificações e variações do método e do sistema descritas da invenção serão aparentes àqueles versados na técnica sem sair do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção seja descrita em relação às modalidades preferidas específicas, deve-se compreender que a invenção como reivindicada não deve impropriamente ser limitada a tais modalidades específicas. Certamente, as várias modificações das
30 modalidades descritas para realizar a invenção que são óbvias àqueles versados na técnica da biologia molecular, matemática, ou campos relacionados são destinadas a estarem dentro do escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Um método de quantificação de alvo em amostra experimental **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

a) fornecimento:

5 i) de dados de sinal iniciais compreendendo nível de sinal do ensaio detectado em uma pluralidade de intervalos de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia dos alvos conhecidos que são diferentes, onde os dados de sinal iniciais são capazes de ser plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão, e

10 ii) uma linha de sinal do limiar tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar; onde a linha de sinal do limiar está acima do nível base e intersecta a curva experimental referida e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão referidas; e

b) processamento dos dados de sinal iniciais referidos e a linha de sinal do limiar referida para gerar um valor de tempo de interseção experimental e pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão;

c) processamento de pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão referidos e números de cópia dos alvos conhecidos referidos para gerar dados plotados em log compreendendo coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção referidos versus os números de cópia dos alvos conhecidos referidos;

d) processamento dos dados plotados em log para gerar uma equação de inclinação descrevendo uma inclinação resultante ajustada aos dados plotados em log referidos; e

25 e) processamento do valor de tempo de interseção experimental referido com a equação de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental referida.

2. O método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal inclinação do limiar é zero, ou onde a inclinação do limiar referida é negativa.

30 3. O método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal nível de sinal do ensaio é gerado por um ensaio de detecção do ácido nucléico.

4. O método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal ensaio de detecção do ácido nucléico compreende um ensaio de clivagem invasivo.

5. O método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal ensaio de detecção de ácido nucléico é realizado sob condições isotérmicas.

35 6. O método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal alvo compreende uma sequência de ácidos nucléicos.

7. O método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que

tal sequência de ácido nucléico compreende uma sequência de micro-RNA ou siRNA.

8. Um método de quantificação de alvo em amostra experimental, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

a) fornecimento,

5 i) de uma interface de usuário configurada para receber dados de sinal iniciais, e

ii) um sistema de computador tendo armazenado no mesmo um aplicativo de software de quantificação alvo, e,

b) transmissão dos dados de sinal iniciais referidos da interface de usuário para o sistema de computador referido, onde o dado de sinal inicial referido compreende o nível de sinal do ensaio detectado em uma pluralidade de intervalos de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia dos alvos conhecidos que são diferentes, onde o dado do sinal referido é capaz de ser plotado como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão;

15 c) processamento do dado de sinal referido com o aplicativo de software de quantificação do alvo referido tal que o software de quantificação de alvo referido:

i) gere uma linha de sinal do limiar tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar; onde a linha de sinal do limiar referida está acima do nível base e cruza a curva experimental referida e duas ou mais de pelo menos, duas curvas de controle padrão referidas;

20 ii) processa os dados de sinal referidos e linha de sinal do limiar referida para gerar um valor de tempo de interseção experimental e pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão,

25 iii) processa pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão referidos e os números de cópia alvo conhecidos referidos para gerar dados plotados em log compreendendo coordenadas para uma plotagem log/log, plotagem log/linear, dos valores de tempo de interseção referidos versus os números de cópia dos alvos conhecidos referidos;

30 iv) processa os dados plotados em log referidos para gerar uma equação de inclinação descrevendo uma inclinação resultante para ajustar aos dados plotados em log referidos; e

v) processa os valores de tempo de interseção experimentais com a equação de inclinação referida para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental referida.

35 9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal inclinação do limiar é zero, ou onde a inclinação do limiar referida é negativa.

10. O método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de

que tal nível de sinal do ensaio é gerado por um ensaio de detecção de ácido nucléico.

11. O método, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que tal ensaio de detecção de ácido nucléico compreende um ensaio de clivagem invasivo.

12. O método, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que tal ensaio de detecção de ácido nucléico é realizado sob condições isotérmicas.

13. O método, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que tal alvo compreende uma sequência de ácidos nucléicos.

14. O método, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que tal sequência de ácido nucléico compreende uma sequência de micro-RNA ou siRNA.

15. Um sistema de quantificação de alvo em amostra experimental, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

a) um dispositivo configurado para ensaio de detecção do nível de sinal em uma pluralidade de intervalos de tempo de uma amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo números de cópia do alvo conhecidos que são diferentes, para gerar dados de sinal iniciais,

b) um aplicativo de software de quantificação de alvo configurado para:

i) processar os dados de sinal iniciais para gerar dados de sinal que são capazes de serem plotados como uma curva experimental e pelo menos duas curvas de controle padrão,

ii) gerar uma linha de sinal do limiar tendo i) um valor de sinal inicial no tempo zero, e ii) uma inclinação do limiar; onde a linha de sinal do limiar está acima da base e cruza a curva experimental e duas ou mais de pelo menos duas curvas de controle padrão;

iii) processar os dados de sinal e linha de sinal do limiar para gerar um valor de tempo de interseção experimental e pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão;

iv) processar pelo menos dois valores de tempo de interseção de controle padrão e os números de cópia do alvo conhecidos para gerar dados plotados em log compreendendo as coordenadas para uma plotagem log/log, ou plotagem linear/log, dos valores de tempo de interseção versus os números de cópia do alvo conhecidos;

v) processar os dados plotados em log para gerar uma equação de inclinação descrevendo uma inclinação resultante ajustada aos dados plotados em log; e

vi) processar os valores de tempo de interseção experimentais com a equação de inclinação para gerar um número de cópia do alvo quantificado para a amostra experimental; e

c) um sistema de computador tendo armazenado no mesmo o aplicativo de software de quantificação do alvo, onde o sistema de computador compreende a memória do computador e um processador de computador.

16. O sistema, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal nível de sinal do ensaio é gerado por um ensaio de detecção de ácido nucléico.

17. O sistema, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal ensaio de detecção de ácido nucléico compreende um ensaio de clivagem invasivo.

5 18. O sistema, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal ensaio de detecção de ácido nucléico é realizado sob condições isotérmicas.

19. O sistema, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal alvo compreende uma sequência de ácidos nucléicos.

-10 20. O sistema, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tal sequência de ácido nucléico compreende uma sequência de RNA ou DNA.

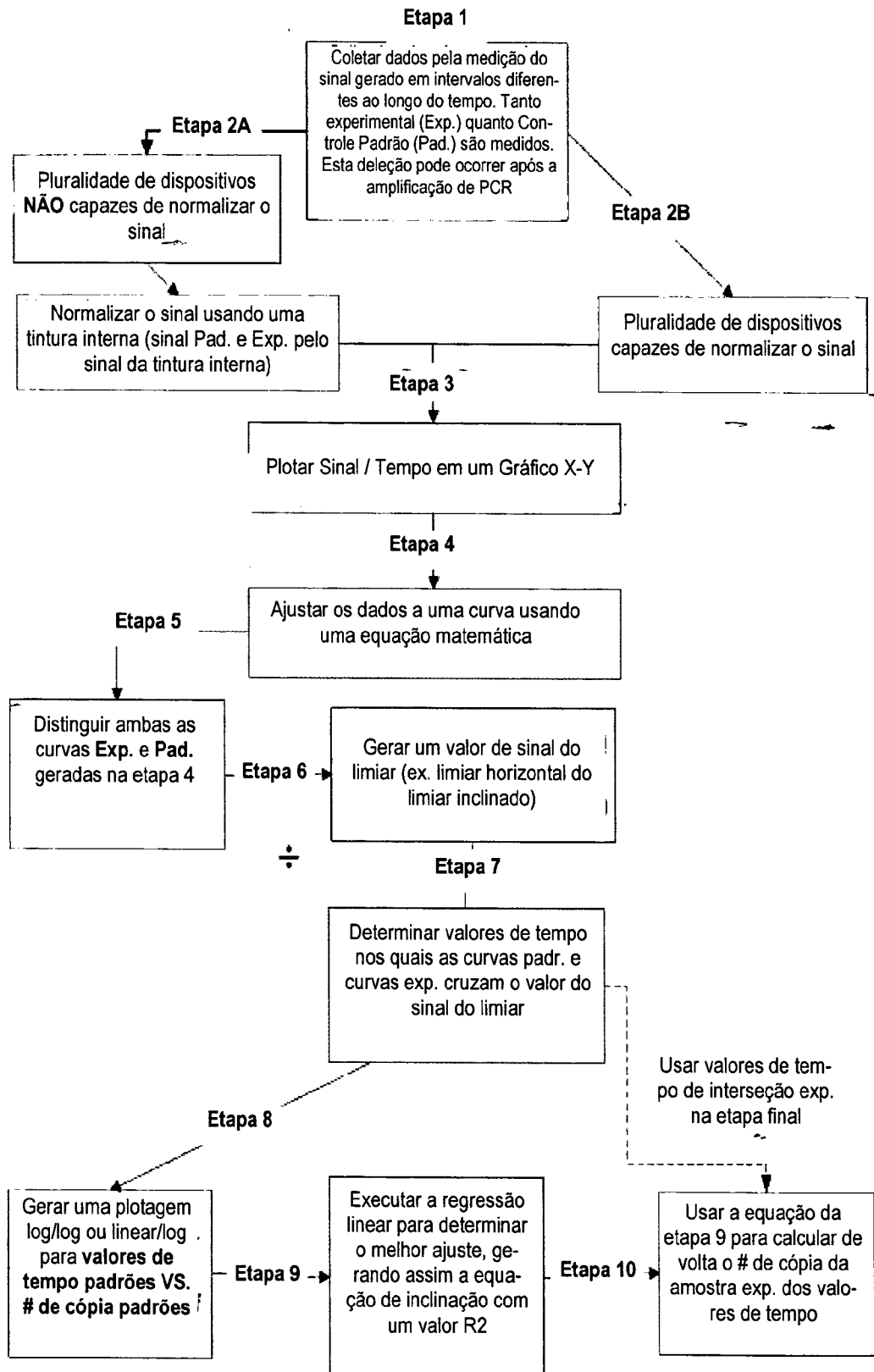


FIGURA 1

11 seg/ciclo	Tintura	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	Cópias miR-21	6,000,000	6,000,000	6,000,000	6,000,000	857,143	857,143	857,143	857,143	122,449
1	1	1	1.03857	1	1.03512	1	0.7316	1	0.71761	1
2	1	1	1.12092	1	1.11621	1	0.78134	1	0.76364	1
3	1	1	1.20943	1	1.2028	1	0.83913	1	0.8157	1
4	1	1	1.30833	1	1.30031	1	0.90628	1	0.87828	1
5	1	1	1.41567	1	1.40687	1	0.98419	1	0.95458	1
6	1	1	1.53004	1	1.5189	1	1.07138	1	1.04145	1
7	1	1	1.65261	1	1.63987	1	1.1691	1	1.13665	1
8	1	1	1.77922	1	1.76736	1	1.27879	1	1.23803	1
9	1	1	1.91322	1	1.90529	1	1.39543	1	1.34961	1
10	1	1	2.05625	1	2.04152	1	1.51291	1	1.4747	1
11	1	1	2.19941	1	2.16779	1	1.63689	1	1.60491	1
12	1	1	2.33862	1	2.309	1	1.77193	1	1.73628	1
13	1	1	2.48064	1	2.45706	1	1.8144	1	1.87436	1
14	1	1	2.62911	1	2.59749	1	2.06277	1	2.02144	1
15	1	1	2.76886	1	2.73568	1	2.21189	1	2.16985	1
16	1	1	2.90057	1	2.86805	1	2.35057	1	2.32043	1
17	1	1	3.02627	1	2.99483	1	2.48858	1	2.47042	1
18	1	1	3.13894	1	3.12227	1	2.63813	1	2.61888	1
19	1	1	3.25302	1	3.2398	1	2.78321	1	2.77182	1
20	1	1	3.35925	1	3.34819	1	2.91734	1	2.91911	1
21	1	1	3.45347	1	3.44792	1	3.04607	1	3.05435	1
22	1	1	3.52962	1	3.5211	1	3.16718	1	3.18198	1
23	1	1	3.58984	1	3.58789	1	3.28257	1	3.31287	1
24	1	1	3.64762	1	3.66001	1	3.39749	1	3.43922	1
25	1	1	3.70169	1	3.7211	1	3.49553	1	3.54784	1
26	1	1	3.74765	1	3.76015	1	3.57108	1	3.64265	1
27	1	1	3.78728	1	3.79189	1	3.6453	1	3.73384	1
28	1	1	3.82282	1	3.82403	1	3.71356	1	3.82472	1
29	1	1	3.85056	1	3.85771	1	3.78584	1	3.90023	1

FIGURA 2A

11 seg/ciclo	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	122,449	122,449	122,449	122,449	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	2,499	2,499	2,499	2,499	2,499	357
1	0.59045	1	0.59547	1	0.56917	1	0.56387	1	0.57389	1	0.57377	1	0.57377	1	0.57377	1	0.57377	1
2	0.61063	1	0.61814	1	0.57612	1	0.57079	1	0.57471	1	0.57484	1	0.57484	1	0.57484	1	0.57484	1
3	0.63858	1	0.64811	1	0.58372	1	0.5788	1	0.57794	1	0.57794	1	0.57794	1	0.57794	1	0.57794	1
4	0.67473	1	0.68648	1	0.59254	1	0.58797	1	0.58275	1	0.58131	1	0.58131	1	0.58131	1	0.58131	1
5	0.71509	1	0.72981	1	0.60589	1	0.6004	1	0.58472	1	0.58385	1	0.58385	1	0.58385	1	0.58385	1
6	0.75986	1	0.77863	1	0.62304	1	0.61232	1	0.58588	1	0.5861	1	0.5861	1	0.5861	1	0.5861	1
7	0.81019	1	0.8355	1	0.64011	1	0.62615	1	0.58944	1	0.58961	1	0.58961	1	0.58961	1	0.58961	1
8	0.87096	1	0.89888	1	0.65956	1	0.64254	1	0.59262	1	0.59512	1	0.59512	1	0.59512	1	0.59512	1
9	0.93946	1	0.97234	1	0.68208	1	0.66487	1	0.59688	1	0.59945	1	0.59945	1	0.59945	1	0.59945	1
10	1.01217	1	1.05048	1	0.70729	1	0.68893	1	0.60188	1	0.60317	1	0.60317	1	0.60317	1	0.60317	1
11	1.09187	1	1.13374	1	0.7363	1	0.7122	1	0.60658	1	0.60676	1	0.60676	1	0.60676	1	0.60676	1
12	1.1737	1	1.21686	1	0.76544	1	0.74041	1	0.61285	1	0.61062	1	0.61062	1	0.61062	1	0.61062	1
13	1.2581	1	1.30475	1	0.7954	1	0.76736	1	0.6186	1	0.61695	1	0.61695	1	0.61695	1	0.61695	1
14	1.35629	1	1.40822	1	0.82966	1	0.79543	1	0.62582	1	0.62622	1	0.62622	1	0.62622	1	0.62622	1
15	1.45921	1	1.51312	1	0.86649	1	0.82704	1	0.6344	1	0.63556	1	0.63556	1	0.63556	1	0.63556	1
16	1.5363	1	1.61517	1	0.90804	1	0.85809	1	0.64266	1	0.64202	1	0.64202	1	0.64202	1	0.64202	1
17	1.65446	1	1.72277	1	0.94724	1	0.89278	1	0.65011	1	0.6494	1	0.6494	1	0.6494	1	0.6494	1
18	1.76005	1	1.83691	1	0.98931	1	0.92985	1	0.65946	1	0.65891	1	0.65891	1	0.65891	1	0.65891	1
19	1.87072	1	1.95048	1	1.03305	1	0.87036	1	0.68814	1	0.68874	1	0.68874	1	0.68874	1	0.68874	1
20	1.98533	1	2.07364	1	1.08159	1	1.01116	1	0.67838	1	0.67663	1	0.67663	1	0.67663	1	0.67663	1
21	2.10081	1	2.20116	1	1.12717	1	1.04798	1	0.6886	1	0.68557	1	0.68557	1	0.68557	1	0.68557	1
22	2.20838	1	2.31632	1	1.17155	1	1.09041	1	0.69852	1	0.69644	1	0.69644	1	0.69644	1	0.69644	1
23	2.31824	1	2.43179	1	1.22245	1	1.13423	1	0.70834	1	0.70741	1	0.70741	1	0.70741	1	0.70741	1
24	2.44011	1	2.55732	1	1.2797	1	1.18091	1	0.71903	1	0.71973	1	0.71973	1	0.71973	1	0.71973	1
25	2.55589	1	2.68163	1	1.33744	1	1.22889	1	0.73211	1	0.73047	1	0.73047	1	0.73047	1	0.73047	1
26	2.66279	1	2.7983	1	1.39073	1	1.27346	1	0.74492	1	0.74054	1	0.74054	1	0.74054	1	0.74054	1
27	2.77242	1	2.91258	1	1.44502	1	1.32326	1	0.75763	1	0.75311	1	0.75311	1	0.75311	1	0.75311	1
28	2.8863	1	3.02941	1	1.50273	1	1.37597	1	0.77	1	0.76627	1	0.76627	1	0.76627	1	0.76627	1
29	2.98878	1	3.14139	1	1.56232	1	1.43349	1	0.78547	1	0.7797	1	0.7797	1	0.7797	1	0.7797	1

FIGURA 2B

11 segçido	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	357	357	357	51	51	51	51	51	51	51	51	51
1	0.56174	1	0.58148	1	0.573	1	0.56757	1	0.56786	1	0.56478	1
2	0.56074	1	0.58216	1	0.57314	1	0.56801	1	0.5682	1	0.56801	1
3	0.56098	1	0.58281	1	0.57457	1	0.56877	1	0.56751	1	0.57047	1
4	0.56278	1	0.58311	1	0.5756	1	0.56963	1	0.56874	1	0.57003	1
5	0.58359	1	0.58373	1	0.57553	1	0.56998	1	0.56858	1	0.57011	1
6	0.56513	1	0.58463	1	0.57487	1	0.57036	1	0.56918	1	0.57009	1
7	0.56803	1	0.58458	1	0.57421	1	0.57009	1	0.57157	1	0.56923	1
8	0.56305	1	0.58457	1	0.5746	1	0.56911	1	0.57249	1	0.56979	1
9	0.56516	1	0.58651	1	0.57572	1	0.57036	1	0.57088	1	0.57204	1
10	0.56989	1	0.58811	1	0.57703	1	0.57199	1	0.56968	1	0.57386	1
11	0.57005	1	0.5889	1	0.57728	1	0.56956	1	0.56876	1	0.57443	1
12	0.57038	1	0.58751	1	0.57796	1	0.56841	1	0.57063	1	0.57526	1
13	0.57221	1	0.5897	1	0.579	1	0.57002	1	0.5699	1	0.57217	1
14	0.57388	1	0.59054	1	0.57851	1	0.57178	1	0.56856	1	0.56916	1
15	0.57542	1	0.59024	1	0.57737	1	0.57271	1	0.56863	1	0.57092	1
16	0.57797	1	0.59224	1	0.57634	1	0.572	1	0.5693	1	0.57378	1
17	0.57936	1	0.59694	1	0.57641	1	0.57085	1	0.56909	1	0.5738	1
18	0.58008	1	0.59832	1	0.57732	1	0.57018	1	0.56942	1	0.57296	1
19	0.58345	1	0.59897	1	0.57831	1	0.57207	1	0.57149	1	0.57289	1
20	0.5871	1	0.60049	1	0.57969	1	0.57287	1	0.57284	1	0.5726	1
21	0.5878	1	0.5993	1	0.57963	1	0.57162	1	0.57205	1	0.57231	1
22	0.58739	1	0.60009	1	0.57857	1	0.57097	1	0.56987	1	0.57146	1
23	0.59029	1	0.60358	1	0.57987	1	0.57243	1	0.56952	1	0.57073	1
24	0.59373	1	0.60489	1	0.58253	1	0.57425	1	0.57077	1	0.5701	1
25	0.59523	1	0.60684	1	0.58321	1	0.57517	1	0.57157	1	0.5707	1
26	0.59732	1	0.60886	1	0.58179	1	0.57493	1	0.57122	1	0.57246	1
27	0.59767	1	0.61099	1	0.58204	1	0.57505	1	0.57072	1	0.57276	1
28	0.60005	1	0.61377	1	0.58337	1	0.57697	1	0.57052	1	0.57344	1
29	0.60408	1	0.61642	1	0.58437	1	0.57753	1	0.57024	1	0.57341	1

FIGURA 2C

11 seg/ciclo	Tintura	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM
Ciclos	Cópias miR-21	6,000,000	6,000,000	6,000,000	6,000,000	857,143	857,143	857,143	857,143	857,143	857,143
30	1	3,86612	1	3,88391	1	3,85494	1	3,85494	1	3,86484	1
31	1	3,87927	1	3,89438	1	3,89421	1	3,89421	1	4,0237	1
32	1	3,88623	1	3,89949	1	3,9232	1	3,9232	1	4,07193	1
33	1	3,89903	1	3,91631	1	3,94879	1	3,94879	1	4,11184	1
34	1	3,91871	1	3,93983	1	3,97405	1	3,97405	1	4,14736	1
35	1	3,93878	1	3,96263	1	3,99633	1	3,99633	1	4,17765	1
36	1	3,9466	1	3,97418	1	4,00593	1	4,00593	1	4,19501	1
37	1	3,94281	1	3,97043	1	4,00891	1	4,00891	1	4,21588	1
38	1	3,94528	1	3,96822	1	4,01635	1	4,01635	1	4,23434	1
39	1	3,94886	1	3,97611	1	4,03626	1	4,03626	1	4,23694	1
40	1	3,9624	1	3,98424	1	4,05963	1	4,05963	1	4,25227	1
41	1	3,97339	1	3,99206	1	4,06913	1	4,06913	1	4,27103	1
42	1	3,95777	1	3,99295	1	4,08517	1	4,08517	1	4,277	1
43	1	3,95957	1	3,98421	1	4,08486	1	4,08486	1	4,27722	1
44	1	3,97285	1	3,98686	1	4,08252	1	4,08252	1	4,27841	1
45	1	3,98742	1	4,01312	1	4,10008	1	4,10008	1	4,28038	1
46	1	3,98824	1	4,01319	1	4,09813	1	4,09813	1	4,28556	1
47	1	3,98186	1	4,00628	1	4,10079	1	4,10079	1	4,30469	1
48	1	3,98316	1	4,00584	1	4,10069	1	4,10069	1	4,3119	1
49	1	3,99902	1	4,02097	1	4,10126	1	4,10126	1	4,31699	1
50	1	4,00374	1	4,03166	1	4,11749	1	4,11749	1	4,31909	1
51	1	4,00544	1	4,0348	1	4,11867	1	4,11867	1	4,30428	1
52	1	4,00753	1	4,03241	1	4,10482	1	4,10482	1	4,30751	1
53	1	4,00206	1	4,02706	1	4,11269	1	4,11269	1	4,3242	1
54	1	4,00804	1	4,02819	1	4,12602	1	4,12602	1	4,34549	1
55	1	4,02419	1	4,03058	1	4,1235	1	4,1235	1	4,35648	1
56	1	4,02745	1	4,04125	1	4,12437	1	4,12437	1	4,34601	1
57	1	4,02746	1	4,05155	1	4,12729	1	4,12729	1	4,33525	1
58	1	4,02408	1	4,05283	1	4,12744	1	4,12744	1	4,33791	1

FIGURA 2D

11 seg/ciclo	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	122,448	122,449	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493
30	3,07926	1	3,24817	1	1,61955	1	1,49155	1	0,8014	1	0,79424	1	0,8014	1	0,79424	1	0,8014	1
31	3,18088	1	3,34479	1	1,67456	1	1,53747	1	0,81452	1	0,80601	1	0,81452	1	0,80601	1	0,81452	1
32	3,26753	1	3,43875	1	1,73408	1	1,58872	1	0,82906	1	0,82158	1	0,82906	1	0,82158	1	0,82906	1
33	3,34465	1	3,53101	1	1,79684	1	1,651	1	0,84227	1	0,83482	1	0,84227	1	0,83482	1	0,84227	1
34	3,42873	1	3,61188	1	1,85883	1	1,7088	1	0,85418	1	0,85003	1	0,85418	1	0,85003	1	0,85418	1
35	3,50495	1	3,68754	1	1,92242	1	1,7654	1	0,86942	1	0,86618	1	0,86942	1	0,86618	1	0,86942	1
36	3,57388	1	3,75319	1	1,98602	1	1,81656	1	0,88653	1	0,88044	1	0,88653	1	0,88044	1	0,88653	1
37	3,63958	1	3,8135	1	2,04866	1	1,88028	1	0,90443	1	0,89619	1	0,90443	1	0,89619	1	0,90443	1
38	3,69814	1	3,87304	1	2,12014	1	1,94644	1	0,92175	1	0,91451	1	0,92175	1	0,91451	1	0,92175	1
39	3,73847	1	3,92385	1	2,18904	1	2,00664	1	0,93901	1	0,93355	1	0,93901	1	0,93355	1	0,93901	1
40	3,77655	1	3,97027	1	2,25205	1	2,07086	1	0,95725	1	0,94956	1	0,95725	1	0,94956	1	0,95725	1
41	3,81688	1	4,01874	1	2,30715	1	2,12764	1	0,97351	1	0,96628	1	0,97351	1	0,96628	1	0,97351	1
42	3,84164	1	4,05247	1	2,36371	1	2,18058	1	0,99209	1	0,98189	1	0,99209	1	0,98189	1	0,99209	1
43	3,86584	1	4,07863	1	2,43237	1	2,23776	1	1,01118	1	0,99636	1	1,01118	1	0,99636	1	1,01118	1
44	3,89426	1	4,11487	1	2,50426	1	2,30094	1	1,03171	1	1,0159	1	1,03171	1	1,0159	1	1,03171	1
45	3,91456	1	4,14859	1	2,56832	1	2,37011	1	1,05266	1	1,03798	1	1,05266	1	1,03798	1	1,05266	1
46	3,94775	1	4,16795	1	2,63481	1	2,43309	1	1,06887	1	1,05829	1	1,06887	1	1,05829	1	1,06887	1
47	3,97713	1	4,17687	1	2,70238	1	2,49985	1	1,08671	1	1,07502	1	1,08671	1	1,07502	1	1,08671	1
48	3,98542	1	4,19314	1	2,76016	1	2,55456	1	1,10639	1	1,09332	1	1,10639	1	1,09332	1	1,10639	1
49	4,00313	1	4,2085	1	2,82095	1	2,62071	1	1,12546	1	1,11394	1	1,12546	1	1,11394	1	1,12546	1
50	4,00484	1	4,21188	1	2,88946	1	2,68026	1	1,14532	1	1,13607	1	1,14532	1	1,13607	1	1,14532	1
51	3,99251	1	4,21581	1	2,95299	1	2,73308	1	1,16727	1	1,15714	1	1,16727	1	1,15714	1	1,16727	1
52	4,00539	1	4,22625	1	3,00281	1	2,78357	1	1,19282	1	1,17972	1	1,19282	1	1,17972	1	1,19282	1
53	4,03072	1	4,23815	1	3,05514	1	2,84419	1	1,21492	1	1,20049	1	1,21492	1	1,20049	1	1,21492	1
54	4,04418	1	4,25215	1	3,11692	1	2,91111	1	1,23352	1	1,21701	1	1,23352	1	1,21701	1	1,23352	1
55	4,05102	1	4,26463	1	3,17484	1	2,97452	1	1,25234	1	1,2374	1	1,25234	1	1,2374	1	1,25234	1
56	4,04529	1	4,26984	1	3,22145	1	3,03025	1	1,27254	1	1,25869	1	1,27254	1	1,25869	1	1,27254	1
57	4,03159	1	4,27608	1	3,26806	1	3,08212	1	1,28652	1	1,27987	1	1,28652	1	1,27987	1	1,28652	1
58	4,0348	1	4,2782	1	3,31523	1	3,13797	1	1,32013	1	1,29942	1	1,32013	1	1,29942	1	1,32013	1

FUGURA 2E

[illegible]**FIGURA 2F**

11 sêg/ciclo	Tintura	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	Cópias mR-21	8,000,000	6,000,000	6,000,000	857,143	857,143	857,143	857,143	857,143	122,449
59	1	4,01868	4,01868	4,05736	1	4,13075	4,13075	4,34338	4,34338	1
60	1	4,02358	4,02358	4,05111	1	4,13823	4,13823	4,35368	4,35368	1
61	1	4,0282	4,0282	4,04594	1	4,14853	4,14853	4,35894	4,35894	1
62	1	4,02562	4,02562	4,04586	1	4,15362	4,15362	4,36473	4,36473	1
63	1	4,03693	4,03693	4,04986	1	4,14396	4,14396	4,34966	4,34966	1
64	1	4,05017	4,05017	4,06557	1	4,14512	4,14512	4,35542	4,35542	1
65	1	4,05085	4,05085	4,07466	1	4,16081	4,16081	4,37188	4,37188	1
66	1	4,05865	4,05865	4,07687	1	4,16498	4,16498	4,37361	4,37361	1
67	1	4,0614	4,0614	4,08084	1	4,16274	4,16274	4,37332	4,37332	1
68	1	4,05008	4,05008	4,08098	1	4,15992	4,15992	4,36819	4,36819	1
69	1	4,04759	4,04759	4,08285	1	4,18066	4,18066	4,37009	4,37009	1
70	1	4,05558	4,05558	4,08679	1	4,16855	4,16855	4,3819	4,3819	1
71	1	4,0603	4,0603	4,0862	1	4,1685	4,1685	4,38412	4,38412	1
72	1	4,06393	4,06393	4,07982	1	4,16812	4,16812	4,38352	4,38352	1
73	1	4,06876	4,06876	4,08391	1	4,17956	4,17956	4,38412	4,38412	1
74	1	4,07413	4,07413	4,08997	1	4,1807	4,1807	4,38799	4,38799	1
75	1	4,0728	4,0728	4,08582	1	4,17261	4,17261	4,39307	4,39307	1
76	1	4,08585	4,08585	4,08586	1	4,16377	4,16377	4,38668	4,38668	1
77	1	4,07142	4,07142	4,09968	1	4,16217	4,16217	4,37889	4,37889	1
78	1	4,07639	4,07639	4,10767	1	4,17278	4,17278	4,38316	4,38316	1
79	1	4,08085	4,08085	4,10247	1	4,16178	4,16178	4,38704	4,38704	1
80	1	4,08244	4,08244	4,10518	1	4,17804	4,17804	4,39839	4,39839	1
81	1	4,08463	4,08463	4,11663	1	4,18054	4,18054	4,4018	4,4018	1
82	1	4,08449	4,08449	4,11511	1	4,18599	4,18599	4,39174	4,39174	1
83	1	4,07894	4,07894	4,11095	1	4,18406	4,18406	4,38729	4,38729	1
84	1	4,08317	4,08317	4,12001	1	4,18639	4,18639	4,39856	4,39856	1
85	1	4,07969	4,07969	4,12802	1	4,18835	4,18835	4,41026	4,41026	1
86	1	4,08468	4,08468	4,14392	1	4,19497	4,19497	4,41269	4,41269	1
87	1	4,10855	4,10855	4,14058	1	4,20285	4,20285	4,41776	4,41776	1

FIGURA 2G

11 período Ciclos	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
59	122,449	122,449	122,449	122,449	17,493	17,493	17,493	17,493	2,499	2,499	2,499	2,499
60	4,04822	1	4,27908	1	3,36285	1	3,19197	1	1,34286	1	1,32212	1
61	4,04903	1	4,28053	1	3,4083	1	3,24874	1	1,36508	1	1,34758	1
62	4,05797	1	4,28086	1	3,44403	1	3,2982	1	1,38715	1	1,37023	1
63	4,06501	1	4,28819	1	3,48191	1	3,34664	1	1,40971	1	1,39427	1
64	4,06383	1	4,29107	1	3,52843	1	3,40339	1	1,43321	1	1,41705	1
65	4,06659	1	4,29489	1	3,57139	1	3,45016	1	1,45767	1	1,43978	1
66	4,0793	1	4,29567	1	3,60747	1	3,4906	1	1,48159	1	1,46302	1
67	4,08189	1	4,29689	1	3,6452	1	3,53719	1	1,50706	1	1,48736	1
68	4,07087	1	4,30408	1	3,67805	1	3,57353	1	1,53316	1	1,51233	1
69	4,07233	1	4,30793	1	3,68582	1	3,5956	1	1,55441	1	1,53442	1
70	4,07423	1	4,31199	1	3,70511	1	3,64308	1	1,57988	1	1,55936	1
71	4,07448	1	4,31953	1	3,7441	1	3,70125	1	1,60723	1	1,58338	1
72	4,07786	1	4,32404	1	3,76785	1	3,73078	1	1,63369	1	1,60777	1
73	4,08318	1	4,3204	1	3,77961	1	3,75029	1	1,65735	1	1,63374	1
74	4,08044	1	4,31711	1	3,78344	1	3,78272	1	1,67874	1	1,65856	1
75	4,09479	1	4,32746	1	3,82568	1	3,8188	1	1,70821	1	1,68722	1
76	4,10241	1	4,3232	1	3,85609	1	3,84552	1	1,73782	1	1,71283	1
77	4,09888	1	4,3112	1	3,86373	1	3,87163	1	1,76489	1	1,73826	1
78	4,09991	1	4,32528	1	3,86981	1	3,89804	1	1,78572	1	1,7627	1
79	4,11341	1	4,34496	1	3,89557	1	3,92073	1	1,80824	1	1,78763	1
80	4,11964	1	4,35606	1	3,91695	1	3,94225	1	1,8301	1	1,81149	1
81	4,11624	1	4,35903	1	3,92223	1	3,96917	1	1,86155	1	1,83905	1
82	4,10199	1	4,35429	1	3,93462	1	3,99454	1	1,88456	1	1,8639	1
83	4,10408	1	4,34639	1	3,94914	1	4,00853	1	1,91233	1	1,88767	1
84	4,11303	1	4,35081	1	3,95597	1	4,0227	1	1,93874	1	1,91268	1
85	4,11102	1	4,36051	1	3,97197	1	4,04458	1	1,9699	1	1,93549	1
86	4,10635	1	4,35719	1	3,9877	1	4,062	1	2,00151	1	1,96018	1
87	4,10411	1	4,35864	1	3,98932	1	4,06558	1	2,02361	1	1,98845	1
	4,1087	1	4,36984	1	3,98636	1	4,07306	1	2,04635	1	2,01229	1

FIGURA 2H

11 seg/ciclo Ciclos	FAM 357	Amarela 357	FAM 357	Amarela 51	FAM 51	Amarela 51	FAM 51	Amarela	FAM	Amarela	FAM
59	0.7122	1	0.71405	1	0.61413	1	0.59197	1	0.57485	1	0.57905
60	0.71869	1	0.71971	1	0.6135	1	0.59408	1	0.57476	1	0.58053
61	0.72366	1	0.72484	1	0.61333	1	0.59508	1	0.57544	1	0.58113
62	0.72877	1	0.72855	1	0.61625	1	0.59512	1	0.57728	1	0.58131
63	0.7354	1	0.73264	1	0.61847	1	0.59778	1	0.57894	1	0.58106
64	0.73839	1	0.73737	1	0.6203	1	0.59872	1	0.57951	1	0.58294
65	0.74286	1	0.73993	1	0.62206	1	0.59807	1	0.57937	1	0.58328
66	0.74742	1	0.74324	1	0.62255	1	0.59914	1	0.57863	1	0.58203
67	0.75306	1	0.74836	1	0.62347	1	0.59889	1	0.57873	1	0.58129
68	0.75873	1	0.75419	1	0.62479	1	0.60009	1	0.57866	1	0.57999
69	0.7629	1	0.75828	1	0.62613	1	0.60166	1	0.57858	1	0.58038
70	0.76498	1	0.7614	1	0.62797	1	0.60282	1	0.5793	1	0.58184
71	0.76867	1	0.76618	1	0.62906	1	0.60186	1	0.5807	1	0.58269
72	0.77389	1	0.77011	1	0.63038	1	0.60136	1	0.58028	1	0.58232
73	0.77926	1	0.77445	1	0.63181	1	0.60318	1	0.5795	1	0.58292
74	0.78568	1	0.77935	1	0.63401	1	0.60403	1	0.58096	1	0.58328
75	0.79095	1	0.78441	1	0.63591	1	0.60449	1	0.58173	1	0.58168
76	0.79517	1	0.78883	1	0.63723	1	0.60688	1	0.58182	1	0.58109
77	0.79905	1	0.79115	1	0.63867	1	0.609	1	0.58104	1	0.58178
78	0.80622	1	0.79521	1	0.63816	1	0.60844	1	0.58034	1	0.58284
79	0.81413	1	0.80006	1	0.63797	1	0.60648	1	0.58096	1	0.58529
80	0.81951	1	0.80529	1	0.63882	1	0.60668	1	0.58131	1	0.58581
81	0.82698	1	0.81363	1	0.64089	1	0.60679	1	0.58176	1	0.58491
82	0.8318	1	0.8188	1	0.64311	1	0.60785	1	0.58287	1	0.58469
83	0.83551	1	0.82457	1	0.64338	1	0.60901	1	0.5827	1	0.58552
84	0.84319	1	0.83239	1	0.64461	1	0.60926	1	0.58241	1	0.58714
85	0.84897	1	0.84082	1	0.64603	1	0.61145	1	0.58402	1	0.58746
86	0.85287	1	0.84417	1	0.64799	1	0.61202	1	0.58374	1	0.58883
87	0.85695	1	0.84529	1	0.65104	1	0.61083	1	0.58268	1	0.5886

FIGURA 21

FIGURA 2J

11 seg/ciclo Ciclos	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
88	122,449	122,449	122,449	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493
89	4.12541	1	4.37147	1	3.98192	1	4.08254	1	2.06927	1	2.03475	1	2.06927	1	2.03475	1	2.06927	1
90	4.13856	1	4.35856	1	3.98556	1	4.08558	1	2.09492	1	2.0634	1	2.09492	1	2.0634	1	2.09492	1
91	4.12791	1	4.34876	1	3.99691	1	4.12158	1	2.12193	1	2.09393	1	2.12193	1	2.09393	1	2.12193	1
92	4.10987	1	4.35375	1	4.00477	1	4.13464	1	2.14742	1	2.11921	1	2.14742	1	2.11921	1	2.14742	1
93	4.09825	1	4.35948	1	4.00305	1	4.12868	1	2.17309	1	2.14371	1	2.17309	1	2.14371	1	2.17309	1
94	4.10318	1	4.36203	1	3.99537	1	4.1272	1	2.19373	1	2.17176	1	2.19373	1	2.17176	1	2.19373	1
95	4.1117	1	4.34555	1	4.00061	1	4.14978	1	2.22546	1	2.20309	1	2.22546	1	2.20309	1	2.22546	1
96	4.11183	1	4.34179	1	4.0108	1	4.16297	1	2.25944	1	2.23233	1	2.25944	1	2.23233	1	2.25944	1
97	4.10613	1	4.35389	1	4.0145	1	4.16822	1	2.28268	1	2.25819	1	2.28268	1	2.25819	1	2.28268	1
98	4.10547	1	4.36052	1	4.00401	1	4.1686	1	2.31057	1	2.2812	1	2.31057	1	2.2812	1	2.31057	1
99	4.11942	1	4.36963	1	4.00393	1	4.1607	1	2.34174	1	2.30238	1	2.34174	1	2.30238	1	2.34174	1
100	4.14059	1	4.36757	1	4.02812	1	4.16847	1	2.36721	1	2.32933	1	2.36721	1	2.32933	1	2.36721	1
101	4.1495	1	4.36983	1	4.04455	1	4.17194	1	2.38945	1	2.35879	1	2.38945	1	2.35879	1	2.38945	1
102	4.14776	1	4.37775	1	4.04029	1	4.17191	1	2.4148	1	2.38823	1	2.4148	1	2.38823	1	2.4148	1
103	4.13724	1	4.37843	1	4.02678	1	4.16884	1	2.44599	1	2.41498	1	2.44599	1	2.41498	1	2.44599	1
104	4.12887	1	4.37284	1	4.03237	1	4.17321	1	2.47902	1	2.44141	1	2.47902	1	2.44141	1	2.47902	1
105	4.1414	1	4.38442	1	4.04897	1	4.18533	1	2.51089	1	2.47314	1	2.51089	1	2.47314	1	2.51089	1
106	4.1512	1	4.40423	1	4.04519	1	4.19795	1	2.53765	1	2.50378	1	2.53765	1	2.50378	1	2.53765	1
107	4.15131	1	4.40058	1	4.03837	1	4.20191	1	2.55827	1	2.52762	1	2.55827	1	2.52762	1	2.55827	1
108	4.15022	1	4.39072	1	4.04638	1	4.20647	1	2.57949	1	2.55583	1	2.57949	1	2.55583	1	2.57949	1
109	4.15838	1	4.39899	1	4.05826	1	4.21887	1	2.60294	1	2.58883	1	2.60294	1	2.58883	1	2.60294	1
110	4.16749	1	4.4085	1	4.05991	1	4.21757	1	2.63535	1	2.61877	1	2.63535	1	2.61877	1	2.63535	1
111	4.16486	1	4.41652	1	4.06411	1	4.20875	1	2.66429	1	2.63751	1	2.66429	1	2.63751	1	2.66429	1
112	4.16317	1	4.41518	1	4.07471	1	4.224	1	2.68769	1	2.65886	1	2.68769	1	2.65886	1	2.68769	1
113	4.16368	1	4.39582	1	4.07223	1	4.2341	1	2.7209	1	2.69087	1	2.7209	1	2.69087	1	2.7209	1
114	4.16425	1	4.38949	1	4.06332	1	4.23002	1	2.75145	1	2.71894	1	2.75145	1	2.71894	1	2.75145	1
115	4.16909	1	4.39971	1	4.06969	1	4.23013	1	2.78533	1	2.74364	1	2.78533	1	2.74364	1	2.78533	1
116	4.16873	1	4.41012	1	4.08082	1	4.235	1	2.81825	1	2.77122	1	2.81825	1	2.77122	1	2.81825	1
	4.16854	1	4.40861	1	4.07831	1	4.23567	1	2.83579	1	2.79523	1	2.83579	1	2.79523	1	2.83579	1

FIGURA 2K

11 seg/ciclo Cíclon	FAM 357	Amarela 357	FAM 357	Amarela 51	FAM 51	Amarela 51	FAM 51	Amarela	FAM	Amarela	FAM
88	0.8636	1	0.85131	1	0.65299	1	0.61161	1	0.58207	1	0.58703
89	0.87109	1	0.85879	1	0.65578	1	0.61497	1	0.5809	1	0.58799
90	0.879	1	0.86381	1	0.65891	1	0.61736	1	0.58165	1	0.58895
91	0.88566	1	0.86764	1	0.65984	1	0.61824	1	0.58351	1	0.58573
92	0.89261	1	0.87458	1	0.66091	1	0.61961	1	0.58597	1	0.58732
93	0.90076	1	0.8815	1	0.66178	1	0.62105	1	0.58669	1	0.58896
94	0.9053	1	0.88698	1	0.66186	1	0.62184	1	0.58844	1	0.58946
95	0.91015	1	0.89268	1	0.66256	1	0.62239	1	0.58896	1	0.5888
96	0.91619	1	0.89604	1	0.663	1	0.6225	1	0.58756	1	0.58931
97	0.923	1	0.89987	1	0.66417	1	0.62239	1	0.58727	1	0.58987
98	0.93076	1	0.90796	1	0.6661	1	0.62384	1	0.58867	1	0.59111
99	0.93608	1	0.91613	1	0.67109	1	0.62612	1	0.5871	1	0.5908
100	0.93974	1	0.92037	1	0.67408	1	0.62757	1	0.58862	1	0.59062
101	0.94463	1	0.9252	1	0.67273	1	0.6282	1	0.58866	1	0.59021
102	0.95218	1	0.93124	1	0.67321	1	0.62809	1	0.5874	1	0.58962
103	0.9582	1	0.93706	1	0.67607	1	0.62941	1	0.58898	1	0.59066
104	0.96461	1	0.94391	1	0.67932	1	0.63065	1	0.58985	1	0.59113
105	0.97408	1	0.95232	1	0.67981	1	0.63305	1	0.59016	1	0.59141
106	0.98259	1	0.95965	1	0.68091	1	0.63529	1	0.59108	1	0.59268
107	0.98675	1	0.96255	1	0.68391	1	0.63653	1	0.59138	1	0.59407
108	0.99146	1	0.96525	1	0.68546	1	0.63886	1	0.59059	1	0.5942
109	0.99637	1	0.97052	1	0.68897	1	0.63865	1	0.59025	1	0.59373
110	1.00555	1	0.97657	1	0.69171	1	0.63913	1	0.59083	1	0.59388
111	1.01583	1	0.98259	1	0.69348	1	0.63785	1	0.59154	1	0.59387
112	1.02144	1	0.98613	1	0.69485	1	0.63778	1	0.59131	1	0.59381
113	1.0252	1	0.99165	1	0.69516	1	0.6383	1	0.5898	1	0.59524
114	1.03147	1	1.00012	1	0.69731	1	0.63999	1	0.58901	1	0.59533
115	1.03988	1	1.00798	1	0.69771	1	0.6426	1	0.59057	1	0.59356
116	1.04786	1	1.0126	1	0.69774	1	0.64503	1	0.5922	1	0.59352

FIGURA 2L

11 seg/ciclo	Tintura	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	Cópias mR-21	6,000,000	6,000,000	6,000,000	6,000,000	857,143	857,143	857,143	857,143	857,143	122,449
117	1	4.15286	1	4.17343	1	1	1	4.2273	1	4.43286	1
118	1	4.15669	1	4.16262	1	1	1	4.22053	1	4.4518	1
119	1	4.15658	1	4.16954	1	1	1	4.21471	1	4.45877	1
120	1	4.14863	1	4.16898	1	1	1	4.22365	1	4.44899	1
121	1	4.14678	1	4.16736	1	1	1	4.24153	1	4.44365	1
122	1	4.14784	1	4.16941	1	1	1	4.23659	1	4.43782	1
123	1	4.15271	1	4.17426	1	1	1	4.22903	1	4.44011	1
124	1	4.15598	1	4.18813	1	1	1	4.22757	1	4.45018	1
125	1	4.16298	1	4.19443	1	1	1	4.23047	1	4.45123	1
126	1	4.1603	1	4.19012	1	1	1	4.23498	1	4.44582	1
127	1	4.15488	1	4.18935	1	1	1	4.23562	1	4.4431	1
128	1	4.15823	1	4.1896	1	1	1	4.23695	1	4.4496	1
129	1	4.15652	1	4.18963	1	1	1	4.23791	1	4.46468	1
130	1	4.15452	1	4.19701	1	1	1	4.25161	1	4.4768	1
131	1	4.15587	1	4.20057	1	1	1	4.25694	1	4.47275	1
132	1	4.16244	1	4.1996	1	1	1	4.24289	1	4.46594	1
133	1	4.17064	1	4.20671	1	1	1	4.23501	1	4.46114	1
134	1	4.1743	1	4.21357	1	1	1	4.23855	1	4.45131	1
135	1	4.1736	1	4.21265	1	1	1	4.2367	1	4.44871	1
136	1	4.18037	1	4.20217	1	1	1	4.23857	1	4.45282	1
137	1	4.18093	1	4.18993	1	1	1	4.24869	1	4.45688	1
138	1	4.17168	1	4.18736	1	1	1	4.2557	1	4.45953	1
139	1	4.17083	1	4.19434	1	1	1	4.25679	1	4.46414	1
140	1	4.17529	1	4.20167	1	1	1	4.24868	1	4.47146	1
141	1	4.18045	1	4.20713	1	1	1	4.23277	1	4.46984	1
142	1	4.19305	1	4.20381	1	1	1	4.2295	1	4.46666	1
143	1	4.2007	1	4.19988	1	1	1	4.23534	1	4.46744	1
144	1	4.20003	1	4.20441	1	1	1	4.25138	1	4.481	1
145	1	4.20142	1	4.22256	1	1	1	4.28042	1	4.50416	1

FIGURA 2M

11 seg/ciclo	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	122,449	122,449	122,449	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493
117	4.1672	1	4.4143	1	4.07263	1	4.22519	1	2.8453	1	2.80716	1	2.8453	1	2.80716	1
118	4.17158	1	4.42147	1	4.07505	1	4.23	1	2.86869	1	2.83102	1	2.86869	1	2.83102	1
119	4.18061	1	4.42885	1	4.08387	1	4.24071	1	2.90168	1	2.85959	1	2.90168	1	2.85959	1
120	4.17781	1	4.427	1	4.08185	1	4.23858	1	2.92975	1	2.89782	1	2.92975	1	2.89782	1
121	4.18097	1	4.41997	1	4.07173	1	4.22984	1	2.95856	1	2.92448	1	2.95856	1	2.92448	1
122	4.18183	1	4.42456	1	4.06515	1	4.23151	1	2.97824	1	2.94608	1	2.97824	1	2.94608	1
123	4.17463	1	4.42522	1	4.06244	1	4.22946	1	2.9974	1	2.96668	1	2.9974	1	2.96668	1
124	4.17675	1	4.43039	1	4.06449	1	4.23249	1	3.0263	1	2.98835	1	3.0263	1	2.98835	1
125	4.17617	1	4.43324	1	4.07318	1	4.25079	1	3.05623	1	3.01349	1	3.05623	1	3.01349	1
126	4.18052	1	4.43618	1	4.07817	1	4.26226	1	3.07925	1	3.04399	1	3.07925	1	3.04399	1
127	4.18523	1	4.4444	1	4.08109	1	4.25643	1	3.10086	1	3.07173	1	3.10086	1	3.07173	1
128	4.18473	1	4.44573	1	4.08196	1	4.24906	1	3.1213	1	3.08874	1	3.1213	1	3.08874	1
129	4.18571	1	4.4372	1	4.08091	1	4.25784	1	3.14687	1	3.11483	1	3.14687	1	3.11483	1
130	4.18707	1	4.42721	1	4.07776	1	4.26937	1	3.1734	1	3.14667	1	3.1734	1	3.14667	1
131	4.18641	1	4.42501	1	4.07754	1	4.2751	1	3.20481	1	3.17778	1	3.20481	1	3.17778	1
132	4.17755	1	4.42974	1	4.08104	1	4.27187	1	3.23076	1	3.20863	1	3.23076	1	3.20863	1
133	4.18509	1	4.4382	1	4.08397	1	4.27135	1	3.243	1	3.22135	1	3.243	1	3.22135	1
134	4.19072	1	4.44915	1	4.09052	1	4.26746	1	3.26163	1	3.24217	1	3.26163	1	3.24217	1
135	4.18568	1	4.45424	1	4.10315	1	4.26461	1	3.28111	1	3.267	1	3.28111	1	3.267	1
136	4.19111	1	4.44932	1	4.10566	1	4.27154	1	3.30618	1	3.2806	1	3.30618	1	3.2806	1
137	4.19551	1	4.44278	1	4.09789	1	4.26067	1	3.33371	1	3.30362	1	3.33371	1	3.30362	1
138	4.18886	1	4.45012	1	4.1016	1	4.26312	1	3.35113	1	3.32366	1	3.35113	1	3.32366	1
139	4.19045	1	4.45558	1	4.10721	1	4.27849	1	3.36653	1	3.34261	1	3.36653	1	3.34261	1
140	4.20516	1	4.44867	1	4.11353	1	4.29341	1	3.38696	1	3.3752	1	3.38696	1	3.3752	1
141	4.21176	1	4.4372	1	4.11299	1	4.31085	1	3.41789	1	3.40617	1	3.41789	1	3.40617	1
142	4.20428	1	4.4386	1	4.10486	1	4.30875	1	3.43993	1	3.42585	1	3.43993	1	3.42585	1
143	4.19607	1	4.44529	1	4.10452	1	4.30111	1	3.4563	1	3.44736	1	3.4563	1	3.44736	1
144	4.20616	1	4.45941	1	4.11553	1	4.30568	1	3.48374	1	3.4699	1	3.48374	1	3.4699	1
145	4.22101	1	4.47364	1	4.1304	1	4.30796	1	3.51143	1	3.49889	1	3.51143	1	3.49889	1

FIGURA 2N

11 seg/ciclo Ciclos	FAM 357	Amarela 357	FAM 357	Amarela 51	FAM 51	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM
117	1.05355	1	1.0178	1	0.69891	1	0.64559	1	0.59193	1	0.59458
118	1.06004	1	1.02408	1	0.70209	1	0.64661	1	0.59134	1	0.59488
119	1.06871	1	1.03064	1	0.7058	1	0.64931	1	0.59272	1	0.59413
120	1.07476	1	1.04103	1	0.70818	1	0.65058	1	0.5929	1	0.59427
121	1.07862	1	1.05017	1	0.71147	1	0.65072	1	0.59294	1	0.59556
122	1.08584	1	1.05457	1	0.71337	1	0.6509	1	0.59467	1	0.59676
123	1.09649	1	1.05862	1	0.71475	1	0.65041	1	0.59419	1	0.59708
124	1.10831	1	1.06408	1	0.71778	1	0.65098	1	0.59409	1	0.5979
125	1.11229	1	1.06903	1	0.71862	1	0.65392	1	0.59618	1	0.59978
126	1.11906	1	1.07616	1	0.71985	1	0.65336	1	0.59717	1	0.59998
127	1.12515	1	1.08386	1	0.72137	1	0.65813	1	0.59601	1	0.59894
128	1.13105	1	1.08889	1	0.72314	1	0.65824	1	0.59433	1	0.59863
129	1.14057	1	1.09635	1	0.72676	1	0.65888	1	0.59503	1	0.59966
130	1.14649	1	1.10494	1	0.73017	1	0.66087	1	0.59743	1	0.5994
131	1.15211	1	1.1109	1	0.73153	1	0.66141	1	0.59676	1	0.59916
132	1.16101	1	1.1168	1	0.73219	1	0.66329	1	0.59534	1	0.59965
133	1.16548	1	1.12087	1	0.73365	1	0.66601	1	0.59516	1	0.5993
134	1.17044	1	1.12635	1	0.73625	1	0.66767	1	0.59653	1	0.59994
135	1.17834	1	1.13406	1	0.73816	1	0.66983	1	0.59805	1	0.60025
136	1.18857	1	1.14073	1	0.73914	1	0.67007	1	0.59831	1	0.60102
137	1.19886	1	1.14935	1	0.74203	1	0.67099	1	0.59838	1	0.60158
138	1.20936	1	1.1596	1	0.74445	1	0.67265	1	0.60036	1	0.60198
139	1.21505	1	1.16567	1	0.7458	1	0.67314	1	0.6013	1	0.60229
140	1.21806	1	1.16894	1	0.7493	1	0.67518	1	0.59909	1	0.60204
141	1.22476	1	1.17437	1	0.75124	1	0.67701	1	0.59858	1	0.60176
142	1.23406	1	1.18218	1	0.75326	1	0.67778	1	0.6011	1	0.60319
143	1.24418	1	1.18928	1	0.75639	1	0.67882	1	0.60136	1	0.60429
144	1.25256	1	1.19767	1	0.75704	1	0.6796	1	0.60254	1	0.60498
145	1.25873	1	1.20895	1	0.75726	1	0.67923	1	0.60331	1	0.60409

FIGURA 20

FIGURA 2P

11 seq/ciclo	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	122,449	122,449	122,449	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	2,499	2,499	2,499	2,499
146	4.21451	1	4.46696	1	4.12068	1	4.29653	1	4.29653	1	4.29653	1	4.29653	1	3.53048	1	3.52296	1
147	4.20522	1	4.4633	1	4.10724	1	4.28675	1	4.28675	1	4.28675	1	4.28675	1	3.5429	1	3.53866	1
148	4.21107	1	4.46715	1	4.10074	1	4.28608	1	4.28608	1	4.28608	1	4.28608	1	3.56322	1	3.56763	1
149	4.21914	1	4.4682	1	4.11135	1	4.2888	1	4.2888	1	4.2888	1	4.2888	1	3.58671	1	3.59615	1
150	4.22112	1	4.47403	1	4.12365	1	4.28513	1	4.28513	1	4.28513	1	4.28513	1	3.60863	1	3.61242	1
151	4.22285	1	4.4723	1	4.12046	1	4.28689	1	4.28689	1	4.28689	1	4.28689	1	3.62542	1	3.62147	1
152	4.22098	1	4.46519	1	4.1186	1	4.29702	1	4.29702	1	4.29702	1	4.29702	1	3.63521	1	3.6386	1
153	4.21172	1	4.4601	1	4.11182	1	4.29472	1	4.29472	1	4.29472	1	4.29472	1	3.6576	1	3.66674	1
154	4.20272	1	4.45937	1	4.11365	1	4.29825	1	4.29825	1	4.29825	1	4.29825	1	3.69124	1	3.69419	1
155	4.2035	1	4.46995	1	4.1166	1	4.29886	1	4.29886	1	4.29886	1	4.29886	1	3.70937	1	3.71025	1
156	4.21202	1	4.46517	1	4.1288	1	4.29246	1	4.29246	1	4.29246	1	4.29246	1	3.719	1	3.71905	1
157	4.21999	1	4.46128	1	4.12807	1	4.30192	1	4.30192	1	4.30192	1	4.30192	1	3.73436	1	3.73084	1
158	4.22375	1	4.46959	1	4.1167	1	4.31392	1	4.31392	1	4.31392	1	4.31392	1	3.75338	1	3.74162	1
159	4.21927	1	4.46977	1	4.12382	1	4.32207	1	4.32207	1	4.32207	1	4.32207	1	3.77851	1	3.76957	1
160	4.2276	1	4.47186	1	4.13033	1	4.31899	1	4.31899	1	4.31899	1	4.31899	1	3.80467	1	3.7981	1
161	4.24015	1	4.47169	1	4.12707	1	4.31266	1	4.31266	1	4.31266	1	4.31266	1	3.81649	1	3.80912	1
162	4.23335	1	4.46435	1	4.12646	1	4.31404	1	4.31404	1	4.31404	1	4.31404	1	3.82715	1	3.83416	1
163	4.23545	1	4.47245	1	4.12952	1	4.31228	1	4.31228	1	4.31228	1	4.31228	1	3.84694	1	3.85198	1
164	4.25292	1	4.49903	1	4.13373	1	4.31345	1	4.31345	1	4.31345	1	4.31345	1	3.86553	1	3.87537	1
165	4.26052	1	4.50124	1	4.12892	1	4.31841	1	4.31841	1	4.31841	1	4.31841	1	3.88747	1	3.89807	1
166	4.25053	1	4.48594	1	4.12346	1	4.32087	1	4.32087	1	4.32087	1	4.32087	1	3.90456	1	3.90675	1
167	4.24039	1	4.47334	1	4.14005	1	4.31785	1	4.31785	1	4.31785	1	4.31785	1	3.91395	1	3.92051	1
168	4.22675	1	4.46178	1	4.14325	1	4.31157	1	4.31157	1	4.31157	1	4.31157	1	3.92289	1	3.92507	1
169	4.22922	1	4.47178	1	4.13501	1	4.30877	1	4.30877	1	4.30877	1	4.30877	1	3.93785	1	3.93752	1
170	4.24938	1	4.49744	1	4.13844	1	4.31709	1	4.31709	1	4.31709	1	4.31709	1	3.95192	1	3.95765	1
171	4.25085	1	4.48694	1	4.14474	1	4.32676	1	4.32676	1	4.32676	1	4.32676	1	3.95141	1	3.96584	1
172	4.23862	1	4.48784	1	4.14802	1	4.32837	1	4.32837	1	4.32837	1	4.32837	1	3.95862	1	3.96958	1
173	4.23066	1	4.50226	1	4.14735	1	4.32334	1	4.32334	1	4.32334	1	4.32334	1	3.97756	1	3.97966	1
174	4.23928	1	4.48441	1	4.14817	1	4.32338	1	4.32338	1	4.32338	1	4.32338	1	4.00774	1	4.00628	1

FIGURA 2Q

11 seg/ciclo	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
1 Ciclos	357	357	357	51	51	51	51	51	51	51	51	51
146	1.26443	1	1.21134	1	0.76062	1	0.67887	1	0.60122	1	0.60331	1
147	1.27536	1	1.21656	1	0.76298	1	0.68061	1	0.60075	1	0.60377	1
148	1.28578	1	1.22712	1	0.76432	1	0.68321	1	0.60136	1	0.60354	1
149	1.28976	1	1.23532	1	0.76644	1	0.68654	1	0.59975	1	0.6045	1
150	1.29446	1	1.2404	1	0.76909	1	0.68797	1	0.60004	1	0.60533	1
151	1.30249	1	1.24443	1	0.77242	1	0.68872	1	0.60019	1	0.60575	1
152	1.31433	1	1.25038	1	0.77311	1	0.68784	1	0.60079	1	0.60468	1
153	1.32263	1	1.26169	1	0.7734	1	0.6888	1	0.6036	1	0.60341	1
154	1.3277	1	1.27374	1	0.7769	1	0.69138	1	0.60372	1	0.60463	1
155	1.33466	1	1.28159	1	0.7808	1	0.69387	1	0.60221	1	0.60758	1
156	1.34079	1	1.28443	1	0.78372	1	0.69567	1	0.60243	1	0.60826	1
157	1.34689	1	1.28872	1	0.78586	1	0.69565	1	0.60325	1	0.60579	1
158	1.35193	1	1.29576	1	0.78814	1	0.69659	1	0.60409	1	0.60589	1
159	1.36127	1	1.30363	1	0.78935	1	0.69724	1	0.60569	1	0.60858	1
160	1.37581	1	1.31302	1	0.79052	1	0.69929	1	0.60584	1	0.61029	1
161	1.38535	1	1.32107	1	0.7931	1	0.70068	1	0.60688	1	0.61062	1
162	1.3903	1	1.33008	1	0.79864	1	0.70297	1	0.60758	1	0.60926	1
163	1.39569	1	1.33669	1	0.80086	1	0.70558	1	0.60802	1	0.60991	1
164	1.40135	1	1.33949	1	0.80001	1	0.70778	1	0.60541	1	0.61056	1
165	1.40782	1	1.3415	1	0.80312	1	0.70789	1	0.60577	1	0.61058	1
166	1.41671	1	1.35101	1	0.80619	1	0.70726	1	0.60791	1	0.61247	1
167	1.42408	1	1.35979	1	0.8078	1	0.71043	1	0.60905	1	0.61231	1
168	1.43382	1	1.36782	1	0.8082	1	0.71166	1	0.60709	1	0.61068	1
169	1.44538	1	1.37478	1	0.81197	1	0.71014	1	0.60717	1	0.61122	1
170	1.45251	1	1.3824	1	0.81456	1	0.7117	1	0.60715	1	0.61129	1
171	1.4598	1	1.38815	1	0.81778	1	0.7141	1	0.60773	1	0.61026	1
172	1.46631	1	1.39328	1	0.82177	1	0.71664	1	0.60926	1	0.61203	1
173	1.47247	1	1.40355	1	0.82259	1	0.71808	1	0.60983	1	0.61493	1
174	1.4818	1	1.4134	1	0.82259	1	0.71882	1	0.61088	1	0.61479	1

FIGURA 2R

11 seg/ciclo	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	122,449	122,449	122,449	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493
175	4,2489	1	4,49417	1	4,15155	1	4,31692	1	4,02679	1	4,03167	1	4,02679	1	4,03167	1	4,02679	1
176	4,24828	1	4,49747	1	4,14416	1	4,31998	1	4,02221	1	4,04172	1	4,02221	1	4,04172	1	4,02221	1
177	4,23833	1	4,49714	1	4,14453	1	4,3099	1	4,02116	1	4,05463	1	4,02116	1	4,05463	1	4,02116	1
178	4,2395	1	4,50287	1	4,14457	1	4,3053	1	4,03782	1	4,0719	1	4,03782	1	4,0719	1	4,03782	1
179	4,25015	1	4,51705	1	4,14572	1	4,31863	1	4,05817	1	4,08482	1	4,05817	1	4,08482	1	4,05817	1
180	4,25939	1	4,51118	1	4,15601	1	4,33897	1	4,07401	1	4,08492	1	4,07401	1	4,08492	1	4,07401	1
181	4,25897	1	4,51251	1	4,16105	1	4,34539	1	4,09501	1	4,10659	1	4,09501	1	4,10659	1	4,09501	1
182	4,24742	1	4,51131	1	4,1468	1	4,33109	1	4,0889	1	4,11183	1	4,0889	1	4,11183	1	4,0889	1
183	4,24703	1	4,50254	1	4,14464	1	4,32459	1	4,08994	1	4,12414	1	4,08994	1	4,12414	1	4,08994	1
184	4,25648	1	4,51774	1	4,16203	1	4,32529	1	4,10542	1	4,1392	1	4,10542	1	4,1392	1	4,10542	1
185	4,26438	1	4,5286	1	4,161	1	4,32561	1	4,11741	1	4,13874	1	4,11741	1	4,13874	1	4,11741	1
186	4,26592	1	4,52535	1	4,15926	1	4,32943	1	4,12043	1	4,14536	1	4,12043	1	4,14536	1	4,12043	1
187	4,25517	1	4,51173	1	4,15556	1	4,33138	1	4,13329	1	4,16878	1	4,13329	1	4,16878	1	4,13329	1
188	4,24635	1	4,49828	1	4,15192	1	4,33284	1	4,14929	1	4,17773	1	4,14929	1	4,17773	1	4,14929	1
189	4,25382	1	4,51026	1	4,15672	1	4,32982	1	4,15879	1	4,17868	1	4,15879	1	4,17868	1	4,15879	1
190	4,26091	1	4,52142	1	4,15764	1	4,32602	1	4,16108	1	4,1861	1	4,16108	1	4,1861	1	4,16108	1
191	4,26267	1	4,51335	1	4,15172	1	4,32965	1	4,16182	1	4,21212	1	4,16182	1	4,21212	1	4,16182	1
192	4,26361	1	4,50613	1	4,15058	1	4,33926	1	4,16824	1	4,21749	1	4,16824	1	4,21749	1	4,16824	1
193	4,25837	1	4,51696	1	4,1522	1	4,34417	1	4,17449	1	4,22722	1	4,17449	1	4,22722	1	4,17449	1
194	4,25545	1	4,532	1	4,16048	1	4,3523	1	4,1762	1	4,23262	1	4,1762	1	4,23262	1	4,1762	1
195	4,26024	1	4,53929	1	4,17221	1	4,3586	1	4,18721	1	4,23271	1	4,18721	1	4,23271	1	4,18721	1
196	4,26054	1	4,52452	1	4,16919	1	4,36446	1	4,20214	1	4,23886	1	4,20214	1	4,23886	1	4,20214	1
197	4,25597	1	4,50871	1	4,17254	1	4,36183	1	4,21332	1	4,24565	1	4,21332	1	4,24565	1	4,21332	1
198	4,26144	1	4,52079	1	4,17422	1	4,3568	1	4,2273	1	4,26663	1	4,2273	1	4,26663	1	4,2273	1
199	4,2715	1	4,53182	1	4,16563	1	4,3631	1	4,24669	1	4,27884	1	4,24669	1	4,27884	1	4,24669	1
200	4,26351	1	4,53764	1	4,15378	1	4,35886	1	4,25881	1	4,2839	1	4,25881	1	4,2839	1	4,25881	1
201	4,26608	1	4,53658	1	4,1571	1	4,35374	1	4,25912	1	4,27736	1	4,25912	1	4,27736	1	4,25912	1
202	4,27245	1	4,52741	1	4,17054	1	4,34936	1	4,25253	1	4,27813	1	4,25253	1	4,27813	1	4,25253	1
203	4,27648	1	4,53423	1	4,1784	1	4,35449	1	4,25159	1	4,30248	1	4,25159	1	4,30248	1	4,25159	1

FIGURA 2T

11 seg/ciclo	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	357	357	357	357	51	51	51	51	51	51	51	51
175	1.49293	1	1.4242	1	0.82434	1	0.71851	1	0.61092	1	0.61325	1
176	1.5009	1	1.43048	1	0.82468	1	0.71744	1	0.60996	1	0.61101	1
177	1.51086	1	1.43336	1	0.82404	1	0.71912	1	0.61019	1	0.61113	1
178	1.52481	1	1.44378	1	0.82547	1	0.72075	1	0.60912	1	0.61285	1
179	1.53378	1	1.45978	1	0.83024	1	0.72441	1	0.60891	1	0.61337	1
180	1.54229	1	1.47082	1	0.83499	1	0.72658	1	0.61114	1	0.61482	1
181	1.55106	1	1.47536	1	0.83639	1	0.72528	1	0.61018	1	0.61626	1
182	1.55714	1	1.47986	1	0.83746	1	0.72388	1	0.60961	1	0.61542	1
183	1.56341	1	1.48364	1	0.84056	1	0.72549	1	0.61145	1	0.61403	1
184	1.57244	1	1.49059	1	0.84435	1	0.72855	1	0.61318	1	0.61444	1
185	1.58007	1	1.49913	1	0.84736	1	0.73048	1	0.61249	1	0.61428	1
186	1.5862	1	1.50782	1	0.84776	1	0.73229	1	0.61273	1	0.61466	1
187	1.59488	1	1.51717	1	0.84805	1	0.73443	1	0.61511	1	0.61604	1
188	1.60328	1	1.52157	1	0.85212	1	0.73688	1	0.6158	1	0.61659	1
189	1.60968	1	1.52842	1	0.85447	1	0.73842	1	0.61616	1	0.61785	1
190	1.61472	1	1.53903	1	0.85518	1	0.73708	1	0.6172	1	0.61945	1
191	1.62253	1	1.54751	1	0.85672	1	0.73957	1	0.61681	1	0.61942	1
192	1.63182	1	1.54977	1	0.85856	1	0.74138	1	0.61674	1	0.61693	1
193	1.63967	1	1.55409	1	0.86162	1	0.74207	1	0.61679	1	0.61519	1
194	1.6499	1	1.56212	1	0.86605	1	0.74208	1	0.6159	1	0.61815	1
195	1.66138	1	1.57087	1	0.86856	1	0.74351	1	0.61566	1	0.62214	1
196	1.66979	1	1.57918	1	0.86994	1	0.747	1	0.61895	1	0.62268	1
197	1.67733	1	1.58973	1	0.87363	1	0.74854	1	0.61697	1	0.62201	1
198	1.68325	1	1.59532	1	0.8759	1	0.7505	1	0.6166	1	0.62352	1
199	1.68831	1	1.59983	1	0.87808	1	0.75022	1	0.61829	1	0.62461	1
200	1.69401	1	1.60585	1	0.88132	1	0.75093	1	0.61959	1	0.6245	1
201	1.70413	1	1.61226	1	0.88363	1	0.75372	1	0.61786	1	0.62194	1
202	1.71831	1	1.62398	1	0.88431	1	0.75695	1	0.61682	1	0.61884	1
203	1.7261	1	1.63743	1	0.88421	1	0.7592	1	0.61843	1	0.61849	1

FIGURA 2U

11 seg/ciclo	Tiniura	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	Cópias mR-21	6,000,000	6,000,000	6,000,000	857,143	857,143	857,143	857,143	857,143	122,449
204	1	4,26565	4,30437	1	4,31866	1	4,31866	1	4,53181	1
205	1	4,27587	4,30441	1	4,32885	1	4,32885	1	4,53858	1
206	1	4,28383	4,30881	1	4,32113	1	4,32113	1	4,52897	1
207	1	4,27638	4,30372	1	4,31259	1	4,31259	1	4,52655	1
208	1	4,28657	4,29813	1	4,31708	1	4,31708	1	4,53365	1
209	1	4,28851	4,30577	1	4,32658	1	4,32658	1	4,54082	1
210	1	4,28836	4,30928	1	4,32687	1	4,32687	1	4,54998	1
211	1	4,27697	4,31297	1	4,32539	1	4,32539	1	4,54758	1
212	1	4,28007	4,31345	1	4,33467	1	4,33467	1	4,54329	1
213	1	4,27415	4,30483	1	4,32871	1	4,32871	1	4,53858	1
214	1	4,27164	4,30548	1	4,31226	1	4,31226	1	4,53223	1
215	1	4,275	4,31273	1	4,31483	1	4,31483	1	4,54089	1
216	1	4,28285	4,30286	1	4,32181	1	4,32181	1	4,54781	1
217	1	4,2877	4,29366	1	4,32185	1	4,32185	1	4,53769	1
218	1	4,29308	4,30307	1	4,32001	1	4,32001	1	4,53371	1
219	1	4,30043	4,31707	1	4,32029	1	4,32029	1	4,54584	1
220	1	4,30004	4,32542	1	4,32903	1	4,32903	1	4,56228	1
221	1	4,2862	4,33244	1	4,33218	1	4,33218	1	4,56565	1
222	1	4,2954	4,32895	1	4,32655	1	4,32655	1	4,55168	1
223	1	4,29119	4,31925	1	4,31717	1	4,31717	1	4,54699	1
224	1	4,29838	4,31955	1	4,31774	1	4,31774	1	4,55526	1
225	1	4,29851	4,31349	1	4,31244	1	4,31244	1	4,54784	1
226	1	4,29056	4,31865	1	4,31085	1	4,31085	1	4,53863	1
227	1	4,28828	4,32508	1	4,32059	1	4,32059	1	4,55463	1
228	1	4,29653	4,31703	1	4,32212	1	4,32212	1	4,55578	1
229	1	4,29232	4,31847	1	4,31748	1	4,31748	1	4,55431	1
230	1	4,296	4,33646	1	4,32669	1	4,32669	1	4,56698	1
231	1	4,29613	4,3442	1	4,33904	1	4,33904	1	4,55879	1
232	1	4,29493	4,33099	1	4,33999	1	4,33999	1	4,55377	1

FIGURA 2V

[illegible]**FIGURA 2W**

[illegible]**FIGURA 2X**

11º ciclo	Cópia	Tintura									
		Amarela	FAM	Amarela	FAM						
233	6.000,000	1	4.2978	6.000,000	857,143	1	4.34227	857,143	1	4.5643	122,449
234	1	1	4.31717	1	4.34	1	4.34775	1	4.56222	1	1
235	1	1	4.31478	1	4.3334	1	4.33716	1	4.54722	1	1
236	1	1	4.30626	1	4.32758	1	4.33317	1	4.55795	1	1
237	1	1	4.30733	1	4.32911	1	4.33172	1	4.57654	1	1
238	1	1	4.29242	1	4.32398	1	4.3228	1	4.57816	1	1
239	1	1	4.29754	1	4.32544	1	4.32608	1	4.56504	1	1
240	1	1	4.31138	1	4.33784	1	4.33126	1	4.55598	1	1
241	1	1	4.3037	1	4.33282	1	4.33335	1	4.55815	1	1
242	1	1	4.29936	1	4.32704	1	4.34147	1	4.56692	1	1
243	1	1	4.30201	1	4.33437	1	4.34083	1	4.56298	1	1
244	1	1	4.31178	1	4.3494	1	4.32838	1	4.54602	1	1
245	1	1	4.31881	1	4.35958	1	4.32693	1	4.54429	1	1
246	1	1	4.30406	1	4.34896	1	4.33154	1	4.54919	1	1
247	1	1	4.29569	1	4.34411	1	4.3374	1	4.5538	1	1
248	1	1	4.29783	1	4.34353	1	4.33214	1	4.555	1	1
249	1	1	4.29888	1	4.34013	1	4.32574	1	4.55561	1	1

FIGURA 2Y

11 seg/ciclo	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
Ciclos	122,449	122,449	122,449	122,449	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	17,493	2,499	2,499	2,499	2,499	2,499	357
233	4.32603	1	4.58123	1	4.20681	1	4.39946	1	4.38778	1	4.38778	1	4.38778	1	4.45334	1
234	4.31556	1	4.58127	1	4.21923	1	4.40046	1	4.39426	1	4.39426	1	4.39426	1	4.44499	1
235	4.30857	1	4.57372	1	4.21421	1	4.3941	1	4.39323	1	4.39323	1	4.39323	1	4.44371	1
236	4.29807	1	4.56064	1	4.20687	1	4.3878	1	4.39004	1	4.39004	1	4.39004	1	4.45043	1
237	4.29179	1	4.55072	1	4.19046	1	4.38218	1	4.39208	1	4.39208	1	4.39208	1	4.45385	1
238	4.30727	1	4.54521	1	4.19232	1	4.38629	1	4.39262	1	4.39262	1	4.39262	1	4.45486	1
239	4.31984	1	4.54824	1	4.21387	1	4.40832	1	4.40405	1	4.40405	1	4.40405	1	4.46738	1
240	4.32105	1	4.56831	1	4.22198	1	4.4161	1	4.40561	1	4.40561	1	4.40561	1	4.4706	1
241	4.31509	1	4.57942	1	4.21582	1	4.41275	1	4.39504	1	4.39504	1	4.39504	1	4.46508	1
242	4.31098	1	4.57682	1	4.19089	1	4.39827	1	4.40174	1	4.40174	1	4.40174	1	4.45038	1
243	4.3054	1	4.56146	1	4.18473	1	4.39834	1	4.41534	1	4.41534	1	4.41534	1	4.45595	1
244	4.28737	1	4.55448	1	4.19215	1	4.40443	1	4.42826	1	4.42826	1	4.42826	1	4.4799	1
245	4.28166	1	4.559	1	4.18585	1	4.39921	1	4.41395	1	4.41395	1	4.41395	1	4.46989	1
246	4.29166	1	4.57058	1	4.21079	1	4.40676	1	4.40489	1	4.40489	1	4.40489	1	4.46042	1
247	4.29052	1	4.58028	1	4.22416	1	4.411	1	4.41269	1	4.41269	1	4.41269	1	4.46864	1
248	4.28849	1	4.57356	1	4.2261	1	4.42385	1	4.4132	1	4.4132	1	4.4132	1	4.4758	1
249	4.29202	1	4.5675	1	4.24738	1	4.44126	1	4.41617	1	4.41617	1	4.41617	1	4.48113	1

FIGURA 2Z

11º período Ciclos	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela	FAM	Amarela
	357	357	357	357	51	51	51	51	51	51	51	51
233	1.98439	1	1.87829	1	0.95918	1	0.79882	1	0.62988	1	0.62985	-
234	1.98296	1	1.88711	1	0.96385	1	0.80155	1	0.63123	1	0.63048	1
235	1.99851	1	1.90434	1	0.97221	1	0.80397	1	0.63242	1	0.63354	1
236	2.00494	1	1.91381	1	0.9762	1	0.80604	1	0.63169	1	0.63526	1
237	2.01403	1	1.91321	1	0.97611	1	0.80734	1	0.63084	1	0.63516	1
238	2.02374	1	1.9245	1	0.97427	1	0.80787	1	0.6317	1	0.63419	1
239	2.03647	1	1.93391	1	0.97728	1	0.81132	1	0.63274	1	0.63501	1
240	2.03863	1	1.92926	1	0.98274	1	0.81544	1	0.63196	1	0.63538	1
241	2.03872	1	1.93514	1	0.98491	1	0.81696	1	0.63087	1	0.63628	1
242	2.04446	1	1.94931	1	0.98501	1	0.81786	1	0.63164	1	0.63744	1
243	2.05797	1	1.96126	1	0.98495	1	0.81893	1	0.63225	1	0.63887	1
244	2.0761	1	1.97639	1	0.99045	1	0.82044	1	0.6312	1	0.63587	1
245	2.08716	1	1.98432	1	0.98845	1	0.82436	1	0.62974	1	0.63621	1
246	2.09158	1	1.99037	1	1.0006	1	0.82628	1	0.63059	1	0.63648	1
247	2.09789	1	2.0018	1	1.00119	1	0.82595	1	0.63109	1	0.63537	1
248	2.10024	1	2.00613	1	1.00401	1	0.82392	1	0.6315	1	0.63511	1
249	2.10027	1	2.00784	1	1.00742	1	0.82143	1	0.63305	1	0.63476	1

FIGURA 2AA

11 seg/ciclo Ciclos	Tintura ID da amostra	Amarela , B4	FAM B4	Amarela E4	FAM E4	Amarela F4	FAM F4
1		1	0.67361	1	0.57616	1	0.55144
2		1	0.71131	1	0.57647	1	0.55251
3		1	0.75773	1	0.57745	1	0.55435
4		1	0.81613	1	0.57884	1	0.55486
5		1	0.87959	1	0.58125	1	0.55512
6		1	0.95031	1	0.58298	1	0.55698
7		1	1.03493	1	0.58635	1	0.55733
8		1	1.12629	1	0.589	1	0.55717
9		1	1.22614	1	0.59175	1	0.55886
10		1	1.33368	1	0.59568	1	0.56066
11		1	1.445	1	0.60033	1	0.56161
12		1	1.56074	1	0.60567	1	0.56259
13		1	1.68397	1	0.60991	1	0.56409
14		1	1.81094	1	0.616	1	0.56468
15		1	1.94719	1	0.62465	1	0.56589
16		1	2.08576	1	0.63261	1	0.56816
17		1	2.21686	1	0.63849	1	0.56961
18		1	2.34378	1	0.6445	1	0.56924
19		1	2.47159	1	0.65264	1	0.56976
20		1	2.60926	1	0.66041	1	0.57161
21		1	2.73963	1	0.66779	1	0.57127
22		1	2.86099	1	0.67692	1	0.57135
23		1	2.9798	1	0.68779	1	0.57481
24		1	3.0996	1	0.69659	1	0.57732
25		1	3.2152	1	0.70531	1	0.57875
26		1	3.30805	1	0.71485	1	0.57901
27		1	3.39359	1	0.72371	1	0.57937
28		1	3.48924	1	0.73427	1	0.58159
29		1	3.57517	1	0.74827	1	0.58501
30		1	3.64876	1	0.76212	1	0.58768
31		1	3.71428	1	0.77203	1	0.58864
32		1	3.76723	1	0.78222	1	0.59011
33		1	3.81417	1	0.79475	1	0.59165
34		1	3.85265	1	0.80886	1	0.59438
35		1	3.88948	1	0.82391	1	0.59639
36		1	3.91862	1	0.8373	1	0.5972
37		1	3.93257	1	0.85121	1	0.60006
38		1	3.94875	1	0.86603	1	0.60395
39		1	3.97076	1	0.88262	1	0.60728
40		1	3.9946	1	0.89783	1	0.60972
41		1	4.00302	1	0.91006	1	0.61204
42		1	4.0008	1	0.92403	1	0.61468
43		1	4.00785	1	0.93773	1	0.61788
44		1	4.0262	1	0.95097	1	0.62237

FIGURA 3A

45	1	4.03839	1	0.96892	1	0.62605
46	1	4.02815	1	0.98894	1	0.62706
47	1	4.0348	1	1.00403	1	0.62777
48	1	4.05295	1	1.01895	1	0.62967
49	1	4.05338	1	1.03649	1	0.6337
50	1	4.05715	1	1.05293	1	0.63839
51	1	4.06038	1	1.06889	1	0.64018
52	1	4.05996	1	1.09042	1	0.64383
53	1	4.0682	1	1.11042	1	0.6459
54	1	4.08292	1	1.12705	1	0.64608
55	1	4.09201	1	1.14758	1	0.64842
56	1	4.08885	1	1.16738	1	0.65229
57	1	4.07652	1	1.18332	1	0.65741
58	1	4.08187	1	1.19985	1	0.66005
59	1	4.10191	1	1.21912	1	0.66221
60	1	4.10429	1	1.23809	1	0.66774
61	1	4.10177	1	1.25571	1	0.67185
62	1	4.10744	1	1.2775	1	0.67425
63	1	4.10737	1	1.30025	1	0.67787
64	1	4.10903	1	1.31914	1	0.68084
65	1	4.11302	1	1.33974	1	0.6829
66	1	4.12026	1	1.36169	1	0.68496
67	1	4.1286	1	1.38345	1	0.68966
68	1	4.12319	1	1.40755	1	0.695
69	1	4.13087	1	1.43014	1	0.69754
70	1	4.1389	1	1.45243	1	0.7019
71	1	4.1295	1	1.47618	1	0.70718
72	1	4.12836	1	1.49421	1	0.71046
73	1	4.13992	1	1.51366	1	0.71387
74	1	4.14581	1	1.53836	1	0.71751
75	1	4.13756	1	1.55962	1	0.7204
76	1	4.13047	1	1.57745	1	0.72293
77	1	4.12749	1	1.60051	1	0.72644
78	1	4.12945	1	1.62319	1	0.73121
79	1	4.13884	1	1.6482	1	0.73483
80	1	4.14083	1	1.67739	1	0.73862
81	1	4.14008	1	1.69866	1	0.74372
82	1	4.13308	1	1.71884	1	0.7473
83	1	4.13544	1	1.74601	1	0.75165
84	1	4.15471	1	1.77062	1	0.75967
85	1	4.15759	1	1.79175	1	0.76556
86	1	4.15902	1	1.81458	1	0.7684
87	1	4.15944	1	1.83858	1	0.7696
88	1	4.15605	1	1.8568	1	0.773
89	1	4.16777	1	1.87505	1	0.77773
90	1	4.17305	1	1.89948	1	0.78429

FIGURA 3B

91	1	4.16702	1	1.9211	1	0.78834
92	1	4.16469	1	1.94285	1	0.78889
93	1	4.16554	1	1.96578	1	0.79499
94	1	4.15972	1	1.99366	1	0.8023
95	1	4.15657	1	2.01909	1	0.80694
96	1	4.15879	1	2.03992	1	0.80885
97	1	4.1558	1	2.06315	1	0.81289
98	1	4.15104	1	2.09035	1	0.81868
99	1	4.15432	1	2.11815	1	0.82527
100	1	4.17349	1	2.14378	1	0.83068
101	1	4.18373	1	2.17261	1	0.83376
102	1	4.18165	1	2.19543	1	0.83701
103	1	4.18201	1	2.2126	1	0.8425
104	1	4.17581	1	2.24382	1	0.85
105	1	4.1783	1	2.27551	1	0.85489
106	1	4.18628	1	2.28989	1	0.85659
107	1	4.17615	1	2.30788	1	0.85926
108	1	4.16739	1	2.34088	1	0.86322
109	1	4.16923	1	2.3732	1	0.86922
110	1	4.1892	1	2.39572	1	0.87594
111	1	4.18269	1	2.41571	1	0.88099
112	1	4.19399	1	2.43884	1	0.88534
113	1	4.18776	1	2.46326	1	0.88793
114	1	4.18377	1	2.48709	1	0.89252
115	1	4.18482	1	2.50891	1	0.8998
116	1	4.18845	1	2.53097	1	0.90455
117	1	4.19284	1	2.54161	1	0.91042
118	1	4.19619	1	2.55532	1	0.91618
119	1	4.19677	1	2.59321	1	0.92091
120	1	4.19429	1	2.62623	1	0.92702
121	1	4.19869	1	2.65187	1	0.93273
122	1	4.19399	1	2.67664	1	0.93838
123	1	4.18838	1	2.70187	1	0.94519
124	1	4.18917	1	2.72756	1	0.94997
125	1	4.19608	1	2.7411	1	0.95411
126	1	4.19771	1	2.75736	1	0.95985
127	1	4.19316	1	2.77843	1	0.96432
128	1	4.20536	1	2.79338	1	0.96892
129	1	4.20173	1	2.823	1	0.97452
130	1	4.20323	1	2.85736	1	0.98124
131	1	4.2185	1	2.88841	1	0.9881
132	1	4.21941	1	2.91869	1	0.99479
133	1	4.21648	1	2.92968	1	0.99778
134	1	4.21806	1	2.93435	1	1.00043
135	1	4.21944	1	2.95666	1	1.0059
136	1	4.21889	1	2.98606	1	1.01177

FIGURA 3C

137	1	4.20985	1	3.01147	1	1.01779
138	1	4.19289	1	3.0308	1	1.02248
139	1	4.19548	1	3.04981	1	1.0275
140	1	4.20539	1	3.06797	1	1.03328
141	1	4.20421	1	3.09581	1	1.04073
142	1	4.21046	1	3.11728	1	1.04577
143	1	4.22116	1	3.13373	1	1.04954
144	1	4.23407	1	3.15855	1	1.05792
145	1	4.24914	1	3.18158	1	1.06848
146	1	4.25117	1	3.20103	1	1.07652
147	1	4.23734	1	3.21617	1	1.07915
148	1	4.23347	1	3.23841	1	1.08182
149	1	4.23995	1	3.26295	1	1.08697
150	1	4.24019	1	3.29002	1	1.09346
151	1	4.23165	1	3.3089	1	1.09882
152	1	4.21871	1	3.31904	1	1.1045
153	1	4.21799	1	3.3462	1	1.11243
154	1	4.22565	1	3.37227	1	1.12045
155	1	4.23229	1	3.38523	1	1.12471
156	1	4.22757	1	3.39694	1	1.1266
157	1	4.22572	1	3.40393	1	1.12968
158	1	4.23628	1	3.42363	1	1.1354
159	1	4.24145	1	3.45872	1	1.14333
160	1	4.2396	1	3.4811	1	1.14958
161	1	4.23665	1	3.49983	1	1.15427
162	1	4.23538	1	3.52206	1	1.16057
163	1	4.24142	1	3.54072	1	1.16758
164	1	4.25054	1	3.56294	1	1.17133
165	1	4.26213	1	3.58169	1	1.1756
166	1	4.27337	1	3.59494	1	1.18177
167	1	4.26477	1	3.61482	1	1.19045
168	1	4.24743	1	3.62601	1	1.19872
169	1	4.25519	1	3.64228	1	1.20359
170	1	4.2699	1	3.66296	1	1.20804
171	1	4.25466	1	3.67647	1	1.2136
172	1	4.2419	1	3.68481	1	1.21978
173	1	4.24674	1	3.68609	1	1.22771
174	1	4.25284	1	3.69734	1	1.23682
175	1	4.25664	1	3.71064	1	1.2415
176	1	4.25233	1	3.72467	1	1.24388
177	1	4.24443	1	3.75001	1	1.25054
178	1	4.25247	1	3.76766	1	1.2602
179	1	4.26873	1	3.78427	1	1.26904
180	1	4.26658	1	3.80953	1	1.27665
181	1	4.28405	1	3.82066	1	1.28347
182	1	4.27114	1	3.82842	1	1.28559

FIGURA 3D

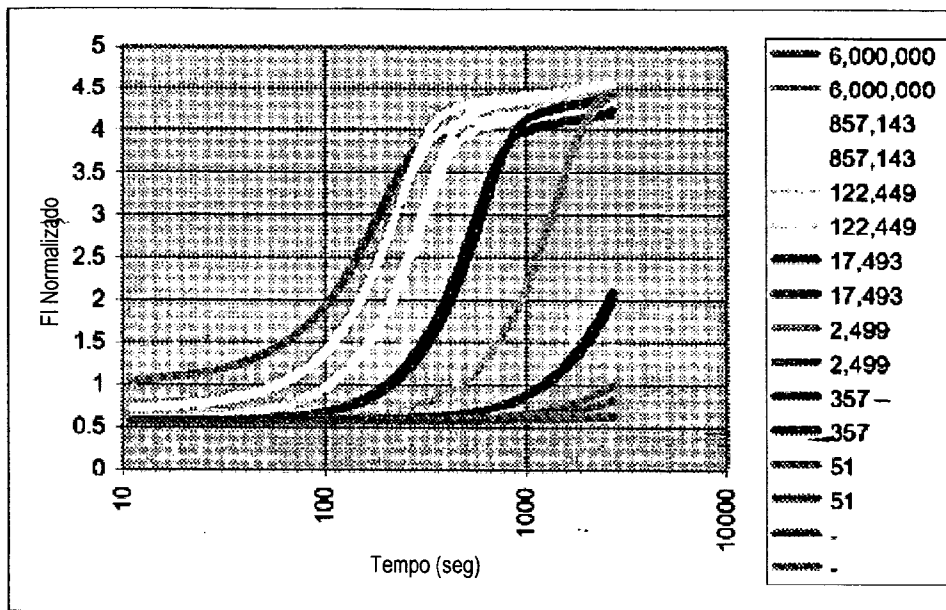
183	1	4.27446	1	3.84241	1	1.28661
184	1	4.27766	1	3.8573	1	1.29575
185	1	4.28362	1	3.86864	1	1.30658
188	1	4.28202	1	3.87779	1	1.31091
187	1	4.2808	1	3.88478	1	1.31633
188	1	4.28126	1	3.89007	1	1.32136
189	1	4.28047	1	3.90399	1	1.32393
190	1	4.27292	1	3.91789	1	1.33215
191	1	4.26901	1	3.92789	1	1.3393
192	1	4.2748	1	3.93246	1	1.34451
193	1	4.27362	1	3.93722	1	1.35181
194	1	4.27423	1	3.94874	1	1.35891
195	1	4.28668	1	3.95239	1	1.36416
196	1	4.29258	1	3.96371	1	1.36949
197	1	4.28383	1	3.97271	1	1.37713
198	1	4.27548	1	3.96898	1	1.38451
199	1	4.276	1	3.98428	1	1.39416
200	1	4.29041	1	4.01159	1	1.40052
201	1	4.30335	1	4.02195	1	1.40253
202	1	4.28463	1	4.01507	1	1.41083
203	1	4.28124	1	4.02058	1	1.42195
204	1	4.28798	1	4.05108	1	1.42708
205	1	4.30143	1	4.06409	1	1.42913
206	1	4.3008	1	4.05433	1	1.43359
207	1	4.29331	1	4.06032	1	1.43839
208	1	4.29582	1	4.07406	1	1.4443
209	1	4.29818	1	4.07741	1	1.45394
210	1	4.29188	1	4.07906	1	1.46074
211	1	4.29389	1	4.084	1	1.46552
212	1	4.2957	1	4.09086	1	1.47165
213	1	4.28993	1	4.0972	1	1.47883
214	1	4.27982	1	4.10959	1	1.48925
215	1	4.27244	1	4.12875	1	1.49801
216	1	4.27833	1	4.13639	1	1.50807
217	1	4.27617	1	4.14503	1	1.51373
218	1	4.27952	1	4.15647	1	1.51708
219	1	4.30151	1	4.15854	1	1.52261
220	1	4.31215	1	4.16027	1	1.52886
221	1	4.30462	1	4.16499	1	1.53526
222	1	4.29048	1	4.17562	1	1.54204
223	1	4.2875	1	4.18516	1	1.54627
224	1	4.29959	1	4.18357	1	1.5527
225	1	4.29378	1	4.17769	1	1.56559
226	1	4.28759	1	4.18222	1	1.5722
227	1	4.30002	1	4.18323	1	1.57817
228	1	4.30415	1	4.18694	1	1.58691

FIGURA 3E

229	1	4.29675	1	4.20712	1	1.59371
230	1	4.29548	1	4.20678	1	1.59948
231	1	4.29977	1	4.20982	1	1.6056
232	1	4.30178	1	4.22917	1	1.60876
233	1	4.31006	1	4.22986	1	1.6124
234	1	4.31429	1	4.21919	1	1.62265
235	1	4.30346	1	4.22099	1	1.62897
236	1	4.30077	1	4.2239	1	1.6342
237	1	4.30515	1	4.22092	1	1.64196
238	1	4.29609	1	4.23272	1	1.6479
239	1	4.29066	1	4.25009	1	1.65343
240	1	4.30228	1	4.24933	1	1.65461
241	1	4.30732	1	4.25175	1	1.65727
242	1	4.30976	1	4.25035	1	1.6668
243	1	4.30882	1	4.25584	1	1.67525
244	1	4.2969	1	4.27095	1	1.68305
245	1	4.29528	1	4.26593	1	1.69235
246	1	4.29859	1	4.26823	1	1.69885
247	1	4.31047	1	4.26868	1	1.70348
248	1	4.32359	1	4.26994	1	1.71228
249	1	4.32982	1	4.27345	1	1.72483

FIGURA 3F

A. Curvas de Controle Padrão



B. Curvas Experimentais

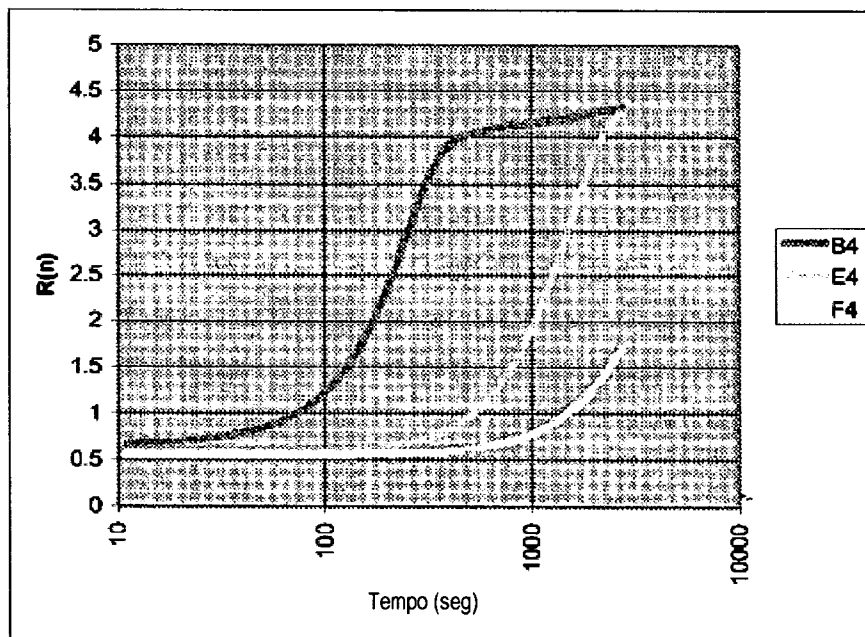
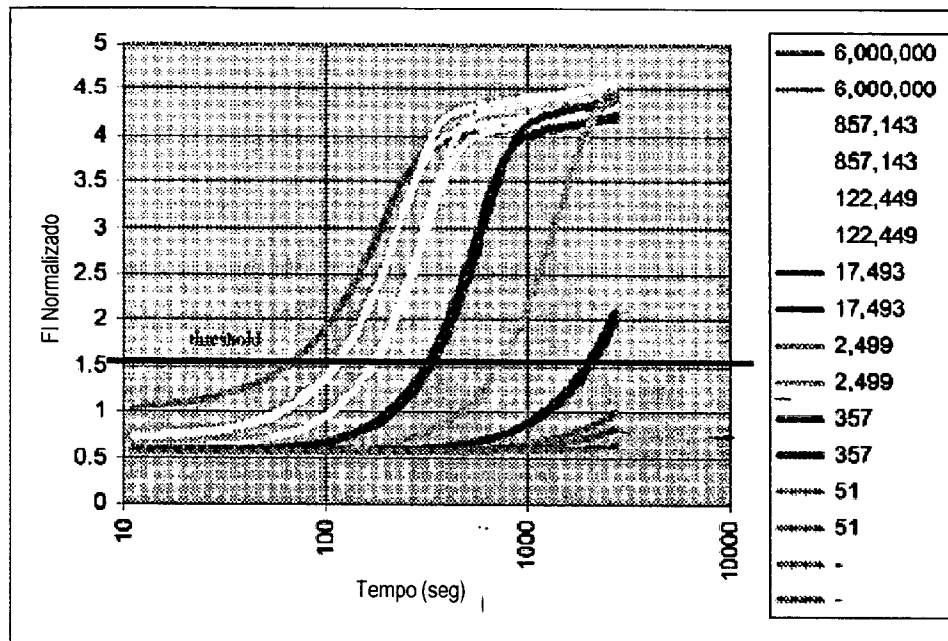


FIGURA 4

A. Curvas de Controle Padrão com Limiar Adicionado



B. Curvas Experimentais com Limiar Adicionado

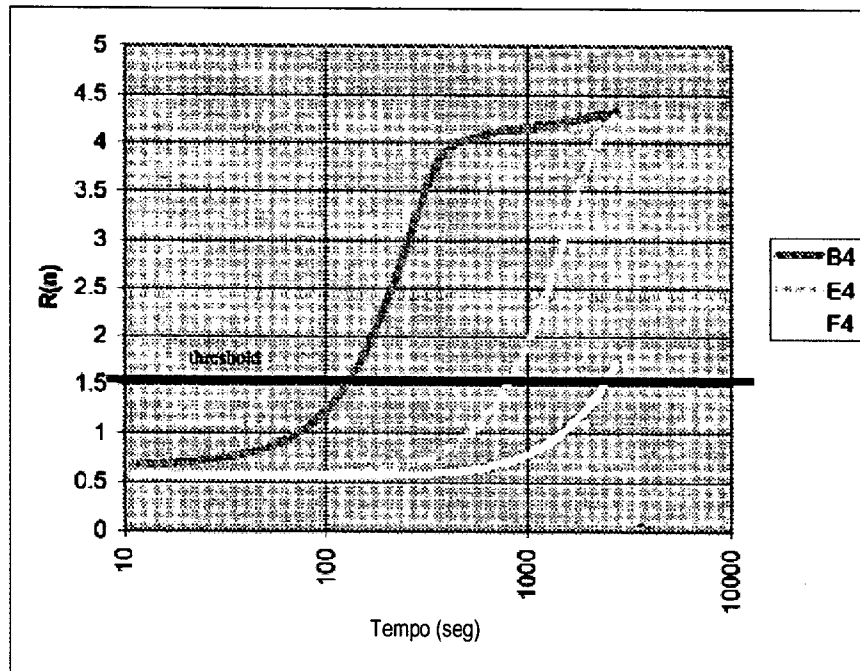


FIGURA 5

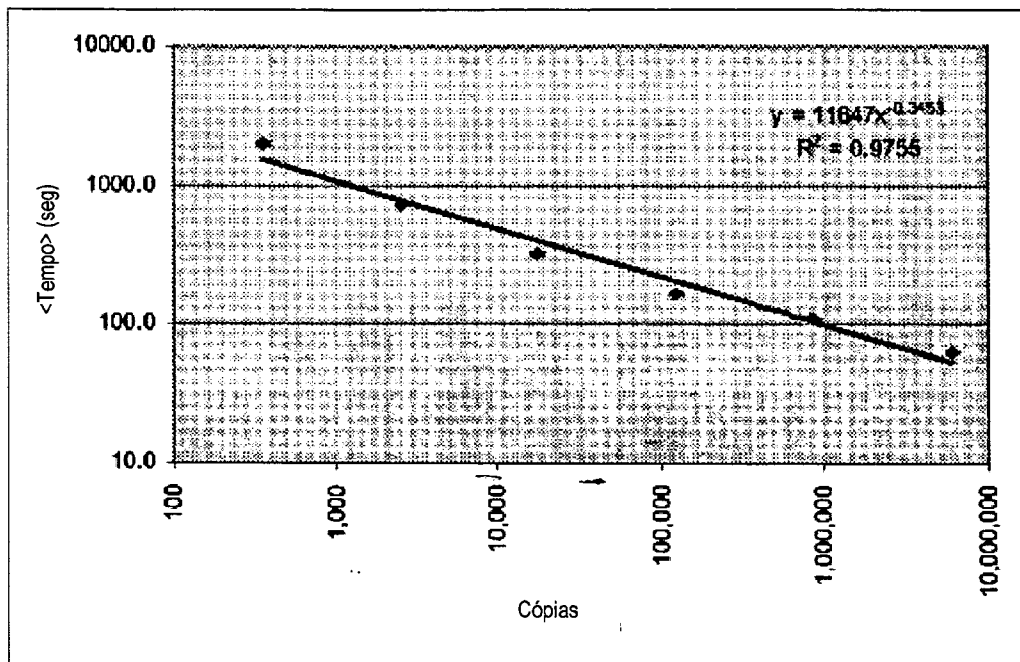


FIGURA 6

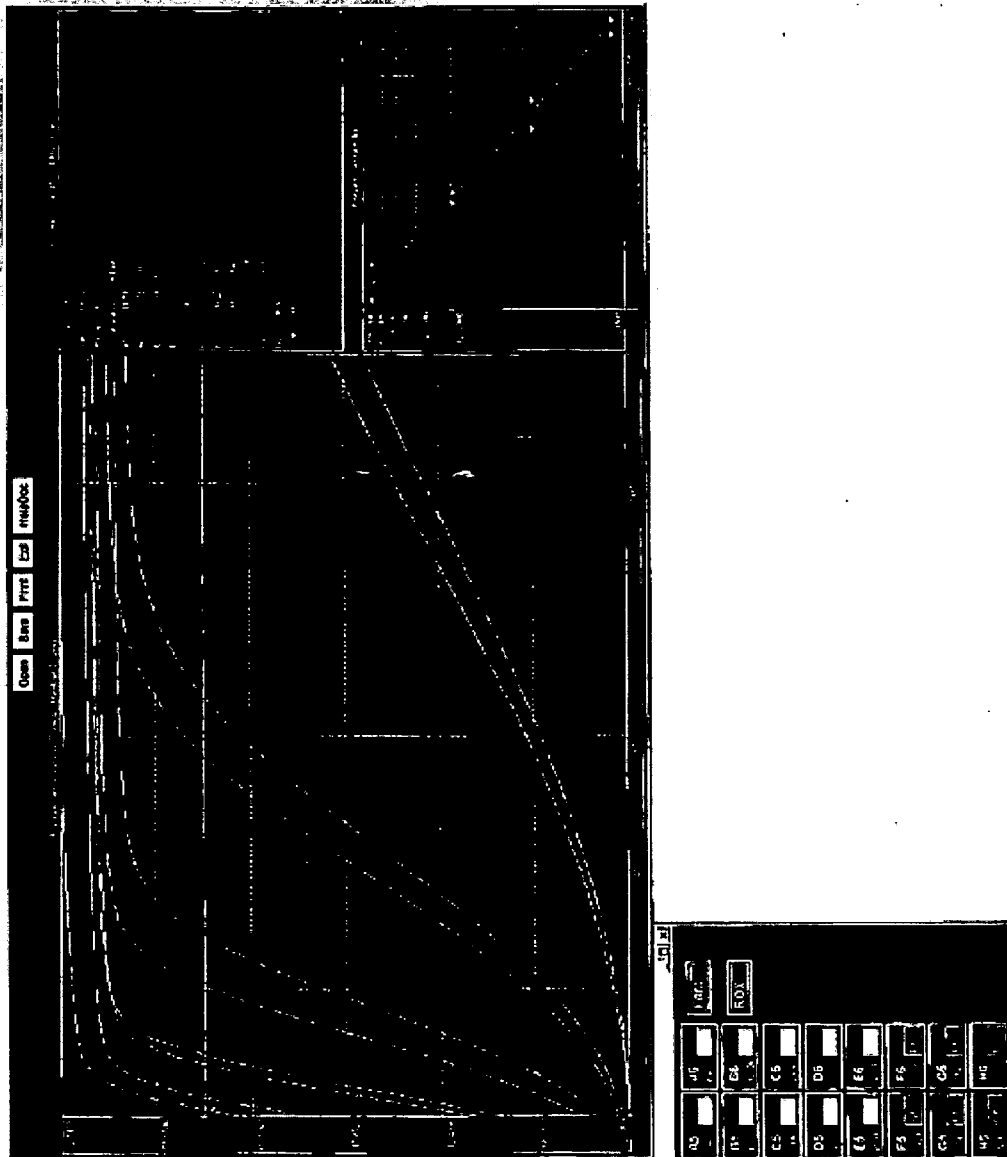


FIGURA 7



FIGURA 8

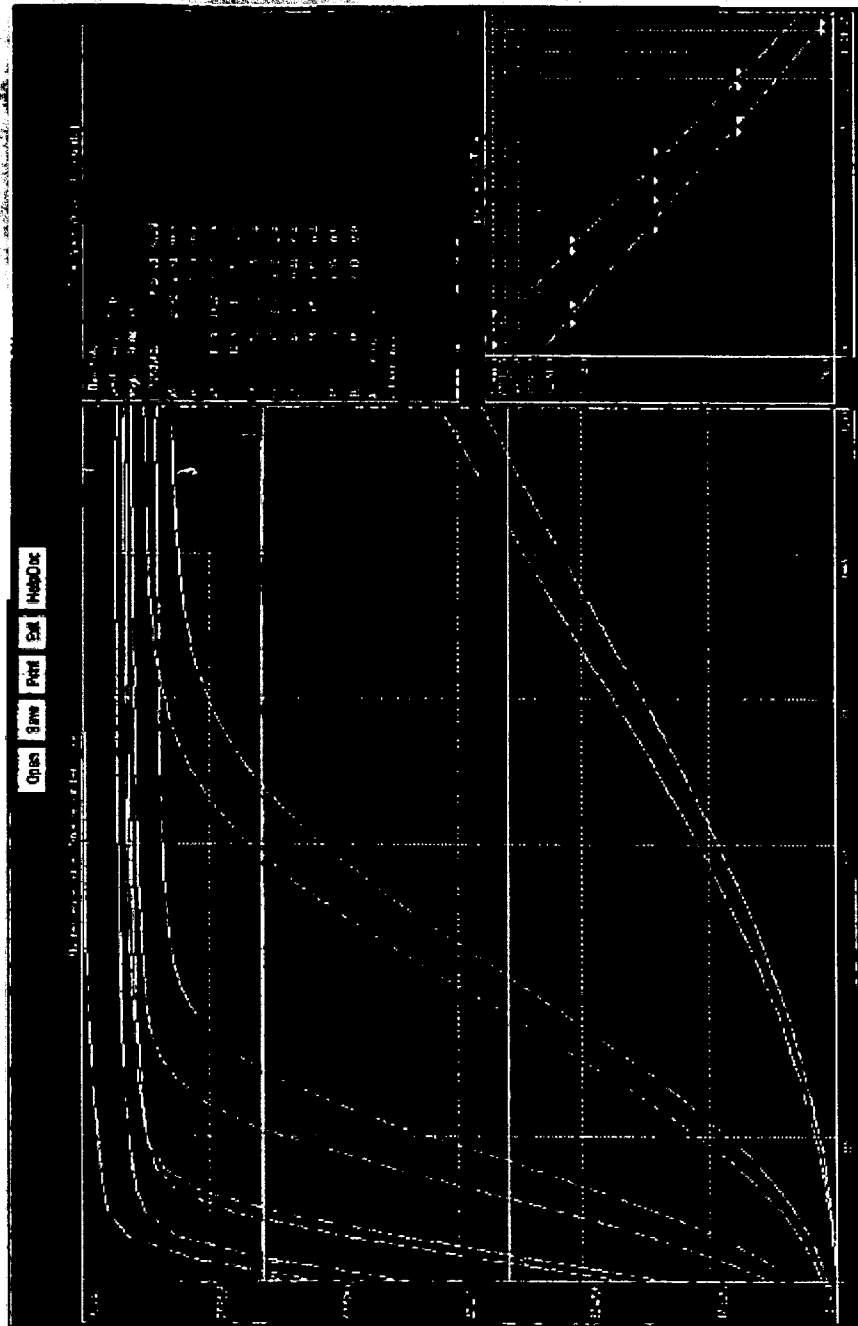


FIGURA 9

FIGURA 10





RESUMO

"MÉTODO E APLICAÇÕES PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALVO"

5 A presente invenção fornece métodos e aplicativos de software para quantificar um alvo em uma amostra experimental, pela coleta e processamento de dados de sinal iniciais da amostra experimental e pelo menos duas amostras de controle padrão contendo os números de cópia do alvo conhecidos. A este respeito, a presente invenção permite a quantificação do número de cópia do alvo na amostra experimental.