



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Ronaldo Dionísio da Silva

**Aplicações Metabonômicas usando Ressonância
Magnética Nuclear de ^1H :**

**Diagnóstico Não-Invasivo de Câncer de Próstata e Urológico &
Classificação de Azeite de Oliva Extra Virgem de Produção
Orgânica**

Recife

2017

Ronaldo Dionísio da Silva

**Aplicações Metabonômicas usando Ressonância
Magnética Nuclear de ^1H :**

**Diagnóstico Não-Invasivo de Câncer de Próstata e Urológico &
Classificação de Azeite de Oliva Extra Virgem de Produção
Orgânica**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química
da UFPE como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

Recife

2017

Catálogo na fonte
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno CRB 4-1758

- S586a Silva, Ronaldo Dionísio da.
Aplicações metabonômicas usando ressonância magnética nuclear de ^1H : diagnóstico não-invasivo de câncer de próstata e urológico & classificação de oliva extra virgem de produção orgânica / Ronaldo Dionísio da Silva . – 2017.
140 f.: fig., tab.
- Orientador: Ricardo Oliveira da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química fundamental, Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexo.
1. Química. 2. Química analítica.. I. Silva, Ricardo Oliveira. (Orientador).
II. Título.
- 543 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2017-26

RONALDO DIONÍSIO DA SILVA

***APLICAÇÕES METABONÔMICAS USANDO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE
¹H: DIAGNÓSTICO NÃO-INVASIVO DE CÂNCER DE PRÓSTATA E UROLÓGICO &
CLASSIFICAÇÃO DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM DE PRODUÇÃO ORGÂNICA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 23/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ricardo Oliveira da Silva (Orientador)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Giovannia Araújo de Lima Pereira

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. João Bosco Paraíso da Silva

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Flavia Cristina Morone Pinto

Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Sebastião José de Melo

Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

“De uma coisa podemos ter certeza: de nada adianta querer apressar as coisas; tudo vem ao seu tempo, dentro do prazo que lhe foi previsto. Mas a natureza humana não é muito paciente. Temos pressa em tudo e aí acontecem os atropelos do destino, aquela situação que você mesmo provoca, por pura ansiedade de não aguardar o tempo certo. Mas alguém poderia dizer: Qual é esse tempo certo?...”

Trecho do poema ***Tempo Certo***, **Paulo Coelho**,

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pela oportunidade de estar vivo e de permitir continuar vivendo e poder realizar todos os meus sonhos e desejos por um bom tempo.

Agradeço aos meus familiares, pela paciência e confiança depositada por toda minha vida acadêmica, profissional e pessoal. Em especial, à minha esposa, Janine Ferreira, pela atenção, contribuição, paciência, companheirismo e amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva, pela dedicação, orientação, paciência, cobrança, puxões de orelha e acima de tudo, confiança em meu trabalho para início e finalização deste projeto de vida.

Aos amigos do DQF, que contribuíram de alguma forma e da sua maneira, para que eu pudesse concluir mais uma etapa de minha trajetória acadêmica, onde não citarei nomes para não ser injusto com nenhum deles.

Aos amigos do GMEQ/LPRMN, pelo companheirismo, ajuda e momentos inesquecíveis, durante o período de execução deste trabalho. Em especial aos companheiros de laboratório Carlos Jonnatan, Tassia Brena, Liana Gouveia, Joana Eliza, Tiago Arruda, Rafaela Nathália, Talita Pereira, pela grande contribuição, companheirismo e auxílio na interpretação e confirmação de alguns dados obtidos neste trabalho.

Aos professores do DQF pela contribuição em diferentes aspectos para a conclusão desta etapa em minha formação acadêmica.

Aos funcionários do DQF, em especial, Maurílio Sebastião e Patrícia Santa Rosa, pela ajuda, dedicação e competência em executar suas atividades plenas.

Aos professores, Dr. Paulo Renato Alves Firmino, Dra. Maria Fernanda Pimentel e Dra. Claudete Fernandes Pereira, pela cooperação e ajuda para execução deste trabalho.

Aos funcionários da Central Analítica, em especial, Eliete Barros, pela ajuda, paciência e treinamento durante as medidas realizadas nos equipamentos de RMN utilizados neste trabalho.

Ao Hospital das Clínicas e ao departamento de Cirurgia Geral, na figura do Prof. Dr. Salvador Villar, do Dr. Leslie Clifford pela colaboração e fornecimento das amostras de soro e urina utilizadas neste trabalho.

Aos amigos do IFPE - Campus Vitória de Santo Antão, pelo companheirismo, paciência e compreensão durante este período de formação bastante importante em minha vida profissional.

Ao CNPq pelo fomento da bolsa de doutorado. A FACEPE, PRONEX e CAPES pelo aporte financeiro.

Resumo

No presente estudo, foram construídos modelos metabonômicos baseados nos espectros de RMN para (1) o diagnóstico não-invasivo de câncer de próstata (CP), e câncer urológico (bexiga ou rim) [CB/CR]; e (2) para estudo em química dos alimentos – para discriminar amostras de azeite de oliva extra virgem frente ao seu modo de produção (Produção orgânica ou convencional). Para os estudos clínicos, foram utilizadas amostras de soro e urina. Dois modelos utilizando o formalismo LDA foram construídos para diagnosticar CP: primeiro, utilizando vinte e três amostras de soro – onze voluntários saudáveis (S) e doze de pacientes diagnosticados com CP, e o segundo modelo foram usadas dezoito amostras de urina – oito voluntários saudáveis (S) e dez diagnosticados com CP. Para diagnóstico de câncer urológico, foram utilizadas dezoito amostras de urina – oito voluntários saudáveis (S) e dez diagnosticados com câncer de bexiga ou rim (CB/CR). O modelo metabonômico CP *versus* S, usando amostras de soro, foi construído usando quatro variáveis (*bins*) discriminantes, foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$), com valores preditivos, positivo e negativo (VPP e VPN) iguais a 91,7% e 100%, sensibilidade de 100% e especificidade de 91,7%, respectivamente. As variáveis discriminantes foram atribuídas às estruturas lipídicas (VLDL e LDL), ao grupo citrato e a L-histidina. O modelo CP *versus* S, utilizando amostras de urina e usando três variáveis discriminantes foi construído, obtendo valores de VPP e o VPN iguais a 92,3% e 100%, respectivamente. Enquanto os valores de sensibilidade e especificidade foram iguais a 100% e 87,5%, respectivamente. As variáveis discriminantes foram atribuídas a sacarídeos e a trigonelina. O modelo para diagnóstico de câncer urológico (CB/CR) foi construído usando três variáveis, resultando em 100% de classificações corretas. As variáveis discriminantes foram atribuídas a sacarídeos, trigonelina e ao grupo hipurato. Para o estudo com amostras de azeite extra virgem, foram utilizadas quarenta amostras, sendo dezesseis amostras de azeite de produção orgânica (O) e vinte e quatro amostras de produção convencional. Os modelos metabonômicos foram construídos usando o formalismo LDA, utilizando cinco variáveis discriminantes, obtendo 100% de classificação correta para as amostras orgânicas e 91,7% para amostras de azeite convencional. O poder de predição total do modelo foi de 95,0%. As variáveis discriminantes foram atribuídas aos ácidos linoléico/linolênico e ao glicerol. A estratégia metabonômica mostrou-se promissora ferramenta analítica para classificação de amostras de azeite de oliva extra virgem frente ao seu modo de produção. Todos os modelos construídos foram validados usando validação cruzada (LOOCV)

Palavras-chave: Metabolômica. RMN de ^1H . Análise multivariada. Próstata. Bexiga. Rim. Produção orgânica.

Abstract

Herein, metabonomics models were built from NMR spectral data for (1) non-invasive clinical diagnosis of prostate cancer (CP) and urological cancer (bladder or kidney); and (2) for food chemistry study – to distinguish samples of extra virgin olive oil (EVOO) from its production mode (organic agriculture or conventional one). For the clinical studies, we used serum and urine samples. Two models using LDA formalism were constructed to CP diagnosis: first, using twenty-three serum samples, eleven from healthy volunteers (S) and twelve from patients; the second model used eighteen urine samples – eight healthy volunteers (S) and ten from patients. For urological cancer diagnosis (CB/CR), eighteen urine samples were used – eight healthy volunteers (S) and ten diagnosed with bladder or kidney cancer. CP *versus* S metabonomics model, using serum samples and four discriminant variables (bins), was statistical significance ($p < 0.001$), with positive and negative predictive values (PPV and NPV) equals to 91,7% and 100%, sensitivity equal to 100% and specificity equal to 91.7%, respectively. The discriminant variables were attributed to lipidic structures (VLDL and LDL), citrate and L-histidine. CP *versus* S model, using urine samples and three discriminant variables, returned PPV and NPV equal to 92.3% and 100%, respectively. While the sensitivity and specificity values were equal to 100% and 87.5%, respectively. The discriminant variables were attributed to saccharides and trigonelline. Urological cancer (CB/CR) diagnosis model, using three variables, correctly classified 100% of samples. In this study, discriminant variables were attributed to trigonelline, hippurate and saccharides. In EVOO study, we used forty samples – sixteen produced by organic agriculture system (O) and twenty-four produced by conventional one (C). Metabonomics model was built using LDA formalism and five bins, correctly classifying 100% and 91.7% of organic EVOO and conventional EVOO, respectively. Therefore, metabonomics model presented 95.0% accuracy. The most important variables for classification were assigned to linoleic/linolenic acids and glycerol. This model showed to be promising as analytical tool for classification of samples from your production mode. All metabonomics models were evaluated by Leave-One-Out-Cross-Validation (LOOCV).

Keywords: Metabolomics. ^1H NMR; Multivariate analyses; Prostate; Bladder; Kidney; Organic agriculture.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo da constituição do metaboloma e as técnicas analíticas empregadas nas estratégias metabonômica e metabolômica.	20
Figura 2. Fluxograma descritivo da estratégia metabonômica.	22
Figura 3. Relação de Boltzman, onde k é a constante de Boltzman ($1,380 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta, h é a constante de Planck ($6,624 \times 10^{-34} \text{ J s}$) e ν é a frequência da radiação.	24
Figura 4. Espectro de RMN de hidrogênio típico de amostra de urina, à título de exemplo, com as suas principais informações.	25
Figura 5. Representação esquemática de uma sequencia de pulso para o núcleo de hidrogênio. d_1 é o tempo de espera (preparação) e t_1 é o tempo de aquisição.	26
Figura 6. Representação do fenômeno da RMN quando se aplica um campo externo, B_0 , e a resultante da magnetização do núcleo analisado, M_0	26
Figura 7. Efeito de um pulso na magnetização inicial, M_0	27
Figura 8. Espectro de RMN de ^1H (urina, 300 MHz). A direita, o mesmo espectro obtido usando a sequencia de pulsos PRESAT.	28
Figura 9. Sequência de pulso para supressão do sinal da água (PRESAT).	29
Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (Soro, 300 MHz) obtido usando a sequência PRESAT para supressão do sinal da água.	29
Figura 11. Sequência de pulso CPMG com filtro de T_2 acoplada ao PRESAT.	31
Figura 12. Esquema representando a evolução do vetor magnetização e de suas componentes no plano xy (que determina T_2) e no eixo z (que determina T_1).	31
Figura 13. Sequência de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).	31
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H (Soro, 300 MHz) obtido usando: a) a sequencia PRESAT b) CPMG com filtro de T_2 acoplado ao PRESAT.	32
Figura 15. Representação esquemática da Análise de Componentes Principais.	34
Figura 16. Representação do gráfico de escores e pesos da PCA.	34
Figura 17. Representação esquemática da análise por discriminantes lineares (LDA).	37
Figura 18. Representação esquemática do algoritmo PLS, contendo a matriz de dados X , e a matriz resposta Y	40
Figura 19. Representação esquemática da validação cruzada (LOOCV).	43
Figura 20. Representação esquemática algoritmo que fundamenta o formalismo OPLS-DA.	45
Figura 21. Representação esquemática dos processos envolvendo o surgimento de lesões irreversíveis à célula (adaptado de (KUMAR et al., 2013; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008)).	48
Figura 22. Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de próstata por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da próstata) (BRASIL, 2016).	50
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H para a) voluntário saudável; b) paciente diagnosticado com câncer de próstata.	58
Figura 24. Panorama das duas primeiras componentes principais, reunindo 62,3% da variância explicada. Legenda: Bolinhas vermelhas representam os pacientes com câncer de próstata; as bolinhas verdes, voluntários saudáveis.	59
Figura 25. À esquerda, gráfico de escores OPLS-DA e, à direita, Gráfico com os valores de R^2X , R^2Y e Q^2 obtidos para o modelo OPLS-DA após a validação cruzada (LOOCV).	59
Figura 26. Gráfico dos escores obtidos na função discriminante (LDA).	60

Figura 27. Estruturas do íon citrato e da L-histidina. Em destaque, os sinais atribuídos e associados à discriminação observada no modelo LDA – Câncer de próstata versus Voluntários saudáveis.....	61
Figura 28. Gráfico dos escores obtidos na função discriminante (LDA) pelas amostras fornecidas por voluntários saudáveis e pacientes diagnosticados com câncer de próstata (CP).....	62
Figura 29. Estruturas da trigonelina e da d-glicose (exemplo de sacarídeo). Em destaque, os bins discriminantes e suas atribuições.....	63
Figura 30. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) para amostras: a) voluntários saudáveis, b) pacientes com Câncer Renal, c) pacientes com Câncer de Bexiga.	64
Figura 31. Formalismo PLS-DA. Gráfico de escores com 38% da variância explicada pelo modelo para as componentes PLS1 e PLS2.	64
Figura 32. À esquerda, Validação cruzada (LOOCV) com os valores de R^2 , Q^2 e exatidão. À direita, gráfico com os valores VIP, indicando quais variáveis são mais importantes na classificação das amostras.	65
Figura 33. Estruturas da creatinina, do acetato, do gluconato e da d-glicose, identificados como metabólitos discriminantes no modelo LDA, a partir de amostras de urina, para discriminar voluntários saudáveis de pacientes com câncer de bexiga ou rim.	65
Figura 34. Gráfico dos escores obtidos na função discriminante (LDA) pelas amostras fornecidas por voluntários saudáveis e pacientes diagnosticados com câncer de bexiga ou rim (CB/CR).	66
Figura 35. Estruturas da triogonelina, hipurato e d-glicose, identificados como metabólitos discriminantes no modelo metabonômico usando LDA para discriminar voluntários saudáveis de pacientes com cancer de urológico (CB/CR).	67
Figura 36. Atribuições de sinais de alguns metabólitos (discriminantes) no espectro de RMN de ^1H na amostra de urina.	68
Figura 37. Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz). a) azeite extra virgem convencional b) azeite extra virgem orgânico.	78
Figura 38. Representação da projeção das duas primeiras componentes principais, PC1 e PC2, reunindo 93,3% da variância explicada. [Legenda: Bolinhas verdes – amostra de azeite extra virgem orgânico; Bolinhas vermelhas – amostras de azeite extra virgem convencional]	79
Figura 39. Projeção das duas primeiras componentes, PLS1 e PLS2, reunindo 93,1% da variância explicada pelo modelo. [Legenda: Bolinhas verdes – amostra de azeite extra virgem orgânico; Bolinhas vermelhas – amostras de azeite extra virgem convencional]	79
Figura 40. Representação da projeção das primeiras componentes, PLS1 versus OPLS1, reunindo 32,7% da variância explicada pelo modelo. [Legenda: Bolinhas verdes – amostra de azeite extra virgem orgânico; Bolinhas vermelhas – amostras de azeite extra virgem convencional].....	80
Figura 41. Gráfico dos valores observados versus valores preditos obtidos pelo formalismo LDA.	82
Figura 42. Espectro COSY ^1H - ^1H de uma amostra de azeite extra virgem.	83
Figura 43. Estruturas dos ácidos graxos linoleico e linolenico, e o glicerol. Identificados como metabólitos discriminantes no modelo metabonômico usando LDA para discriminar azeites extra virgem de produção orgânica daqueles oriundos de uma produção convencional.....	84

Lista de Tabelas

Tabela 1. Alguns núcleos atômicos com suas respectivas propriedades atômicas e magnéticas (GRUTZNER, 2005a)	25
Tabela 2. Resultados possíveis para um teste diagnóstico.....	46
Tabela 3. Matriz de Classificação e Validação cruzada (LOOCV) obtidos pela LDA com 4 variáveis.....	60
Tabela 4. Matriz de Classificação e Validação cruzada (LOOCV) obtidos pela LDA. ..	62
Tabela 5. Matriz de Classificação e Validação cruzada (LOOCV) obtidos pela LDA. ..	66
Tabela 6. Informações relativas aos azeites de oliva extra virgem utilizados no estudo	75
Tabela 7. Resultados obtidos no formalismo PLS-DA após validação cruzada (LOOCV) para as cinco primeiras componentes PLS.	80
Tabela 8. Matriz de classificação das amostras de azeite após a validação cruzada (LOOCV).....	81
Tabela 9. Resultados do Teste t para as variáveis discriminantes e o valores médios da acidez total livre para as amostras de azeite extra virgem utilizadas no presente estudo.....	84

Lista de Abreviaturas

BMRB – do inglês, *Biological Magnetic Resonance Bank*
BML – do inglês, *Birmingham Metabolite Library*
CPMG – Sequência Carr-Purcell-Meiboom-Gill (usado como filtro de T_2)
CLAE/EM – Cromatografia Líquida acopladas à espectrometria de massas
CG – Cromatografia gasosa
EVOO – do inglês, *Extra Virgin Olive Oil*
EMI – Espectrometria de massas por inserção direta
HMBC – do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*
HMDB – do inglês, *Human Metabolome Database*
HSQC – do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
IV – Espectroscopia de Infravermelho
LDA – do inglês, *Linear Discriminant Analysis*
LDL - do inglês, *Low Density Lipid*
LOOCV – do inglês, *Leave One Out Cross Validation*
OPLS-DA – do inglês, *Orthogonal Partial Least Square – Discriminant Analysis*
PC - do inglês, *Principal Component*
PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*
PLS-DA – do inglês, *Partial Least Square – Discriminant Analysis*
PRESAT - Supressão do Sinal da Água
RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
RF – Radiofrequência
SIMCA – do inglês, *Soft Independent Modeling of Class Analogy*
VLDL - do inglês, *Very Low Density Lipid*
TMS – Tetrametil-silano
TPS - ácido trimetilsililpropiónico

Sumário

1.	Introdução	16
2.	Fundamentação Teórica	18
2.1	Metabonômica	18
2.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	24
2.2.1	Supressão do Sinal da Água (PRESAT)	28
2.2.2	Filtro de T₂ (CPMG)	30
2.3	Análise Multivariada	33
2.3.1	Análise por Componentes Principais (PCA)	33
2.3.2	Análise por Discriminantes Lineares	36
2.3.3	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e a sua variação ortogonal (OPLS-DA)	39
2.4	Avaliação de Testes de Diagnósticos	45
3.	Aplicações Metabonômicas usando RMN de ¹H – Diagnóstico não-invasivo de Câncer de Próstata, Bexiga e Rim	48
3.1	Câncer de Próstata, Bexiga e Rim	48
3.2	Hipótese	54
3.3	Objetivos	54
3.3.1	Objetivo Geral	54
3.3.2	Objetivos Específicos	54
3.4	Materiais e Métodos	55
3.4.1	Pré-processamento dos dados	57
3.5	Resultados e Discussão	58
3.5	Conclusão	69
4.	Aplicações Metabonômicas usando RMN de ¹H – Classificação de amostras de azeite extra virgem de produção orgânica	70
4.1	Azeite de Oliva – Extra Virgem Orgânico	70
4.2	Hipótese	74
4.3	Objetivos	74
4.3.1	Objetivo Geral	74
4.3.2	Objetivos Específicos	74
4.4	Materiais e Métodos	75
4.5	Resultados e Discussão	78
4.6	Conclusão	86
5.	Considerações Finais	87

6. Perspectivas	88
Referências	89
Atividades complementares	97
Anexos	99
Apêndice.....	102

1. Introdução

O desenvolvimento de ferramentas analíticas para classificação e diagnóstico clínico, que sejam de fácil leitura, com altos valores de predição e minimamente invasivas, é uma necessidade constante. O diagnóstico de doenças graves, como os mais diferentes tipos de câncer, bem como o monitoramento do tratamento, frequentemente, exige técnicas que possam ser empregadas com certa periodicidade, sem que venham a prejudicar ou expor o paciente a riscos além dos já impostos pela doença. Por outro lado, essas mesmas técnicas podem ser empregadas nas ciências forenses e no controle de qualidade, na produção e comercialização de alimentos.

Existem diversas ferramentas analíticas com este fim. Técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas, espectroscopia na região do ultravioleta, infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear são alguns exemplos de técnicas que, quando associadas a algum tipo de análise estatística de dados, uni e/ou multivariada, são bastante eficazes para fins de identificação, caracterização, elucidação estrutural dos mais diversos tipos de amostras estudadas.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) se encaixa bem nesta proposta. Esta é amplamente utilizada em diversos campos de análise, que vai desde os alimentos até materiais biológicos, como soro sanguíneo, urina, sêmen, tecidos, entre outros. A RMN, além de ser não-destrutiva, possibilita a obtenção de informações qualitativas e quantitativas acerca da composição das amostras analisadas, com pouca interferência do operador ou ausência de pré-tratamentos específicos nas mesmas.

Salienta-se que, para obter informações com boa reprodutibilidade, temos que ajustar todos os parâmetros experimentais a ser utilizado e ter como ferramenta de auxílio, o uso da análise uni e multivariada de dados. Não obstante, através da grande quantidade de dados obtidos a partir dos espectros de RMN, de difícil interpretação visual, faz-se necessário a aplicação apropriada de técnicas de análise multivariada para obtenção e complementação de informações obtidas através de métodos analíticos clássicos.

Proposta por Nicholson e colaboradores, em 1999, a metabonômica, vem sendo utilizada com bastante eficácia em diversos problemas clínicos e alimentícios. Em síntese, esta estratégia baseia-se em um princípio denominado homeostase, segundo o qual, sempre que um estímulo externo atua sobre um sistema vivo, este responderá de forma a restabelecer o estado de equilíbrio, promovendo mudanças nas concentrações relativas de metabólitos endógenos. Estas mudanças podem ser acompanhadas utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 associada à análise estatística de dados (uni e multivariada). Com isso, pode-se estabelecer uma correlação entre o *status* bioquímico antes e depois do estímulo externo (doença ou ação que permita uma alteração no estado de equilíbrio do sistema em análise). Quando este estímulo é devido a um agente patogênico, o emprego da estratégia metabonômica resulta numa ferramenta diagnóstica ou prognóstica.

Nesta perspectiva, o presente trabalho será apresentado em três capítulos. No capítulo I, serão apresentadas as principais ferramentas e conceitos empregados no nosso estudo. Considerando que o trabalho tem caráter multidisciplinar e que o mesmo é destinado a profissionais da área de saúde, da indústria alimentícia, estatísticos e químicos, o texto é apresentado de forma a ser inteligível a todos. Começaremos com a definição de Metabonômica, os princípios da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e as ferramentas de estatística multivariada utilizadas ao longo do trabalho. Nos capítulos II e III, serão apresentados os objetos de estudo específicos – Câncer de próstata, bexiga e rim (urológico), e produção orgânica de azeite de oliva extra-virgem, descrevendo de forma sucinta e sólida, suas principais características, alguns trabalhos utilizados como referencial teórico, os principais resultados e a discussão realizada baseada nos dados obtidos na literatura e, por fim, as conclusões obtidas em cada estudo realizado neste trabalho.

2. Fundamentação Teórica

2.1 Metabonômica

Os termos metabonômica e metabolômica surgiram no final dos anos 90 e início dos anos 2000, respectivamente. Estes se baseiam no estudo do metaboloma, que pode ser descrito como sendo o conjunto de metabólitos produzidos ou presentes em um dado sistema biológico. Em alguns trabalhos na literatura, estes termos são usados como sinônimos, apesar de existir uma definição clara e distinta para as duas estratégias (FIEHN, 2001; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001; NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; SMOLINSKA et al., 2012).

A estratégia metabonômica é uma área de pesquisa multidisciplinar, que busca identificar mudança(s) no perfil de metabólitos endógenos em um dado biofluido, associando-a(s) ao status bioquímico da fonte. Uma definição clássica de metabonômica foi fornecida por Nicholson e colaboradores (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999) em trabalho pioneiro:

“(...) é a medida quantitativa da resposta metabólica, multiparamétrica, dependente do tempo, de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas.”

Já o termo metabolômica, surgiu pouco tempo depois, em um trabalho realizado por Fien e colaboradores, no qual os autores descrevem o uso de uma estratégia semelhante à metabonômica (FIEHN, 2001). Mas, em 2001, Lindon et al (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001) definiram a estratégia metabolômica como:

“o estudo associado à identificação e quantificação de todos os metabólitos presentes em um determinado biofluido”.

Apesar de possuírem definições semelhantes, as estratégias metabonômica e metabolômica podem e devem ser diferenciadas. Dunn e colaboradores, fundamentando-se em suas peculiaridades, descreveram uma forma de distinguir estas duas metodologias e os seus termos correlatos (DUNN; ELLIS, 2005).

Na estratégia metabolômica, por definição, há a necessidade de identificar e quantificar todos os metabólitos presentes em uma dada amostra de origem biológica. Para atingir este objetivo, é necessário o uso de um conjunto de ferramentas analíticas, de forma a permitir a separação, identificação e quantificação absoluta de cada metabólito presente na amostra. Com isso, na estratégia metabolômica, destacam-se o emprego de técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-EM) ou cromatografia gasosa (CG-EM) (DUNN; ELLIS, 2005; FIEHN, 2001; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001; NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; SMOLINSKA et al., 2012).

Entretanto, o emprego de técnicas cromatográficas (CLAE/CG) implica no emprego de processos de pré-tratamentos da amostra, como extrações específicas e/ou derivatizações. Isso resulta, via de regra, em um aumento no tempo de análise por amostra, além de possibilitar problemas como perdas e/ou mudanças na composição de compostos voláteis e/ou termossensíveis, além da desnaturação de proteínas, como pode vir a acontecer com alguns fluidos, como extratos de frutas, derivados do leite, soro, sêmen e urina (LI et al., 2011; NICHOLSON; WILSON, 1989; SMOLINSKA et al., 2012; WU; ZHU; WANG, 2011). Por outro lado, a espectrometria de massas é uma excelente ferramenta para identificação e quantificação de compostos, o que torna a técnica muito interessante para a estratégia metabolômica.

A estratégia metabonômica, por sua vez, tem como objetivo a obtenção de uma “impressão digital” que esteja associada a determinado *status* bioquímico, não sendo obrigatória a identificação e quantificação absoluta dos metabólitos responsáveis pela discriminação entre os grupos. Essa diferença filosófica tem implicações metodológicas, uma vez que dispensa o uso de técnicas de separação de misturas, como as técnicas cromatográficas, permitindo o uso direto de ferramentas espectrométricas. As ferramentas analíticas que permitem a obtenção dessas informações são: as espectroscopias na região do infravermelho, do ultravioleta, e de ressonância magnética nuclear, além da espectrometria de massas por inserção direta (DUNN; ELLIS, 2005; FIEHN, 2001; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001; NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; SMOLINSKA et al., 2012). A Figura 1

apresenta um quadro com a constituição do metaboloma e as técnicas analíticas normalmente empregadas nas estratégias metabolômica e metabonômica.

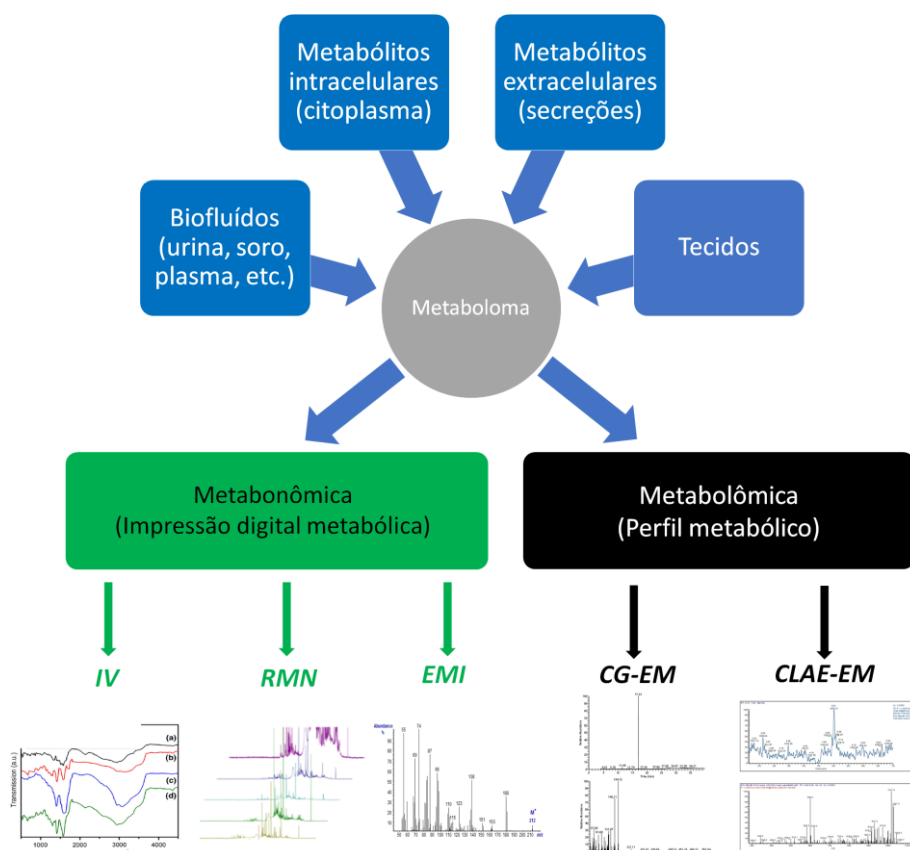


Figura 1. Esquema representativo da constituição do metaboloma e as técnicas analíticas empregadas nas estratégias metabonômica e metabolômica.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) mostra-se como uma ferramenta poderosa para a estratégia metabonômica, pois a obtenção dos espectros é relativamente rápida e a preparação exige mínimas intervenções do analista, dando celeridade ao processo e minimizando possíveis contaminações. A RMN de núcleos como hidrogênio-1, carbono-13, fósforo-31 e outros, possibilita a identificação e a quantificação relativa de diferentes metabólitos presentes no biofluido analisado, no entanto, em relação à espectrometria de massas, é uma técnica menos sensível (GODOY et al., 2010; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001; PAN et al., 2007a)

Schripsema e colaboradores descrevem, de forma breve, os aspectos gerais associados às ciências ômicas, baseadas na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), suas possibilidades e perspectivas

(SCHRIPSEMA, 2010). Na sua proposta, os mesmos discutem os mais diferentes termos que são utilizados como sinônimos para as estratégias metabonômica e metabolômica, mas com certas ressalvas. Por exemplo, os autores sugerem que o termo impressão digital metabólica seja associado à metabonômica, enquanto perfil metabólico seja associado à metabolômica (Figura 1). (FIEHN, 2001; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003; NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; SCHRIPSEMA, 2010; SMOLINSKA et al., 2012)

A estratégia metabonômica, em função de seu caráter multidisciplinar, envolve diferentes profissionais – como médicos, químicos, bioquímicos e estatísticos, e ferramentas – como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e formalismos de estatística multivariada, tais como Análise de Componentes Principais (PCA), Análise por Discriminantes Lineares (LDA) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), entre outras. (GAO et al., 2009; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003; NICHOLSON; WILSON, 1989)

As aplicações de estudos metabonômicos envolvem, geralmente, obtenção de dados espectrais a partir de biofluidos de sistemas vivos com *status* bioquímico diferentes, além da aquisição simultânea de múltiplos parâmetros bioquímicos (NICHOLSON; WILSON, 1989). A estratégia metabonômica utiliza biofluidos, que via de regra são obtidos de forma não invasiva, como urina, ou pouco invasiva como amostras de soro, plasma, sêmen (GRIFFITHS et al., 2010; ROBERTSON et al., 2000). Além destes, existem estudos que mostram a utilização de biofluido não convencionais como fluido cérebro-espinhal, bile, fluido seminal e biofluidos de origem vegetal (SCHRIPSEMA, 2010).

Em estudos metabonômicos, existem várias etapas que devem ser realizadas para a obtenção de informações significativas em relação ao estudo desejado. Etapas como definição do problema a ser investigado e avaliação de viabilidade do mesmo, obtenção das amostras e estocagem adequada; aquisição dos dados espectrais (RMN), inferências estatísticas acerca dos dados coletados a partir dos modelos construídos associando ao *status* bioquímico estudado e identificação dos metabólitos presentes a partir das

informações espectrais e realização de interpretação bioquímica em relação aos resultados são algumas etapas que devem ser feitas para obtenção de informações acerca de estudos metabonômicos (DONA et al., 2016). A Figura 2, mostra um esquema básico, na qual, descreve de forma geral, o desenho de um estudo metabonômico.

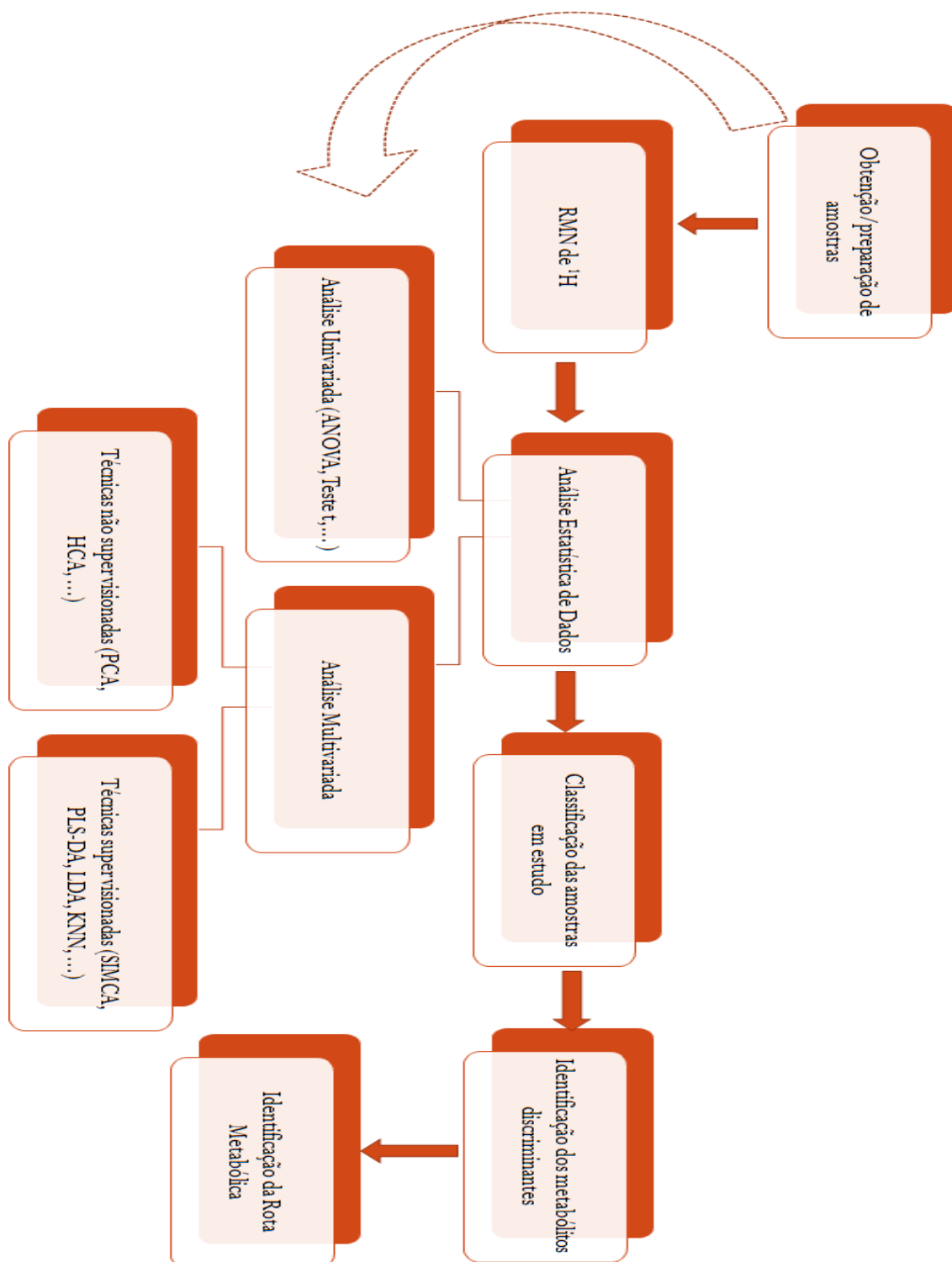


Figura 2. Fluxograma descritivo da estratégia metabonômica.

Na literatura, há diversos relatos acerca de estudos envolvendo a estratégia metabonômica. No entanto, a identificação dos metabólitos discriminantes e sua associação a uma rota metabólica não se mostra uma tarefa de fácil execução. Apesar de existir, na literatura, diversos bancos de dados contendo informações bioquímicas que auxiliam e facilitam a busca dos metabólitos presentes em um dado biofluido como as plataformas: HMDB (do inglês, Human Metabolome Database), BMRB (do inglês, Biological Magnetic Resonance Bank) e a BML (do inglês, Birmingham Metabolite Library), as atribuições não são triviais, tornando-se um processo lento e necessitando o uso de diversas técnicas complementares para obter uma resposta aceitável. Com isso, estas plataformas além de conter informações espectrais de RMN de vários metabólitos (soro e urina, principalmente), auxiliam na identificação dos mesmos (LUDWIG et al., 2012; ULRICH et al., 2008; WISHART; KNOX; GUO, 2009).

Além disso, observa-se que dados espectrais oriundos da RMN apresentam-se, em sua maioria, bastantes “aglomerados” dificultando assim, a atribuição dos sinais e consequente associação aos metabólitos presentes. Como recurso auxiliar, usam-se, técnicas bidimensionais de RMN, como COSY ^1H - ^1H , HMBC, HSQC, entre outras, para fins de confirmação e atribuição mais precisa acerca dos dados (DONA et al., 2016; EVERETT, 2015; GAO et al., 2009; ROBERTSON et al., 2000; ROBERTSON; WATKINS; REILY, 2011).

2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica de análise estrutural, em termos moleculares, que pode ser medida através de interações associadas a radiofrequências oscilantes de pequenos campos eletromagnéticos vinculados a núcleos interagentes, imersos em um forte campo magnético externo (GRUTZNER, 2005a; JUCHEM; ROTHMAN, 2014).

A RMN é uma poderosa ferramenta utilizada para elucidação estrutural de compostos orgânicos e biomoléculas, bem como de muitos compostos inorgânicos. É uma técnica que se fundamenta nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos presentes em uma determinada amostra. (GRUTZNER, 2005a; JUCHEM; ROTHMAN, 2014)

Esta técnica baseia-se no fato de que os núcleos atômicos possuem uma propriedade intrínseca, denominada spin nuclear, I , ao qual está associado o vetor momento angular magnético, $\vec{\mu}$. O número de estados de energia (n) possíveis para os spins é determinado pela expressão $n = (2I + 1)$. Na ausência de um campo magnético externo, esses estados são degenerados, perdendo essa degenerescência quando na presença de um campo magnético externo. No caso dos núcleos com spin $\frac{1}{2}$, como o núcleo de ^1H , existem dois níveis de energia com um pequeno excesso de população dos hidrogênios no estado de energia mais baixa ($N_\alpha > N_\beta$), de acordo com a distribuição de Boltzmann. Os estados são identificados como α e β ou como $1/2$ e $-1/2$, conforme mostrado na Figura 3 (GRUTZNER, 2005a).

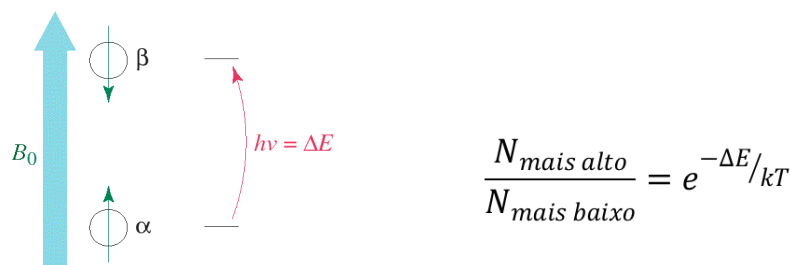


Figura 3. Relação de Boltzmann, onde k é a constante de Boltzmann ($1,380 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta, h é a constante de Planck ($6,624 \times 10^{-34} \text{ J s}$) e ν é a frequência da radiação.

Para que seja possível a espectroscopia de RMN, são necessários pelo menos dois estados, logo o spin nuclear tem que ser diferente de zero ($I \neq 0$).

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de núcleos que apresentam, ou não, atividade na espectroscopia de ressonância magnética nuclear.(GRUTZNER, 2005b)

Tabela 1. Alguns núcleos atômicos com suas respectivas propriedades atômicas e magnéticas (GRUTZNER, 2005a)

Elemento	$^1\text{H}^1$	$^1\text{H}^2$	$^{12}\text{C}^6$	$^{13}\text{C}^6$	$^{14}\text{N}^7$	$^{16}\text{O}^8$	$^{17}\text{O}^8$	$^{19}\text{F}^9$	$^{31}\text{P}^{15}$	$^{35}\text{Cl}^{17}$
<i>I</i>	1/2	1	0	1/2	1	0	5/2	1/2	1/2	3/2
<i>n</i>	2	3	1	2	3	1	6	2	2	4

I – número quântico de spin nuclear; *n* – número de estados de spin na presença de B_0

Para que seja possível extrair informações estruturais da amostra analisada, precisa-se obter parâmetros resultantes desse tipo de interação, como por exemplo, deslocamento químico (δ), integração (área sob cada sinal), constantes de acoplamentos (*J*). Os espectros de RMN normalmente são referenciados a um sinal-padrão, com deslocamento pré-definido. Para os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , é comum o uso de tetrametil-silano (TMS) ou o ácido trimetilsililpropiónico (TSP), dependendo do solvente utilizado, como referência de deslocamento químico, com o sinal atribuído aos grupos metilas em δ 0 ppm. Também é possível usar um sinal atribuído a algum composto presente na amostra e que tenha deslocamento conhecido em relação ao TMS ou TPS, como referência externa de deslocamento. A Figura 4 apresenta um típico espectro de RMN de ^1H de amostra de urina. (GRUTZNER, 2005a; JUCHEM; ROTHMAN, 2014).

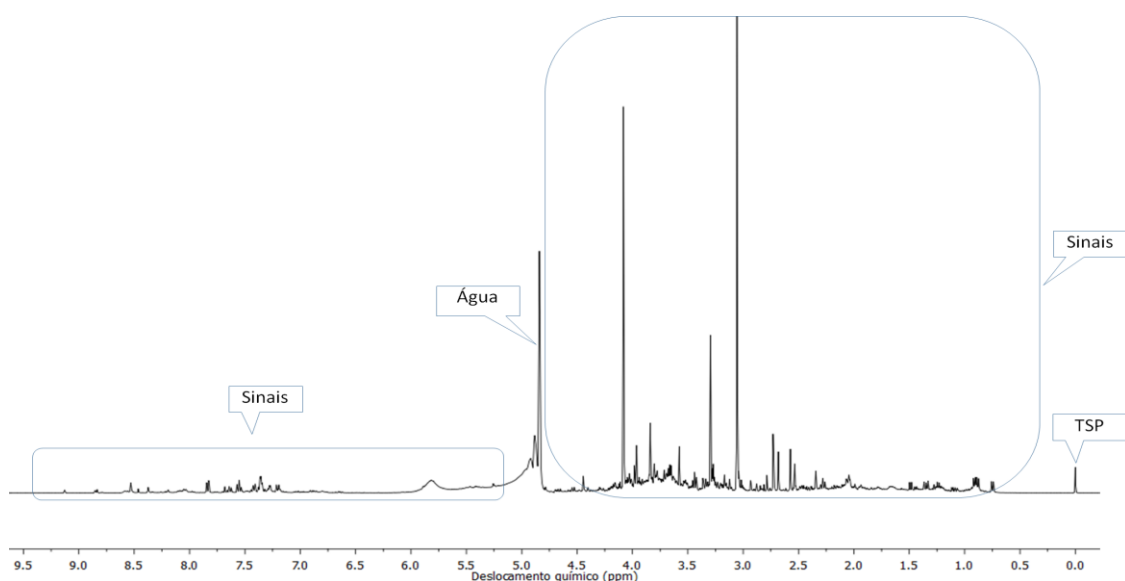


Figura 4. Espectro de RMN de hidrogênio típico de amostra de urina, à título de exemplo, com as suas principais informações.

Um experimento simples de RMN de ^1H consiste na aplicação de um pulso de RF, no canal do hidrogênio, por exemplo de 90° , seguido de um tempo para decaimento e aquisição do sinal. Esses experimentos de RMN podem ser representados por meios de esquemas, como ilustrado na Figura 5. Por convenção, temos que retângulos pretos representam os pulsos de RF utilizados na sequência. (GRUTZNER, 2005a; JUCHEM; ROTHMAN, 2014)

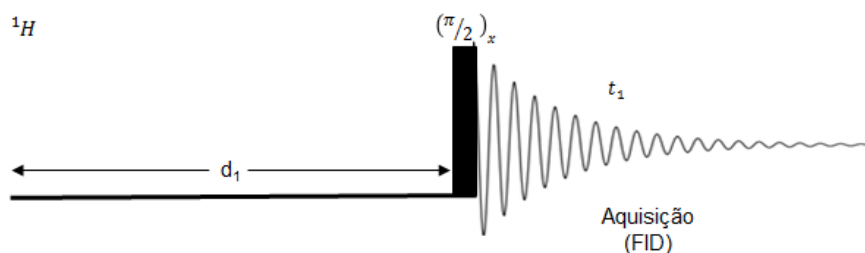


Figura 5. Representação esquemática de uma sequência de pulso para o núcleo de hidrogênio. d_1 é o tempo de espera (preparação) e t_1 é o tempo de aquisição.

Na prática, para uma dada amostra, repetimos a sequência d_1 - 90° - t_1 várias vezes (Figura 5), denominado número de transientes, afim de obter uma melhor razão sinal/ruído (S/N), tornando um espectro com sinais mais intensos e definidos. No exemplo apresentado, há apenas um pulso de RF, no entanto é possível o emprego de uma série de pulsos e intervalo de tempos entre cada pulso, que são ajustados pelo operador para se obter uma determinada informação, denominada de sequência de pulsos (GRUTZNER, 2005a; JUCHEM; ROTHMAN, 2014).

Uma forma didática e prática de analisar a espectroscopia de RMN, é se basear nos efeitos da radiação eletromagnética em relação ao vetor magnetização resultante no sistema em equilíbrio, na presença de um campo magnético externo, $\mathbf{B}_0$, denominado de magnetização líquida, $\mathbf{M}_0$. (Figura 6) (DIEHL, 2008; DYSON; PALMER III, 2012; GRUTZNER, 2005b)

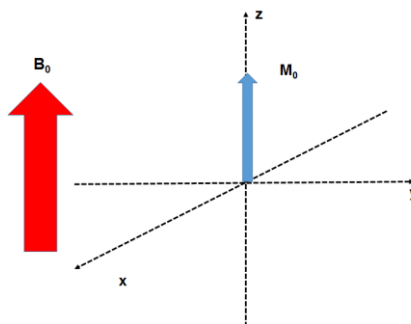


Figura 6. Representação do fenômeno da RMN quando se aplica um campo externo, $\mathbf{B}_0$, e a resultante da magnetização do núcleo analisado, $\mathbf{M}_0$.

Salienta-se que, ao aplicarmos $\mathbf{B}_0$, há a quebra da degenerescência, como descrito na Figura 3, e um equilíbrio dinâmico é estabelecido, resultando no vetor magnetização $\mathbf{M}_0$ orientado no eixo z. Quando um pulso de RF é aplicado, há mudança na orientação do vetor $\mathbf{M}_0$, conforme ilustrado na Figura 7. (DIEHL, 2008; DYSON; PALMER III, 2012; GRUTZNER, 2005b)

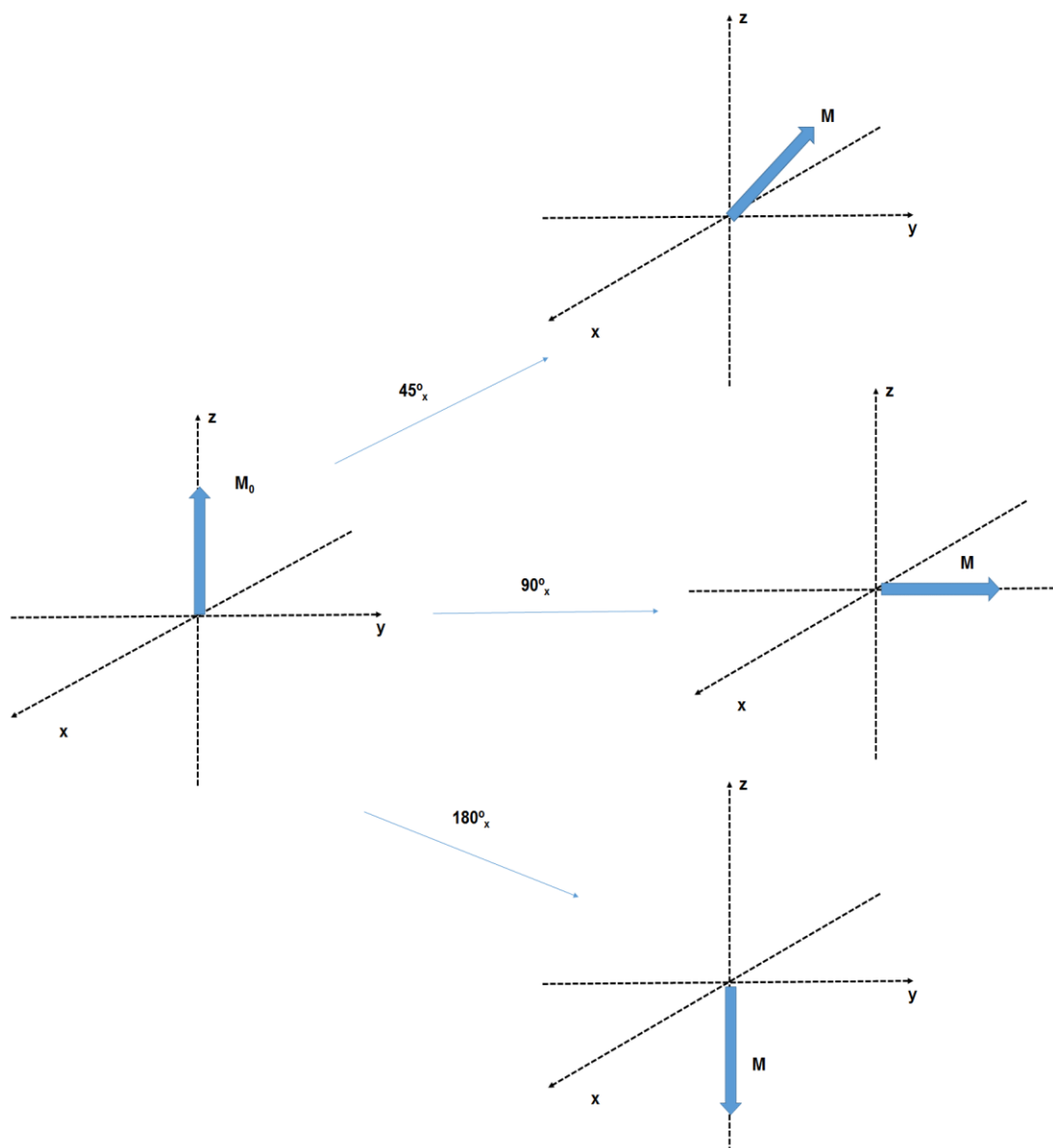


Figura 7. Efeito de um pulso na magnetização inicial, $\mathbf{M}_0$.

Não obstante, tem-se que amostras biológicas, oriundas de fluidos corporais como soro, urina, sêmen, entre outros, apresentam uma quantidade de água bastante significativa. Com isso, gera-se um sinal bastante intenso, na região entre δ 4,5-5,5 ppm, no espectro de RMN de ^1H , como pode ser observado na Figura 8. O sinal da água apresenta-se bastante pronunciado

quando comparado aos outros sinais de compostos minoritários, dificultando a observação dos mesmos (GRUTZNER, 2005a; JUCHEM; ROTHMAN, 2014).

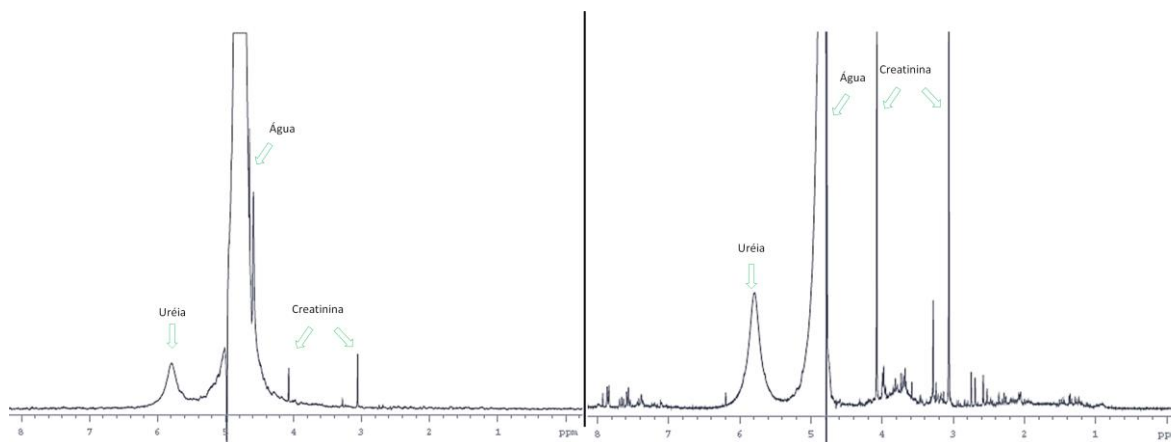


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H (urina, 300 MHz). A direita, o mesmo espectro obtido usando a sequencia de pulsos PRESAT.

Com a evolução dos aparelhos de RMN, foram desenvolvidas diferentes sequencias de pulsos com o intuito de contornar este problema e possibilitar a observação dos sinais associados aos compostos minoritários, metabólitos endógenos e/ou exógenos, presentes em amostras biológicas. Dentre elas, podemos citar, as sequencias de pulsos PRESAT, WET, WATERGATE, entre outras, das quais são utilizadas para atenuação e/ou eliminação dos sinais atribuídos a um solvente específico, como no presente caso, a água (DIEHL, 2008; DYSON; PALMER III, 2012; GRUTZNER, 2005b).

2.2.1 Supressão do Sinal da Água (PRESAT)

A sequência de pulsos, PRESAT, é um experimento de dois pulsos de RF, sendo um seletivo, de baixa intensidade, e um pulso de 45° ou 90° , seguido da aquisição do sinal (Figura 9). O primeiro pulso é aplicado selecionando a frequência do sinal atribuído à água, de forma a saturá-lo. Com isso, teoricamente, este sinal seria suprimido do espectro, tornando possível a observação dos sinais atribuídos aos constituintes minoritários (metabólitos) da mistura. Entretanto, na prática, há uma diminuição significativa do sinal atribuído à água e a consequente observação dos outros sinais, como apresentado na Figura 8 (DIEHL, 2008; DYSON; PALMER III, 2012; GRUTZNER, 2005b).

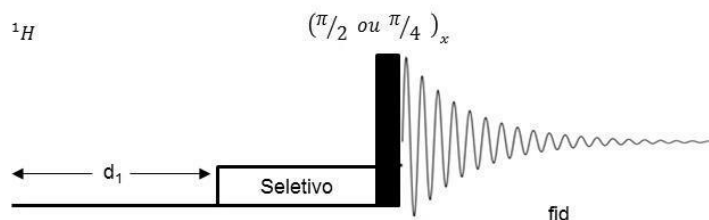


Figura 9. Sequência de pulso para supressão do sinal da água (PRESAT).

Esta sequência de pulsos é frequentemente usada em amostras que apresentam concentração de água bastante elevadas ou que apresentem apenas um sinal de solvente muito intenso. Salienta-se que, esta sequência pode causar alguma perda de informação, se a amostra possuir constituintes com sinais próximos à região irradiada seletivamente (DYSON; PALMER III, 2012; PALMER, 2012; ZHANG; LIU; MAO, 2014). A Figura 10 apresenta um espectro de RMN de 1H de uma amostra de soro obtido usando a sequência PRESAT.

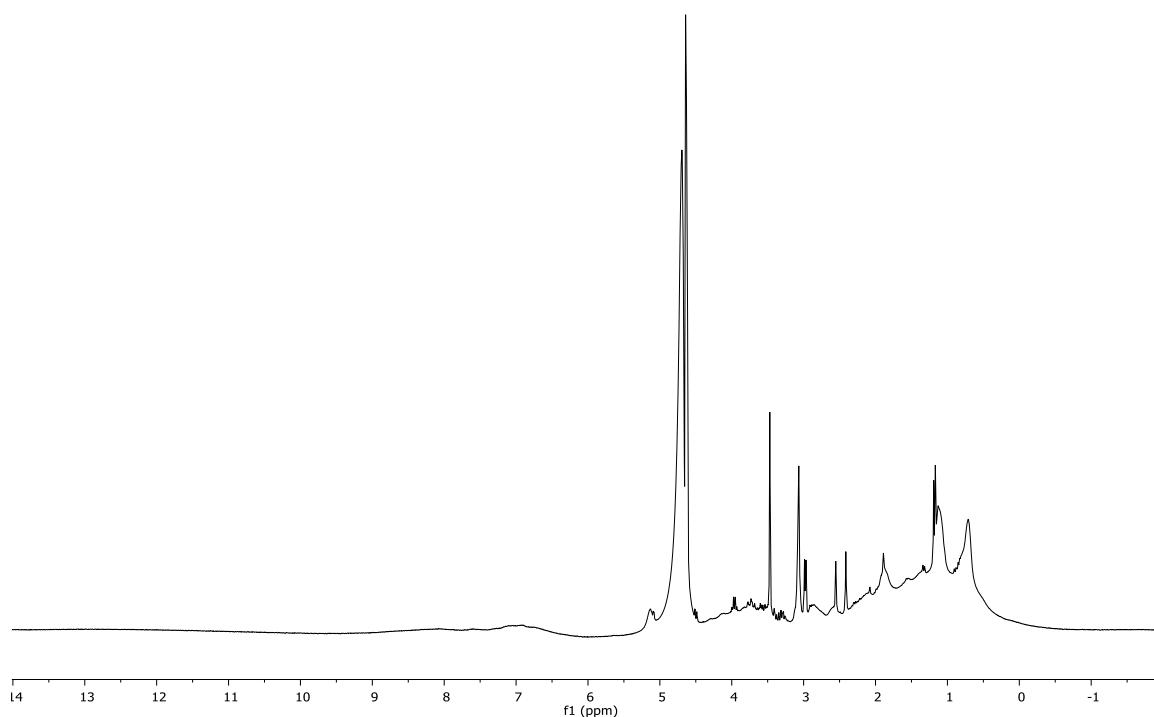


Figura 10. Espectro de RMN de 1H (Soro, 300 MHz) obtido usando a sequência PRESAT para supressão do sinal da água.

Na Figura 10, observa-se que mesmo utilizando a sequência PRESAT, obtém-se um espectro com sinais largos, e na região entre δ 0,80-1,30 ppm, sinais intensos característicos de grupos metílicos e metílicos associados à

presença de gordura na amostra. Nestes casos, além da atenuação do sinal da água, é necessário utilizar uma sequência de pulsos que elimine esta interferência e deixe os sinais mais resolvidos. Em nossa proposta, optou-se por usar a sequência de pulso CPMG, como filtro de T_2 (tempo de relaxação transversal)

2.2.2 Filtro de T_2 (CPMG)

Para amostras de origem biológica, como soro, plasma e fragmentos de tecidos, os espectros de RMN apresentam bastante informação molecular útil. Por outro lado, pela composição complexa presente neste tipo de amostra, como lipoproteínas, lipídeos, proteínas e metabólitos secundários, com diferentes tamanhos e cadeias, há uma sobreposição imensa dos respectivos sinais, tornando o espectro largo e com baixa definição (DYSON; PALMER III, 2012; PALMER, 2012; ZHANG; LIU; MAO, 2014). Com isso, alguns compostos que se apresentam em menor concentração, mas que são de extrema importância na identificação e classificação de algum estudo toxicológico ou de uma doença específica, não são observados devido a esse recobrimento de sinais (GRUTZNER, 2005a; JUCHEM; ROTHMAN, 2014).

Para solucionar estes problemas e melhorar o processo de detecção dos sinais referentes aos compostos minoritários, diversos experimentos de RMN são empregados para este fim, baseados em tempos de relaxação e em outros fundamentos (DYSON; PALMER III, 2012; PALMER, 2012; ZHANG; LIU; MAO, 2014).

Os sinais atribuídos às espécies mais pesadas, como os lipídios, apresentam-se no espectro de forma alargada, sobrepondo-se, muitas vezes, aos sinais de interesse, dificultando a leitura do espectro e as análises estatísticas. Os sinais atribuídos a esses compostos, via de regra, têm tempos de relaxação transversal (T_2) menores que os observados para metabólitos de baixa massa molar. Sendo assim, utiliza-se uma sequência de pulsos que aplica um filtro de T_2 para eliminar estes sinais associados a macromoléculas presentes em um dado biofluido. A Figura 11 apresenta a sequência de pulsos de RF denominada Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), modificada com um pulso seletivo para supressão do sinal da água (PRESAT). (DYSON; PALMER III, 2012; ZHANG; LIU; MAO, 2014).

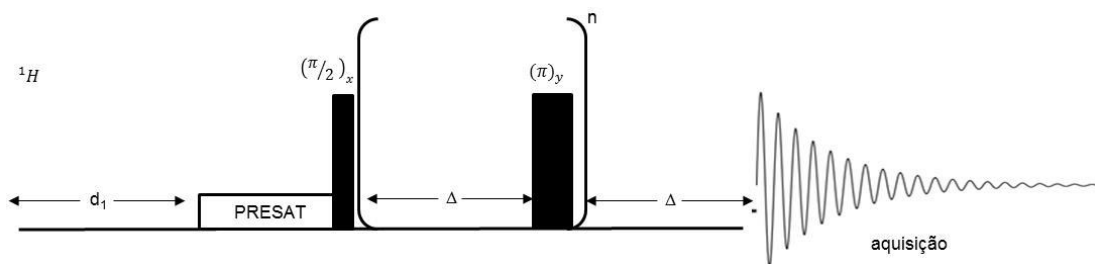


Figura 11. Sequência de pulso CPMG com filtro de T_2 acoplada ao PRESAT.

Para entender melhor esta sequência, precisamos definir alguns termos importantes. A Figura 12, ilustra a evolução do vetor magnetização, e de seus componentes em z e no plano xy , após aplicação do pulso de 90° em $-x$. Define-se na literatura, o tempo necessário para que a componente xy do vetor magnetização, voltar ao valor inicial (zero) é chamado de tempo de relaxação transversal, T_2 , enquanto o tempo necessário para a componente z voltar ao valor inicial (máximo) é chamado de tempo de relaxação longitudinal, T_1 (DYSON; PALMER III, 2012; PALMER, 2012; ZHANG; LIU; MAO, 2014).

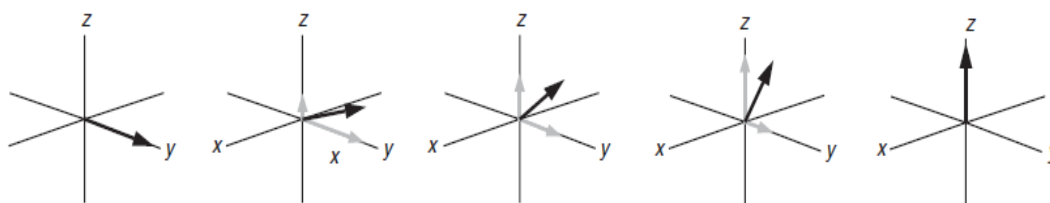


Figura 12. Esquema representando a evolução do vetor magnetização e de suas componentes no plano xy (que determina T_2) e no eixo z (que determina T_1).

O vetor magnetização, antes da aplicação da sequência de pulsos, está alinhado no sentido do eixo $+z$. Quando aplicado um pulso de radiofrequência de 90° , ao longo do eixo x , o vetor magnetização tem sua orientação alterada e passa a ser analisado considerando as componentes no eixo z e no plano xy . Após um certo tempo, Δ , aplica-se um pulso de 180° , no eixo y , com isso, inverte-se o sentido de precessão do vetor magnetização, produzindo um eco de spin. Em seguida, o equilíbrio é restabelecido e o vetor tende a voltar para a condição inicial (Figura 13).

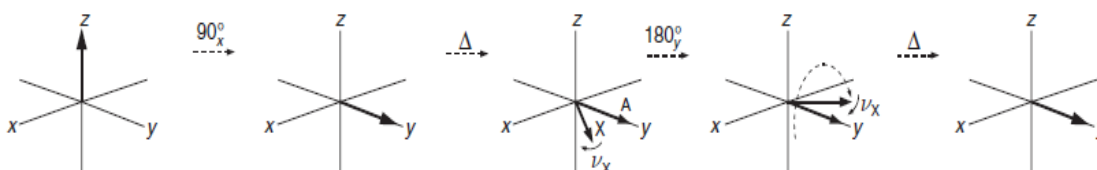


Figura 13. Sequência de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)

Moléculas grandes, em geral, possuem tempos de relaxação T_2 menores, voltando mais rapidamente ao seu estado inicial. O filtro de T_2 consiste em ajustar o valor de Δ de tal forma que seja maior que o T_2 das espécies que se pretende eliminar e menor que o T_2 das espécies de interesse, deixando o espectro mais resolvido (ALGER, 2009; MAZUMDER; DUBEY, 2013; ZHANG; LIU; MAO, 2014). A Figura 14 apresenta um exemplo da utilização da sequência CPMG acoplada à Presat.

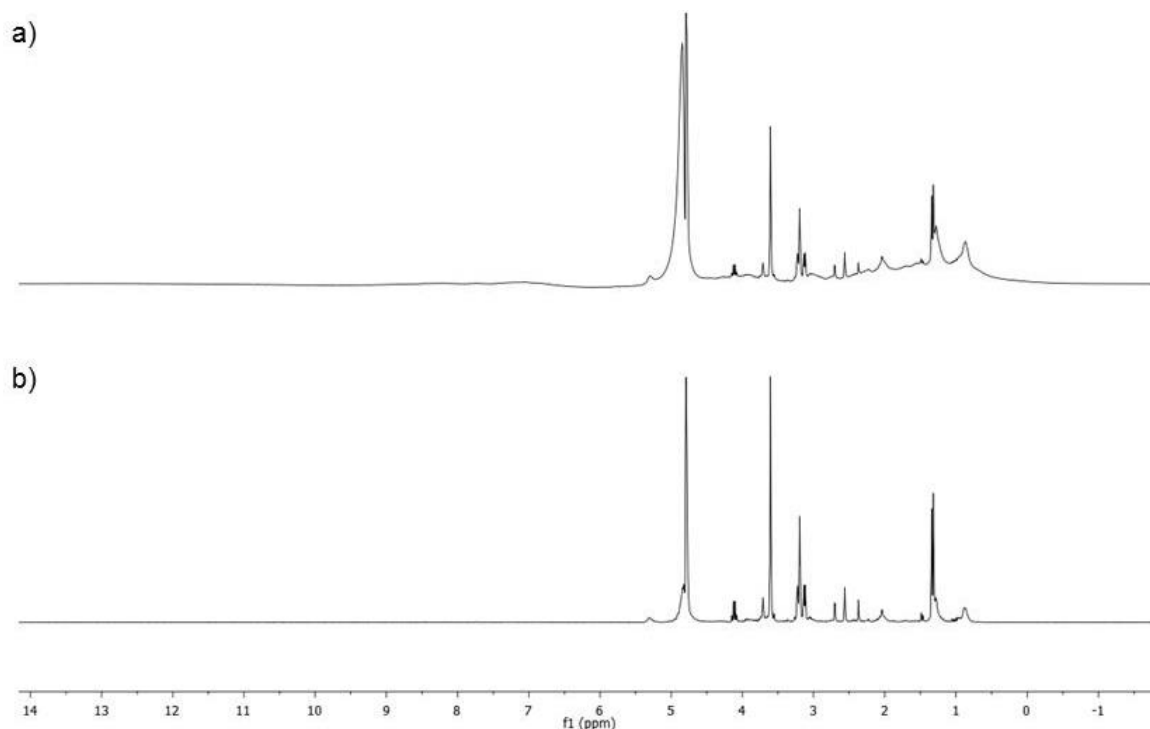


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H (Soro, 300 MHz) obtido usando: a) a sequência PRESAT b) CPMG com filtro de T_2 acoplado ao PRESAT.

Apesar de ser uma técnica bastante eficiente para elucidação estrutural e conformacional, identificação de metabólitos, entre outras, os espectros de RMN obtidos a partir de biofluidos, geram diversas informações sobrepostas, o que poderia, em princípio, tornar a interpretação desses dados uma ação difícil e confusa. Para solucionar este problema, a estratégia metabonômica faz uso de ferramentas de análise multivariada. Esse campo do conhecimento é denominado Quimiometria. (GOODPASTER; ROMICK-ROSENDALE; KENNEDY, 2010; HENDRIKS et al., 2011; JURS, 1986; LINDON; NICHOLSON; WILSON, 2000; WESTERHUIS et al., 2008; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001a; XU et al., 2012)

2.3 Análise Multivariada

A Quimiometria é definida como o uso de ferramentas matemáticas e estatísticas para planejar/otimizar procedimentos, experimentos e/ou para obter o máximo de informação de dados multivariados associados a problemas químicos. (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006; WOLD, 1995; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001a)

A análise multivariada pode ser separada em duas categorias: técnicas não supervisionadas, que se definem por não fazer uso da informação de classe das amostras e são usadas para estabelecer (ou investigar) quaisquer agrupamentos naturais dos dados. Enquanto, as técnicas supervisionadas são aquelas que usam informações de classe e que através de grupos de treinamento (calibração), previsão, e validação constroem modelos matemáticos para aperfeiçoar a separação entre duas ou mais classes. (BRERETON, 2013a)

Uma das técnicas não supervisionadas mais utilizada em análise multivariada é a Análise por Componentes Principais (PCA)

2.3.1 Análise por Componentes Principais (PCA)

A análise por componentes principais (PCA) é uma técnica não-supervisionada, que se fundamenta na projeção dos dados originais em um espaço com um número menor de dimensões (BRERETON, 2013b; BUYDENS et al., 1999a; JURS, 1986; PAN et al., 2007b). Esta análise baseia-se no cálculo matricial, representado pela Equação 1, descrita como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P} + \mathbf{E} \quad \text{Equação 1}$$

$\mathbf{X}$ é a matriz de dados originais, com dimensões i (número de casos) e j (variáveis); $\mathbf{T}$ é a matriz de escores da PCA, com dimensões i (número de casos) e f (número de componentes principais); $\mathbf{P}$ é a matriz de pesos da PCA, com dimensões f (número de componentes principais) e j (variáveis); e $\mathbf{E}$ é a matriz de resíduos. A Figura 15 ilustra esta operação.

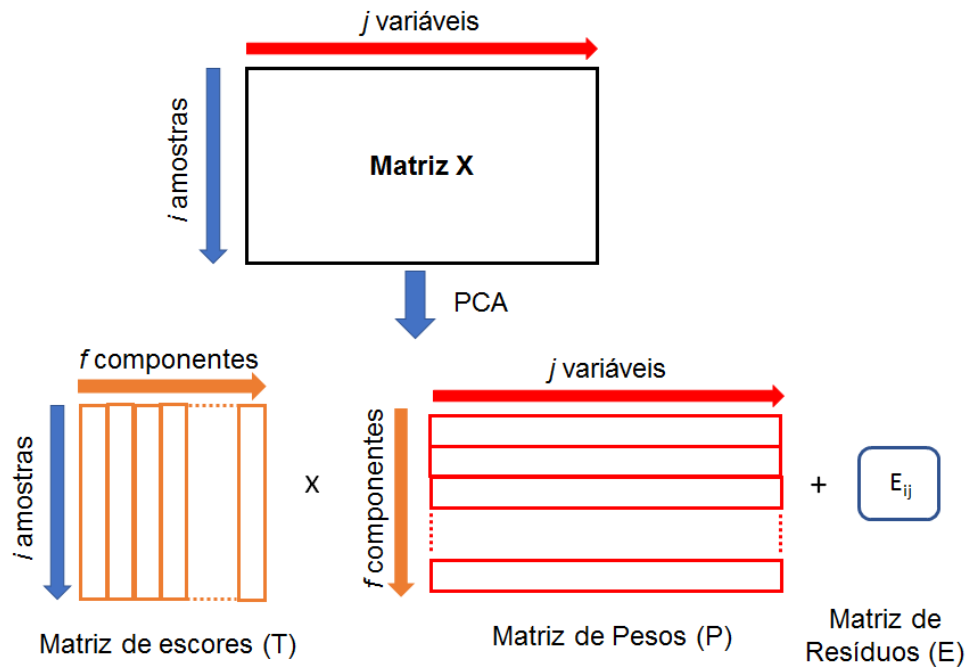


Figura 15. Representação esquemática da Análise de Componentes Principais.

Em outras palavras, promove-se a construção de um novo sistema de coordenadas, componentes principais, nos quais os dados originais são projetados. Cada amostra é projetada nesta nova orientação espacial, de menor dimensionalidade que os dados de entrada, e é associada a um autovalor (escore) e a um autovetor (peso), como mostra a figura 16.

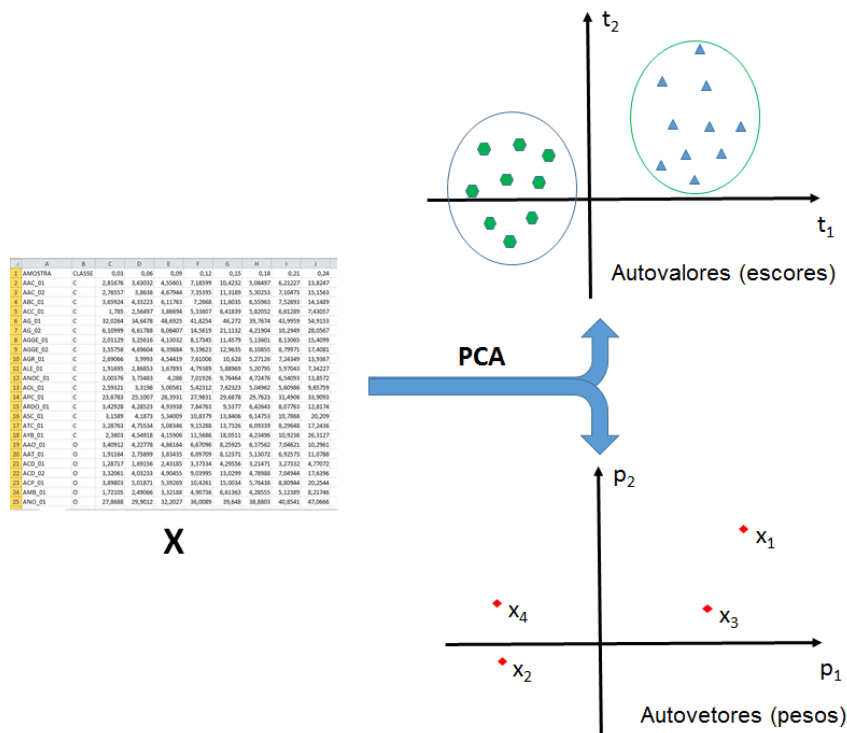


Figura 16. Representação do gráfico de escores e pesos da PCA. .

Os escores representam as coordenadas das amostras no sistema de eixos formados pelas componentes principais. Cada componente principal é constituída pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são denominados pesos (Figura 16). Matematicamente, os pesos são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e as componentes principais (PC), representando, portanto, o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC. A primeira componente principal (PC1) é traçada no sentido da maior variação no conjunto de dados; a segunda (PC2) é traçada ortogonalmente à primeira, com o intuito de descrever a maior porcentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante; enquanto os escores representam as relações de (dis)similaridade entre as amostras.(BRERETON, 2013b; JURS, 1986; MALWADE et al., 2013; TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006; WOLD, 1995)

A avaliação dos pesos permite entender quais variáveis mais contribuem para os agrupamentos observados no gráfico dos escores. Através da análise conjunta do gráfico de escores e pesos, é possível verificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras. O número de componentes principais a ser utilizado no modelo PCA é determinado pela porcentagem de variância explicada. Assim, seleciona-se um número de componentes de tal maneira que a maior porcentagem da variação presente no conjunto de dados originais seja capturada (BRERETON, 2013b; JURS, 1986; MALWADE et al., 2013; TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006; WOLD, 1995).

A PCA, além de projetar agrupamentos naturais, se existirem, permite obter informações relacionadas a identificação, análise e exclusão de amostras “anômalas” (*outlier*), as quais, se mostram bastantes distintas quando comparadas a quaisquer elementos dos grupos estudados, podendo ser prejudiciais a construção do modelo estatístico, deixando o poder de classificação desta técnica bastante comprometido (GOODPASTER; ROMICK-ROSENDALE; KENNEDY, 2010; JURS, 1986; SILVA et al., 2005).

Na literatura, há diversos relatos quanto ao uso de modelos baseados na PCA para fins de classificação, com bastante sucesso. Por outro lado, como a PCA é fundamentada na otimização em direção da maior variância dos dados, isso faz com que sua habilidade de classificação se torne um pouco

comprometida. Sugere-se, portanto, que o uso desta técnica e suas aplicações seja com intuito, de uma investigação inicial dos dados originais, observando se há (ou não) agrupamentos das amostras em estudo (BRERETON, 2013a; JURS, 1986; LENZ; WILSON, 2006; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001; MALWADE et al., 2013; PAN et al., 2007a; SKOV et al., 2014; TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006; WOLD, 1995).

2.3.2 Análise por Discriminantes Lineares

A análise por discriminantes lineares (do inglês, *Linear Discriminant Analysis*), LDA, é um formalismo de análise multivariada e supervisionada, que se baseia na construção de uma ou várias funções lineares que promovam uma maximização na distância geométrica entre as classes e uma minimização, nas distâncias entre as amostras de uma mesma classe, para fins de classificação. O principal intuito desta análise é de projetar os dados em um subespaço menor que possa resultar em uma melhor separação entre as classes (BRERETON, 2013b; CAVILL et al., 2008; GUYON; ELISSEEFF, 2003).

Um outro propósito deste método está associado a identificação das variáveis que discriminam os grupos e, assim, elaborar previsões a respeito de uma nova observação, identificando o grupo mais adequado a que ela deverá pertencer, em função de suas características (BRERETON, 2013b; CAVILL et al., 2008; GUYON; ELISSEEFF, 2003).

Salienta-se que esta análise pressupõe propriedades inerentes ao conjunto amostral que devem ser respeitadas para fins de obtenção de modelos de classificação com valor de mérito. São eles: i) as variáveis discriminantes devem seguir uma distribuição normal; ii) Homogeneidade nas matrizes de variância e covariância; iii) Ausência de amostras anômalas; iv) Presença de linearidade entre as funções e v) Ausência de problemas relacionados a multicolinearidade das variáveis discriminantes (BRERETON, 2013b; CAVILL et al., 2008; GUYON; ELISSEEFF, 2003).

Considerando que esta técnica se baseia no conceito de distâncias, na literatura, define-se algumas formas de medir esta propriedade e a forma mais adequada para obter um poder de classificação mais significativo com os

dados analisados. As distâncias mais utilizadas são: euclidiana e Mahalanobis (Figura 17) (BRERETON, 2013a).

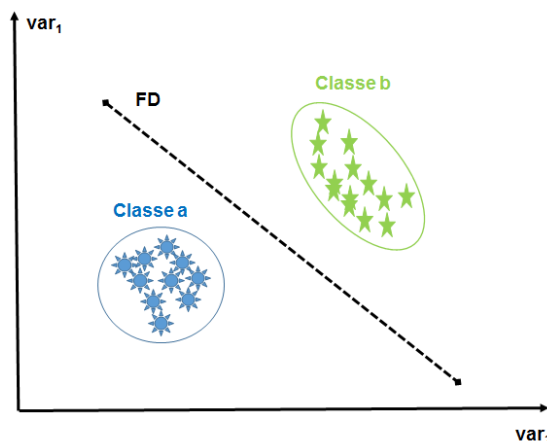


Figura 17. Representação esquemática da análise por discriminantes lineares (LDA).

Para fins de utilização desta técnica, faz-se necessário um tratamento prévio baseado na seleção de variáveis, com o intuito de: promover uma redução na dimensionalidade dos dados e identificar quais destas, possuem um maior poder de distinção entre as amostras de cada classe em um determinado problema. Na literatura, existem diversos algoritmos com estas finalidades, como o lambda de Wilks, distância de Mahalanobis, razão entre os F de cada grupo, entre outros (BRERETON, 2013b; CAVILL et al., 2008; GUYON; ELISSEEFF, 2003).

Um dos critérios de seleção de variáveis e redução da dimensionalidade dos dados na LDA, denomina-se método de lambda de Wilks, que é um teste estatístico bastante utilizado em análise multivariada de variância (MANOVA) para avaliar se existem diferenças entre as médias dos grupos selecionados, através de combinações das variáveis dependentes presentes no conjunto de dados. Este teste funciona, em problemas multivariados, de forma semelhante ao teste F de Fisher, em problemas univariados (BRERETON, 2013b; GUYON; ELISSEEFF, 2003; KSHIRSAGAR, 2004).

O lambda de Wilks é uma medida direta da variância calculada a partir da combinação das variáveis dependentes, no qual não é contabilizada pelas variáveis de classe em um dado problema. Se a variância calculada for grande, sugere-se que há um efeito relacionado com a informação de classe, indicando que há diferenças estatisticamente significativas entre as médias obtidas para cada grupo, tornando estas variáveis, importantes para o processo de

classificação das amostras em estudo (BRERETON, 2013b; GUYON; ELISSEEFF, 2003; KSHIRSAGAR, 2004). A equação 2 apresenta a expressão matemática para determinação do lambda de Wilks, na qual SQ_g é a soma quadrática residual das amostras dentro de um grupo e SQ_{total} é a soma quadrática residual total de cada grupo (BRERETON, 2013b; GUYON; ELISSEEFF, 2003; KSHIRSAGAR, 2004).

$$\Lambda = \frac{SQ_g}{SQ_{total}} \quad \text{Equação 2}$$

Uma vez obtidas, as variáveis discriminantes podem ser usadas para a construção das funções lineares, que podem ser definidas de forma geral através da equação 3 (BRERETON, 2013b; GUYON; ELISSEEFF, 2003; KSHIRSAGAR, 2004).

$$FD_n = \alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n \quad \text{Equação 3}$$

na qual, FD_n é a função discriminante, α é o intercepto, x_i são as variáveis discriminantes e $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots, \beta_n$ são os coeficientes discriminantes para cada variável utilizada no modelo (BRERETON, 2013b; GUYON; ELISSEEFF, 2003; KSHIRSAGAR, 2004).

Em diversos softwares, o algoritmo do LDA baseia-se na função discriminante linear de Fisher. Neste tipo, a função linear é utilizada para classificar as observações nos grupos, assim os valores das variáveis discriminantes de uma observação são inseridos nas funções de classificação e, conseqüentemente, um escore de classificação é calculado para cada grupo, para aquela observação, como pode ser mostrado na Figura 17. A equação 4, descreve este tipo de função (BRERETON, 2013b; GUYON; ELISSEEFF, 2003; KSHIRSAGAR, 2004).

$$FD_n^{Fisher} = \mathbf{p}_1 x_1 + \mathbf{p}_2 x_2 + \dots + \mathbf{p}_n x_n \quad \text{Equação 4}$$

Em que $\mathbf{p}$ representa o vetor dos pesos das variáveis para as funções discriminantes e são estimados que a variabilidade dos valores de escore obtidos pela função discriminante seja máxima entre os grupos e mínima dentro de cada grupo (BRERETON, 2013b; GUYON; ELISSEEFF, 2003; KSHIRSAGAR, 2004).

A análise por discriminantes lineares possui diversas limitações (BRERETON, 2013b; GUYON; ELISSEEFF, 2003; KSHIRSAGAR, 2004).

Nesta perspectiva, deve-se ter bastante cuidado com a qualidade dos dados a serem utilizados, pré-processamentos adotados, tamanho amostral, entre outros, para fins de não comprometer os modelos de classificação a serem criados a partir deste formalismo.

2.3.3 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e a sua variação ortogonal (OPLS-DA)

Em diversas áreas das ciências da natureza, problemas envolvendo classificação de amostras sempre se colocam como desafios, tanto em termos de discriminação entre grupos, quanto no entendimento sobre o que torna os grupos distintos em sua essência. Na literatura, diversos métodos vêm sendo desenvolvidos com este objetivo. Estratégias como o SIMCA (Soft Independent Modeling Classification Analysis), Análise por Discriminantes Lineares, LDA, Regressão por mínimos quadrados parciais, PLS, são exemplos de métodos utilizados para fins de classificação. A escolha do método a ser adotado deve estar intrinsicamente relacionada com a importância do poder de discriminação e a capacidade de interpretação das mudanças químicas ou biológicas associadas às diferenças entre os grupos estudados.

A regressão por mínimos quadrados parciais, PLS, é um método multivariado que busca encontrar uma relação entre uma matriz de dados $\mathbf{X}$ contendo dados clínicos, espectrais, entre outros, com uma matriz de resposta, $\mathbf{Y}$. Na Figura 18, temos uma representação esquemática da regressão por mínimos quadrados parciais, destacando-se as matrizes $\mathbf{X}$ e $\mathbf{Y}$ (BRERETON, 2013b; BUYDENS et al., 1999b; CONSONNI; CAGLIANI, 2010; JURS, 1986; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001b).

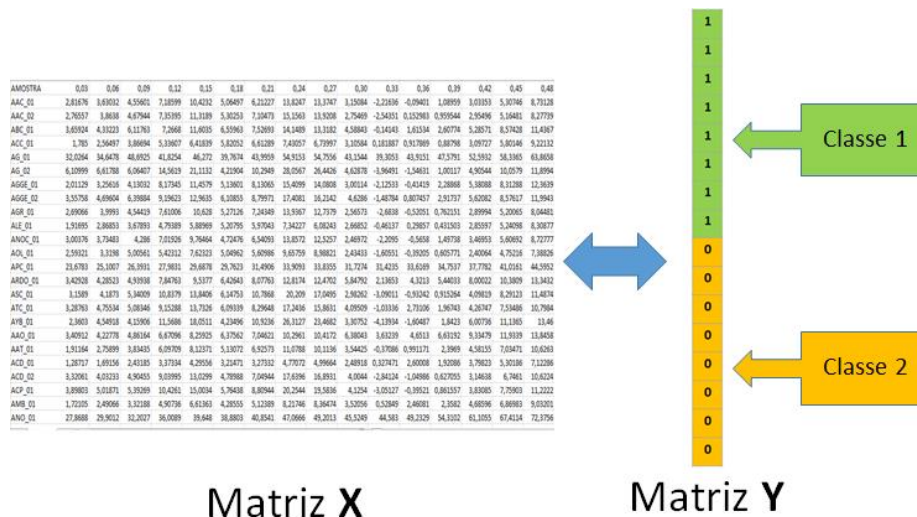


Figura 18. Representação esquemática do algoritmo PLS, contendo a matriz de dados **X**, e a matriz resposta **Y**.

O algoritmo PLS, de forma semelhante à PCA, é uma técnica fundamentada na construção de um modelo linear dos dados, no qual calcula-se os autovetores da matriz de dados originais, **X**, contendo a maior variância dos dados, componentes PLS, que descreva a correlação entre a matriz de dados **X** e as informações de interesse, matriz resposta **Y** (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001a). As equações matriciais que definem a técnica PLS são descritas abaixo (Equação 5 e 6):

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P} + \mathbf{E} \quad \text{Equação 5}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T} \mathbf{Q} + \mathbf{F} \quad \text{Equação 6}$$

P e **Q** são vetores semelhantes ao vetor de pesos, construídos através do algoritmo NIPALS; **T** é a matriz contendo as componentes PLS utilizadas no modelo, sendo que os dados neste caso, não estão normalizados e as matrizes **E** e **F**, são os resíduos deixados pelos modelos (BRERETON, 2013a; VANDEGINSTE; SIELHORST; GERRITSEN, 1988).

A regressão PLS é bastante utilizada no campo da calibração multivariada, quando a matriz resposta é constituída por dados quantitativos, mas seu uso vem tendo bastante aceitação no meio acadêmico, quando a matriz resposta possui dados qualitativos, informações de classe, sendo denominada regressão por mínimos quadrados parciais acoplado à análise discriminante, PLS-DA (BRERETON, 2013b; BUYDENS et al., 1999b;

CONSONNI; CAGLIANI, 2010; JURS, 1986; WESTERHUIS et al., 2008; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001b).

O formalismo PLS-DA é uma técnica supervisionada que é usada para otimizar a separação entre diferentes grupos de amostras, na qual é relacionada por duas matrizes, $\mathbf{X}$ (usualmente, contendo dados espectrais) e uma matriz $\mathbf{Y}$ (contendo informações de classe referente a cada amostra utilizada no estudo). Esta técnica, comporta-se como uma extensão da regressão PLS, relacionando informações da componente PLS1, que relaciona a dependência dos dados espectrais com a componente PLS2, que contém informações das variáveis categóricas a serem usadas no devido estudo. Esta estratégia fundamenta-se na maximização da covariância (ou correlação) entre as variáveis independentes, contidas na matriz $\mathbf{X}$, e as variáveis dependentes, nas quais correspondem as informações de classe, contidas na matriz $\mathbf{Y}$, de um conjunto de dados multidimensional, buscando um subespaço linear das variáveis latentes explanatórias, componentes PLS (BRERETON, 2013b; GROMSKI et al., 2015; TAPP; KEMSLEY, 2009; TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006).

Tipicamente, os resultados de classificação obtidos com PLS-DA superam os valores obtidos com a estratégia SIMCA, desde que a variabilidade dentro de cada classe seja baixa, maximizando a separação entre as classes estudadas. A estratégia PLS-DA vem sendo largamente utilizada em ciências ômicas, como Metabonômica/Metabolômica, transcriptômica, entre outras. Uma das dificuldades encontradas nesta técnica, está relacionada ao seu fundamento, no qual explica as diferenças globais entre as classes estudadas, e a sua interpretação fica comprometida quanto maior for número de classes em um determinado estudo (BRERETON, 2013b; BUYDENS et al., 1999b; CONSONNI; CAGLIANI, 2010; JURS, 1986; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001, 2003; WESTERHUIS et al., 2008; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001b).

Em modelos empíricos, torna-se essencial a determinação do número adequado de componentes PLS a serem utilizadas para modelar um conjunto de dados. Naturalmente, a matriz $\mathbf{X}$ (quando constituída por dados espectrais) possui, dados altamente correlacionados, e com a utilização de um número

elevado de variáveis latentes, pode resultar na construção de sistemas “super-ajustados”, obtendo assim, modelos com baixo ou nenhum poder de predição (BRERETON, 2013a; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001b).

Uma das vantagens em utilizar o formalismo PLS-DA está associada à possibilidade de avaliação de dados altamente correlacionados e ruídos presentes em dados espectrais. Pode-se obter diversas informações estatísticas, como contribuição de cada variável para a construção dos modelos, pesos, os valores VIP (do inglês, *variance importante on projection*) e coeficientes de regressão que podem ser usados para identificação das variáveis mais importantes. Além de obter uma interpretação visual de forma direta e fácil, a partir de dados complexos, em uma dimensão menor, que ilustra a separação entre duas classes distintas (BRERETON, 2013b; GROMSKI et al., 2015; TAPP; KEMSLEY, 2009; TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006).

Em diversos estudos analíticos, recomenda-se que para validação de modelos empíricos deve-se construir dois conjuntos de dados, um conjunto de calibração e um conjunto de validação. A seleção das amostras que deverão compor cada conjunto deve ser feita de forma randômica e aleatória. Existem diversos algoritmos para este fim, como Kernard-Stone, Jack-Knife, entre outros (BRERETON, 2013a; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001b).

Em estudos metabonômicos, sejam clínicos ou em alimentos, enfrentam-se problemas quanto a obtenção de um grande número de amostras devido a frequência com que uma determinada doença ocorre, a dificuldade na coleta, preservação das características amostrais, entre outros. Tornando o uso do método de validação supracitado impraticável. Deste modo, é frequente o uso de Validação Cruzada para validar modelos empíricos que possuem um baixo número amostral (BRERETON, 2013b; TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006; WESTERHUIS et al., 2008).

A validação cruzada (CV) é um teste confiável e bastante utilizado para avaliação do poder de predição de modelos estatísticos. Em seu fundamento, a CV é feita através da divisão dos dados em um número definido de grupos (classe), no qual constrói-se diversos modelos paralelos com a matriz de dados reduzida, em que sempre, uma quantidade definida de amostras, é retirada por vez, a ser definido pelo usuário, para a construção destes modelos. Após esta

construção, calcula-se a diferença entre o valor atual e o valor predito pelo modelo associado a(s) amostra(s) que foi (foram) excluída(s) durante a elaboração do PLS (BRERETON, 2013a; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001b).

Na validação cruzada LOOCV (do inglês *Leaving-One-Out-Cross Validation*), são construídos n modelos PLS, com $(n-1)$ amostras, usando as mesmas variáveis utilizadas no modelo original. Por fim, a amostra retirada é classificada pelo modelo criado com $(n-1)$ amostras. Com isso, é possível medir o poder preditivo do modelo. Esta ação se repete para todas as amostras, até obter uma resposta global dos dados analisados. Dessa forma, os resultados são apresentados em função de três parâmetros: R^2 , Q^2 e exatidão (BRERETON, 2013a; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001b). A Figura 19 apresenta, de forma esquemática, a estratégia LOOCV.

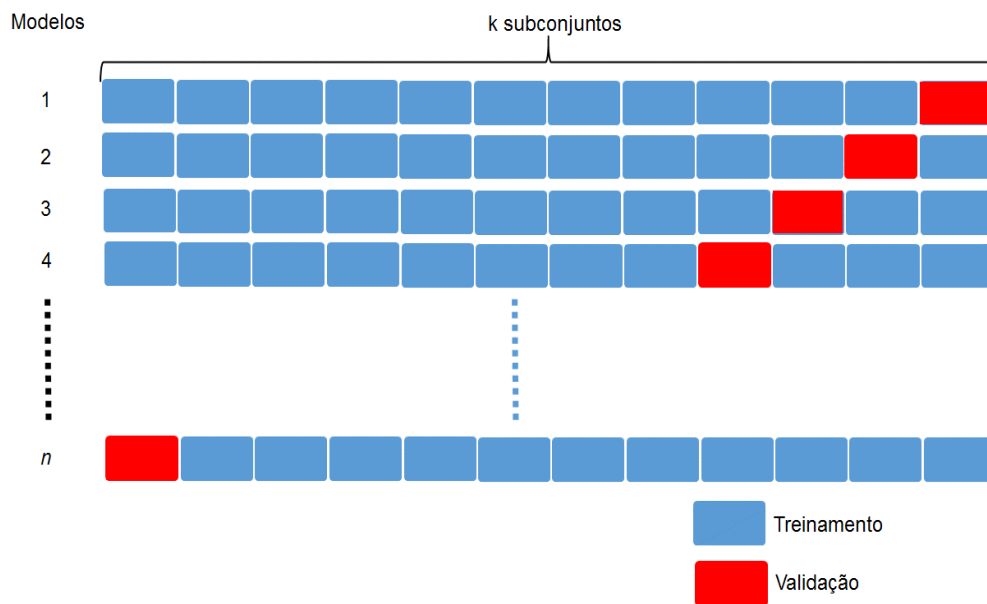


Figura 19. Representação esquemática da validação cruzada (LOOCV).

A soma quadrática residual dos erros associados a predição ($SQ_{r,pred}$) é calculada e acumulada para todos os modelos paralelos construídos, no qual estima-se a habilidade de predição do modelo. Frequentemente, esta medida pode ser expressa em forma de Q^2 , que é semelhante ao cálculo de R^2 , na qual relaciona-se com o processo de predição durante a validação cruzada, no qual calcula-se pela equação 7.

$$Q^2 = 1 - \left(\frac{SQ_{r,pred}}{SQ_T} \right) \quad \text{Equação 7}$$

Para avaliação de modelos empíricos baseados na PLS-DA, valores de R^2 e Q^2 devem ser elevados. Em boa parte dos casos, R^2 será maior do que Q^2 , e modelos que apresentarem valores pequenos e até mesmo negativos de Q^2 , terão poderes de predição comprometidos ou até mesmo inexistentes (BRERETON, 2013a; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001b).

A correção ortogonal do sinal (OSC), do inglês *orthogonal signal correction*, é uma técnica de pré-processamento usualmente aplicada a dados espectrais (IV, UV, RMN, entre outros), inicialmente proposta por Wold e colaboradores (WOLD, 1995; WOLD; SJÖSTRÖM, 1998). A regressão por mínimos quadrados parciais em componentes ortogonais (do inglês, *Orthogonal Partial Least Squares*) é uma extensão da regressão PLS, acoplada à técnica de pré-processamento, OSC. Em outras palavras, a regressão OPLS usa a informação da matriz resposta Y , para decompor as informações da matriz X em dados correlacionados e não-correlacionados (ortogonais) à matriz Y , respectivamente (WOLD, 1995; WOLD; SJÖSTRÖM, 1998).

A regressão OPLS, de forma análoga ao formalismo PLS-DA, pode ser utilizada como ferramenta de discriminação/classificação de amostras (OPLS-DA). Esta estratégia vem ganhando diversas aplicações em estudos ômicos, em diversas áreas do conhecimento (WOLD, 1995; WOLD; SJÖSTRÖM, 1998).

Usando a forma matricial, temos que o formalismo OPLS-DA usa a informação contida na matriz Y categórica, para decompor a matriz de dados X , em três partes distintas descritas na Equação 8.

$$X = T_p P_p^T + T_o P_o^T + E \quad \text{Equação 8}$$

Onde, a matriz T_p representa as componentes PLS preditivas para a matriz X , P_p é a matriz associada aos pesos da componentes PLS preditivas para a matriz X , T_o é a matriz das componentes ortogonais associadas a matriz Y , P_o é a matriz que representa os pesos das componentes ortogonais associadas a matriz Y e E está associada a matriz que contém os erros residuais do modelo (Figura 20) (BRERETON, 2013b; JURS, 1986; MALWADE et al., 2013; TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2006; WOLD, 1995).

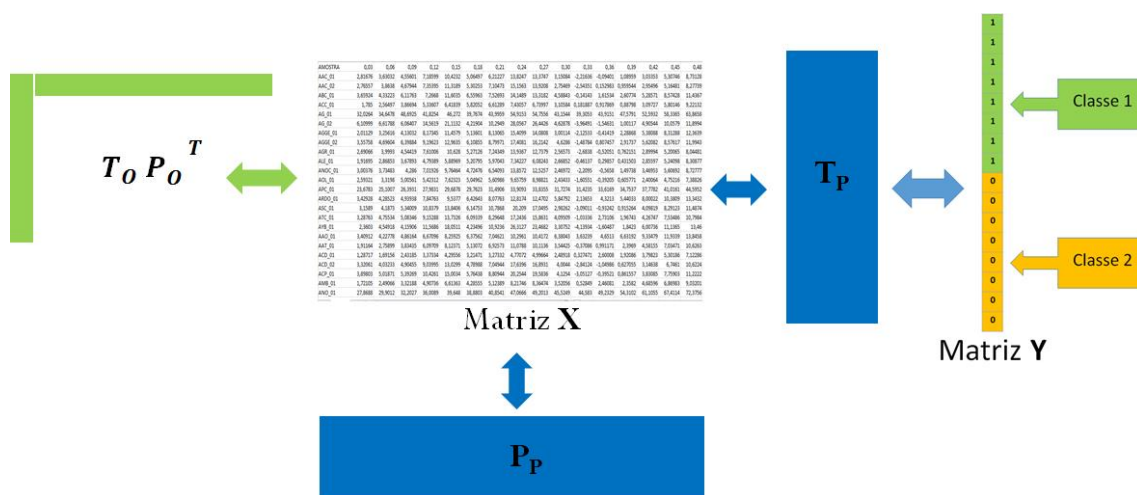


Figura 20. Representação esquemática algoritmo que fundamenta o formalismo OPLS-DA.

2.4 Avaliação de Testes de Diagnósticos

Na rotina clínica, o médico se depara frequentemente com processos de análises de dados multivariados e diagnósticos. Estes são apresentados a partir dos resultados obtidos através dos exames de rotina (hemograma, urinalise, ultrassonografias, imagens obtidas por ressonância magnética, reação da cadeia polimerase (PCR), entre outros), juntamente com a *anamnese* física do paciente. Com isso, o médico precisa, de forma contínua, tomar decisões baseadas em conceitos probabilísticos, elaborar e avaliar, a partir dos diversos parâmetros obtidos, e propor um tratamento eficaz para uma determinada doença, se for o caso.

O diagnóstico é um processo que inclui um razoável grau de incerteza, que é aumentado ou diminuído na dependência de um bom juízo crítico por parte dos médicos, além de um sólido conhecimento da literatura médica. Assim, a prática médica moderna utiliza-se das leis da probabilidade como um importante auxiliar na interpretação dos testes de diagnósticos (ANDRADE, ALSS., ZICKER, F., 1997; BARROS, 2006; BONITA R; BEAGLEHOLE R; KJELLSTRÖM, 2006; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

O que as estratégias ômicas se propõem a fazer é auxiliar o médico na tomada de decisão, buscando otimizar o tempo para o diagnóstico e, por conseguinte, aumentar as chances de sucesso no tratamento.

A avaliação de um teste diagnóstico sempre utiliza outro teste teoricamente melhor que aquele a ser proposto, denominado padrão-ouro. De forma idealizada, o padrão-ouro não deveria apresentar resultados falsos, ou seja, possuir 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Na prática, não existe este tipo de teste, por isso assume-se para fins operacionais que o teste padrão-ouro é aquele disponível capaz de produzir o menor erro de classificação possível (ANDRADE, ALSS., ZICKER, F., 1997; BARROS, 2006; BONITA R; BEAGLEHOLE R; KJELLSTRÖM, 2006; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

Para fins de avaliação de um teste diagnóstico, alguns parâmetros são utilizados como figura de mérito do mesmo. São eles: sensibilidade (*s*), especificidade (*e*), valor preditivo positivo (*VPP*), valor preditivo negativo (*VPN*) e exatidão (*P*). Na Tabela 2, temos uma forma comum de apresentar os resultados de um teste diagnóstico, que possibilita determinar os valores desses parâmetros.

Tabela 2. Resultados possíveis para um teste diagnóstico

Teste	Padrão-ouro (Doença)		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

A partir das informações contidas na Tabela 2, é possível estimar os valores dos parâmetros citados, conforme as equações de 9 a 13 (ANDRADE, ALSS., ZICKER, F., 1997; BARROS, 2006; BONITA R; BEAGLEHOLE R; KJELLSTRÖM, 2006; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

$$VPP = \frac{a}{a+b}$$

Equação 9

É a proporção de verdadeiros-positivos entre todos os indivíduos com teste positivo.

$$VPN = \frac{d}{c+d}$$

Equação 10

É a proporção de verdadeiros-negativos entre todos os indivíduos com teste negativo.

$$s = \frac{a}{a+c}$$

Equação 11

É a proporção de verdadeiros-positivos entre todos os doentes.

$$e = \frac{b}{b+d}$$

Equação 12


 É a proporção de verdadeiros-negativos entre todos os sadios.

$$P = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

Equação 13


 É a proporção de acertos de um teste diagnóstico.

Quando os resultados de um teste dicotômico são comparados com um padrão-ouro, estes podem ser sumarizados em uma tabela 2 x 2 (Tabela 2). A avaliação da qualidade de testes diagnósticos é um tema de interesse da investigação clínica e epidemiológica. Em pesquisa epidemiológica, "testes diagnósticos" são entendidos não apenas como exames laboratoriais, mas, também, referem-se a procedimentos diversos como interrogatório clínico, exame físico e novas propostas de métodos que possam ser utilizados na rotina clínica de forma rápida e eficaz. O desempenho de um teste diagnóstico depende da ausência de desvios da verdade (ausência de viés) e da precisão (o mesmo teste aplicado ao mesmo paciente ou amostra deve produzir os mesmos resultados), em termos da validade e reprodutibilidade do teste proposto (BARROS, 2006; BONITA R; BEAGLEHOLE R; KJELLSTRÖM, 2006; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

A validade de um teste refere-se a quanto, em termos quantitativos ou qualitativos, um teste é viável para diagnosticar um evento (validade simultânea ou concorrente) ou para predizê-lo (validade preditiva). Para determinar a validade, compara-se os resultados do teste com os de um padrão-ouro (Tabela 2). O padrão-ouro pode ser o verdadeiro estado do paciente, se a informação está disponível, um conjunto de exames julgados mais adequados, ou uma outra forma de diagnóstico que sirva de referência. O teste diagnóstico ideal deveria fornecer, sempre, a resposta correta, ou seja, um resultado positivo nos indivíduos com a doença e um resultado negativo nos indivíduos sem a doença. Além do que, deveria ser um teste rápido de ser executado, seguro, simples, inócuo, confiável e de baixo custo (BARROS, 2006; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

3. Aplicações Metabômicas usando RMN de ^1H – Diagnóstico não-invasivo de Câncer de Próstata, Bexiga e Rim

3.1 Câncer de Próstata, Bexiga e Rim

Normalmente, as células mantêm um estado normal chamado homeostase, no qual o meio intracelular é mantido dentro de uma faixa estreita de parâmetros fisiológicos. Quando encontram um estresse fisiológico ou um estímulo patológico, podem sofrer uma adaptação, alcançando um novo estado de equilíbrio, preservando sua viabilidade e função. As principais respostas adaptativas são hipertrofia, hiperplasia, atrofia e metaplasia. Se a capacidade adaptativa é excedida ou se o estresse externo é inerentemente nocivo, desenvolve-se uma lesão celular (Figura 21) (BRASIL, 2016; HALL; GUYTON, 2011; KUMAR et al., 2013; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

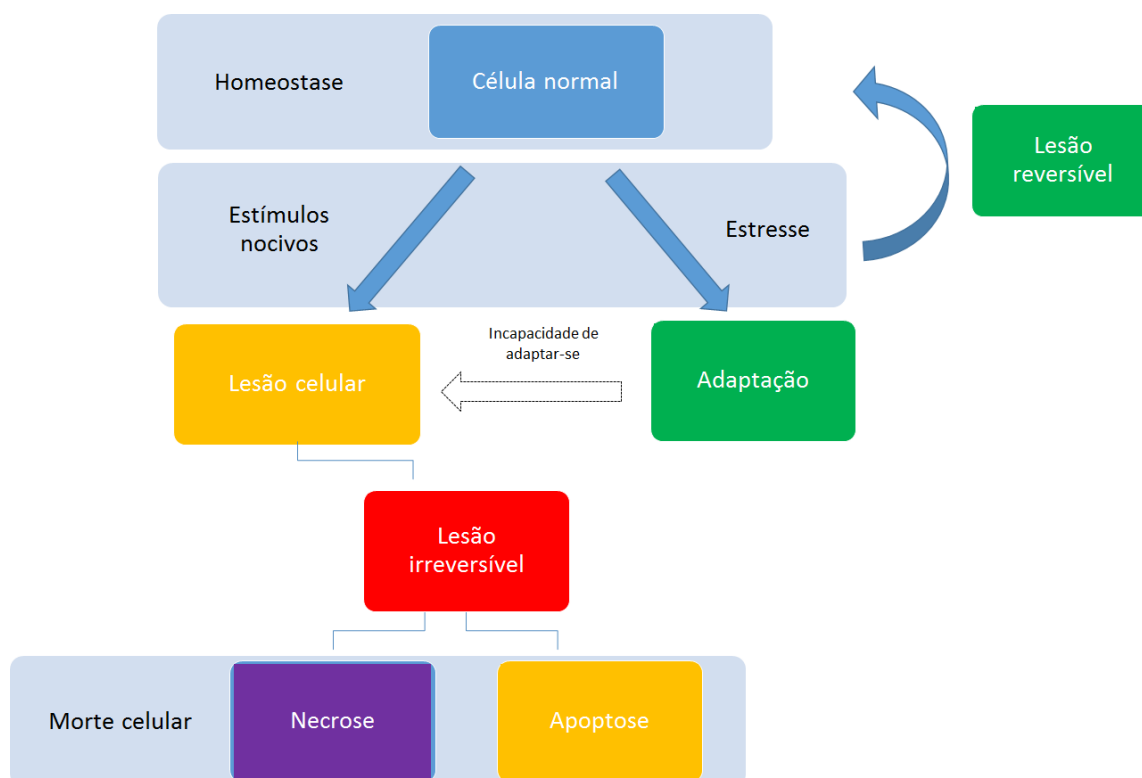


Figura 21. Representação esquemática dos processos envolvendo o surgimento de lesões irreversíveis à célula (adaptado de (KUMAR et al., 2013; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008)).

As adaptações são alterações reversíveis em número, tamanho, fenótipo, atividade metabólica ou das funções celulares em resposta às alterações no seu ambiente. As adaptações fisiológicas normalmente

representam respostas celulares à estimulação normal pelos mediadores químicos endógenos. As adaptações patológicas são respostas ao estresse que permitem às células modularem sua estrutura e função escapando, assim, da lesão (BRASIL, 2016; HALL; GUYTON, 2011; KUMAR et al., 2013; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

São exemplos de adaptações: a hipertrofia, que é caracterizada pelo aumento do tamanho da célula e do órgão, sempre em resposta ao aumento da carga de trabalho, induzida por fatores de crescimento produzidos em resposta ao estresse mecânico ou outros estímulos; a hiperplasia, definida pelo aumento do número de células em resposta a hormônios e outros fatores de crescimento; a atrofia, que se manifesta com a diminuição da célula e do órgão, como resultado da diminuição do suprimento de nutrientes ou por desuso; e a metaplasia, que se apresenta a partir da alteração do fenótipo em células diferenciadas, sempre em resposta a irritação crônica que torna as células mais capazes de suportar o estresse (BRASIL, 2016; HALL; GUYTON, 2011; KUMAR et al., 2013; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

O câncer é definido como uma neoplasia maligna, que possui vários atributos fenotípicos, como crescimento excessivo, invasividade local e capacidade de formar metástases distantes (progressão tumoral) (BRASIL, 2016; HALL; GUYTON, 2011; KUMAR et al., 2013; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004). A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas resultante do acúmulo de múltiplas alterações genéticas que, coletivamente, dão origem ao fenótipo transformado. Muitos cânceres surgem de lesões precursoras não neoplásicas, que as análises moleculares demonstraram que já possuem algumas das mutações necessárias para estabelecer um câncer plenamente. Presumivelmente, essas mutações proporcionam vantagens seletivas às células da lesão precursora. (HALL; GUYTON, 2011; KUMAR et al., 2013; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004)

As causas de câncer são diversas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (BRASIL, 2016; HALL; GUYTON, 2011; KUMAR et al., 2013; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, no Brasil, são estimados para o biênio 2016-2017, cerca de 420.000 novos casos de câncer, distribuídos entre homens e mulheres. Para os homens, a maior incidência de surgimento desta doença está associada à próstata (CP). São estimados 61.200 novos casos de câncer de próstata, 28,6% do total de homens. Enquanto, entre as mulheres, o câncer de mama corresponde a aproximadamente 57.960 novos casos, 28.1% da incidência de casos em mulheres. Estima-se que em Pernambuco, a taxa de surgimento desta doença seja, em média, igual a 61,73 para cada 100.000 habitantes. A Figura 22 apresenta a estimativa de incidência de casos de câncer de próstata, em 2016, por unidade da federação (BRASIL, 2016).

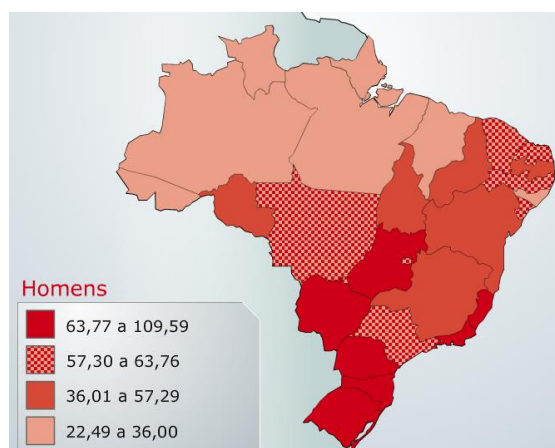


Figura 22. Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de próstata por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da próstata) (BRASIL, 2016).

Há diversos relatos clínicos e experimentais que sugerem diferentes fatores, desempenhando papéis fundamentais no surgimento desta doença. São eles: a hereditariedade, o descontrole hormonal, mutações somáticas e condições ambientais externas (BRASIL, 2016; HALL; GUYTON, 2011;

KUMAR et al., 2013; MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL., 2008; SCHRAMM et al., 2004).

O diagnóstico do câncer de próstata é feito associando o exame físico, através do toque retal; o volume da próstata, observado por ultrassonografia; e o nível sérico do antígeno prostático específico (PSA) (BRASIL, 2016; NICE, 2014). Este último é o exame mais utilizado como ferramenta de diagnóstico e controle do câncer de próstata, apesar de suas limitações (BRASIL, 2016; KUMAR et al., 2013; MOROTE; MALDONADO; MORALES-BÁRRERA, 2016; NICE, 2014; VENDERBOS; ROOBOL, 2011). Clinicamente, este antígeno, uma serinoprotease, é um produto do epitélio prostático normalmente secretado através do sêmen, cuja função é clivar e liquefazer o coágulo seminal formado depois da ejaculação.

Na literatura, há divergências acerca do ponto de corte nos níveis de PSA a ser utilizado para o diagnóstico de câncer. Alguns relatos, afirmam que níveis de PSA acima de 4 ng/mL é indicativo de câncer de próstata. Entretanto, teores abaixo desse valor não exclui a possibilidade de presença da doença. Em média, 15% dos homens que possuem níveis de PSA menores que 4 ng/mL são diagnosticados com câncer de próstata. De modo geral, homens com níveis de PSA entre 4-10 ng/mL, possuem 25% de chance para apresentação deste quadro clínico e para níveis acima de 10 ng/mL, há uma probabilidade de 50% para diagnóstico positivo desta anomalia. (ARAÚJO et al., 2017; BARRY DELONGCHAMPS, 2014; BRASIL, 2016; KUMAR et al., 2013; MOROTE; MALDONADO; MORALES-BÁRRERA, 2016; NICE, 2014; VENDERBOS; ROOBOL, 2011)

Uma limitação do uso do PSA para o diagnóstico está associada a sua não-especificidade frente ao câncer de próstata, pois outras comorbidades para este órgão, como hiperplasia benigna, prostatite, ejaculação, entre outras, provocam elevação nos níveis séricos do PSA, dificultando bastante o diagnóstico para o carcinoma. (ARAÚJO et al., 2017; BARRY DELONGCHAMPS, 2014; BRASIL, 2016; KUMAR et al., 2013; MOROTE; MALDONADO; MORALES-BÁRRERA, 2016; NICE, 2014; VENDERBOS; ROOBOL, 2011)

O padrão ouro utilizado na rotina clínica, para o diagnóstico do câncer de próstata está baseado na realização da biópsia prostática guiada por ultrassonografia transretal. Este tipo de exame é indicado quando há a elevação do PSA, nódulo palpável ou alteração na consistência da próstata. Embora novos métodos associados à biópsia convencional tenham sido estudados, este ainda reflete o melhor índice de positividade, em torno de 40%. Uma vez realizada a biópsia, ocorre a necessidade de estadiar e classificar o câncer da próstata para poder melhor indicar seu tratamento, sendo que, a sobrevida para pacientes diagnosticados com câncer de próstata tem correlação direta com o correto estadiamento, com a rapidez no diagnóstico e com a facilidade de monitorar sua evolução. (BARRY DELONGCHAMPS, 2014; BUSATO JR.; ALMEIDA, 2016; NICE, 2014; ROSS; COETZEE, 1996)

O estadiamento é feito a partir do exame histopatológico, podendo ser complementado por tomografia computadorizada transretal. Este tipo de câncer é classificado pelo sistema Gleason. De acordo com este sistema, os cânceres de próstata são estratificados em cinco graus com base nos padrões granulares de diferenciação. O grau I representa os tumores mais bem diferenciados, ao passo que os tumores de grau V não exibem qualquer diferenciação glandular. (BRASIL, 2016; KUMAR et al., 2013; MOROTE; MALDONADO; MORALES-BÁRRERA, 2016; NICE, 2014)

O câncer de próstata é o principal tipo de doença a atingir os homens, mas, entre os cânceres urológicos, os de bexiga e rim são bem mais frequentes que os cânceres de pênis e testículos. Aqui, ao citarmos câncer urológico, estamos fazendo menção aos cânceres de bexiga e rim, que foram investigados. No Brasil, estima-se que o câncer de bexiga (CB), no biênio 2016-2017, resulte em 3,4 % dos cânceres em homens, resultando em 7.200 novos casos. Este tipo de neoplasia tem sua incidência aumentada com a idade em ambos os sexos, sendo 2,5 vezes mais comum entre homens do que em mulheres. O surgimento desta doença torna-se mais frequente em pacientes com idades entre 60-70 anos, em média. O diagnóstico e acompanhamento deste tipo de doença é realizado através da cistoscopia transuretral (BRASIL, 2016; CHEUNG et al., 2013; GOODISON et al., 2012; RIBAL et al., [s.d.]; VAN DER MEIJDEN, 1998).

O câncer de rim (CR) corresponde a 2-3% de todas as neoplasias em adultos. No Brasil, a incidência desta neoplasia varia de 7 a 10 casos por 100.000 habitantes/ano, sendo duas vezes mais freqüente em homens. É mais prevalente na faixa etária dos 50 aos 70 anos de idade. Aproximadamente 40% dos pacientes com CR morrem devido à progressão da doença, tornando este tumor a lesão maligna urológica mais letal. Para fins de diagnóstico, exames de imagem como Ultrassonografia (USG), Tomografia Computadorizada (TC) e a biópsia renal percutânea são ferramentas bastante utilizadas para detecção e acompanhamento do câncer renal, apesar de algumas ressalvas quanto as suas especificidades frente a doença. (BRASIL, 2016; CAPITANIO; MONTORSI, 2016; JONASCH; GAO; RATHMELL, 2014)

Atualmente, surgem novas formas de diagnósticos para estas doenças que afetam o sistema urológico do ser humano. Em relação ao câncer de próstata, novos métodos não-invasivos foram propostos, como a transcrição gênica por sedimentos urinários, possui uma sensibilidade de 77% e especificidade de 67% (MENGUAL et al., 2016). Usando técnicas cromatográficas e análise multivariada, Aggio e colaboradores, propuseram o uso de modelos com valores de sensibilidade entre 78-96% e especificidade entre 96-100% para câncer de próstata e bexiga (AGGIO et al., 2016).

Diagnósticos baseados no uso da biópsia direta, que possui valores de especificidade e sensibilidade acima de 90% para o câncer de bexiga e/ou rim, devido a avaliação histopatológica direta.(BRASIL, 2016; CHEUNG et al., 2013; VAN DER MEIJDEN, 1998) Em relação ao câncer de bexiga, métodos não-invasivos como a citologia oncótica, a sensibilidade pode variar de 21-53% dependendo do grau de diferenciação do tumor. Outro método não-invasivo, denominado transcrição gênica por sedimentos urinários possui sensibilidade de 81,5% e especificidade de 91,3% (BRASIL, 2016; CHEUNG et al., 2013; VAN DER MEIJDEN, 1998). Para o caso específico do câncer de rim, a biópsia guiada por imagem, TC, possui uma sensibilidade de 98% e especificidade de 100%, apesar de ser um exame extremamente invasivo (BRASIL, 2016; CAPITANIO; MONTORSI, 2016; JONASCH; GAO; RATHMELL, 2014).

Por este cenário, necessita-se o desenvolvimento de ferramentas capazes de detectar este tipo de carcinoma, de forma específica, rápida e não-

invasiva. Nesse sentido, a metabonômica baseada na espectroscopia de ressonância magnética nuclear torna-se uma forte candidata para ajudar a solucionar este tipo de problema clínico.

3.2 Hipótese

A hipótese admitida é que a estratégia metabonômica é capaz de discriminar pacientes diagnosticados clinicamente com câncer de próstata, bexiga ou rim de voluntários saudáveis, usando dados espectrais de RMN de ^1H .

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver modelos metabonômicos, utilizando espectros de RMN de ^1H a partir de amostras biológicas, soro e urina, para o diagnóstico do câncer de próstata e câncer urológico.

3.3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar quais ferramentas de análise multivariada melhor se aplica aos dados coletados – PCA, PLS-DA, OPLS-DA e LDA, e construir modelos metabonômicos para o diagnóstico do câncer de próstata e câncer urológico (câncer de bexiga ou rim);
- ✓ Identificar diferenças nos perfis metabonômicos de pacientes diagnosticados clinicamente com carcinoma de próstata e voluntários saudáveis, a partir de amostras de urina e soro;
- ✓ Identificar diferenças nos perfis metabonômicos de pacientes diagnosticados clinicamente com carcinoma urológico de voluntários saudáveis, a partir de amostras de urina;
- ✓ Selecionar as variáveis discriminantes (amostras de urina e soro) em cada modelo metabonômico e identificar quais metabólitos endógenos estão associados às possíveis discriminações a serem observadas no presente estudo.

3.4 Materiais e Métodos

Este estudo trata-se de um projeto piloto, embasado pelos preceitos éticos regidos pela Resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob através do parecer 728.780. Todos os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todos os voluntários, à exceção do grupo controle, deveriam ser portadores de neoplasia única, sem tratamento inicial e não ter outro câncer ativo. As amostras de soro e urina foram coletadas previamente, no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFPE, onde foram realizadas todas as determinações de rotina. As amostras de cada paciente foram encaminhadas à Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H .

Como critério de inclusão, os voluntários saudáveis (controle), foram selecionados, no Ambulatório de Prevenção Urológica, aqueles que não possuíam nenhuma doença urológica ou câncer de qualquer natureza. Os voluntários participantes que possuíam câncer de próstata, foram diagnosticados por meio de biópsia prostática transretal e não tinham iniciado nenhum tratamento. Os voluntários que possuíam câncer de bexiga, foram diagnosticados por citoscopia e biópsia e que não haviam iniciado nenhum tipo de tratamento prévio. Os voluntários que possuíam câncer de bexiga, foram diagnosticados através de exames clínicos e confirmados através da análise anatomopatológica.

Para o estudo com amostras de soro, foram utilizadas 23 amostras de voluntários, assim distribuídos: grupo controle, contendo 11 amostras; e 12 pacientes diagnosticados com câncer de próstata.

Para análise das amostras de soro, foram utilizados 400 μL da amostra adicionados a 200 μL de D_2O , em tubo de RMN de 5 mm de diâmetro. Os sinais do espectro foram referenciados a partir do sinal atribuído ao grupo lactato (δ 1,33 ppm). Foram obtidos espectros utilizando espectrômetro VNMRS400, operando a 399,99 MHz, para o núcleo de ^1H . A sequência de

pulsos de RF utilizada foi a PRESAT, com janela espectral 6,4 kHz, tempo de espera (d1) igual a 2,0 s, tempo de aquisição igual a 2,556 s, pulso de radiofrequência (RF) de 90°, 64 repetições e temperatura de 25 °C. A sequência CPMG (como filtro de T₂), com supressão do sinal da água foi utilizada com janela espectral 6,4 kHz, tempo de espera (d1) igual a 2 s, tempo de aquisição igual a 2,556 s, com 88 ciclos e 128 repetições. Os espectros foram processados usando *line broadening* igual a 0,3 Hz. Após a análise espectroscópica, as amostras foram devolvidas ao Laboratório Central do HC-UFPE para descarte. Os espectros de RMN de ¹H tiveram suas linhas de base e fases ajustadas manualmente. Cada espectro foi dividido em pequenas regiões, bins, utilizando o software *MestreNova 9.0*, sendo definidos em intervalos de 0,04 ppm entre os δ 0,00 e 8,00 ppm, resultando em 172 bins, excluindo a região entre δ 4,40 a 5,50 ppm, onde são observados o sinal da água. Os dados foram dispostos numa matriz para tratamento quimiométrico (metabonômico).

Para o estudo com amostras de urina foram utilizadas 30 amostras de voluntários, assim distribuídos: grupo controle, contendo 08 voluntários saudáveis; 12 pacientes diagnosticados com câncer de próstata; 05 pacientes diagnosticados com câncer de bexiga; e 05 pacientes diagnosticados com câncer renal.

Para a obtenção dos espectros de RMN de ¹H foram utilizados 400 µL de urina, *in natura*, adicionados a 200 µL de solução-tampão (Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ – 0,2 mol L⁻¹ em D₂O), em tubo de RMN de 5 mm de diâmetro. Após homogeneização, os espectros de RMN foram obtidos utilizando o espectrômetro VNMRs400, operando a 399,99 MHz, para o núcleo de ¹H. A sequência de pulsos de RF utilizada foi a PRESAT, com janela espectral 6,4 kHz, tempo de espera (d1) igual a 2,0 s, tempo de aquisição igual a 2,556 s, pulso de radiofrequência (RF) de 90°, 64 repetições e temperatura de 25 °C. Os espectros foram processados com *line broadening* igual a 0,3 Hz. Após a análise espectroscópica, as amostras foram armazenadas em um recipiente limpo de âmbar, para futuro descarte adequado. Os espectros foram processados usando o software *MestreNova 9.0*. Os espectros tiveram suas linhas de base e fases ajustadas manualmente. O simpleto, com deslocamento

químico (δ) em 3,05 ppm, foi atribuído ao grupo metil da creatinina e usado como referência interna de δ . Os espectros foram divididos em regiões, bins, em intervalos de 0,05 ppm entre δ 0,0 – 9,0 ppm, resultando em 150 bins, sendo excluído a região entre δ 4,2 – 6,4 ppm, na qual contém os sinais atribuídos à água e a ureia.

Utilizando-se o programa *SIMCA 13.1* e a plataforma online *MetaboAnalyst 3.0*, foram construídos os modelos baseados na Análise por Componentes Principais (PCA), Regressão por mínimos quadrados parciais acoplado a Análise por Discriminantes (PLS-DA) e a sua variante ortogonal (OPLS-DA). A Análise por discriminantes lineares (LDA) foi realizada utilizando-se o programa *Statistica 10.0*. Para validar os modelos, devido ao número baixo de amostras obtidas, optou-se pela técnica de validação cruzada (LOOCV).

3.4.1 Pré-processamento dos dados

O pré-processamento utilizado neste trabalho foi a normalização pela soma. Este tipo de técnica, aplicado nas amostras (linhas) é obtida pela divisão de cada região do espectro (bin) pela respectiva soma total da área de integração do espectro (Equação 14). A proposta deste pré-processamento é obter dados que possam ser comparados entre si, sem alterar a informação contida nas variáveis, eliminando possíveis efeitos causados pela diluição, erro de adição de amostras, entre outros.

$$A_{ij}^{NS} = \frac{A_{ij}}{\sum_i^j A_{ij}} \quad \text{Equação 14}$$

Onde:

A_{ij}^{NS} = bin normalizado pela soma.

A_{ij} = bin original.

$\sum_i^j A_{ij}$ = soma das áreas de integração para cada amostra.

3.5 Resultados e Discussão

Para o estudo piloto, utilizando-se amostras de soro de voluntários saudáveis e pacientes diagnosticados com câncer de próstata, foram obtidos os espectros de RMN de ^1H , dos quais, não foi observado nenhuma diferença nítida entre os grupos estudados. A Figura 23 apresenta dois espectros obtidos para amostras de voluntários saudáveis e diagnosticados com CP.

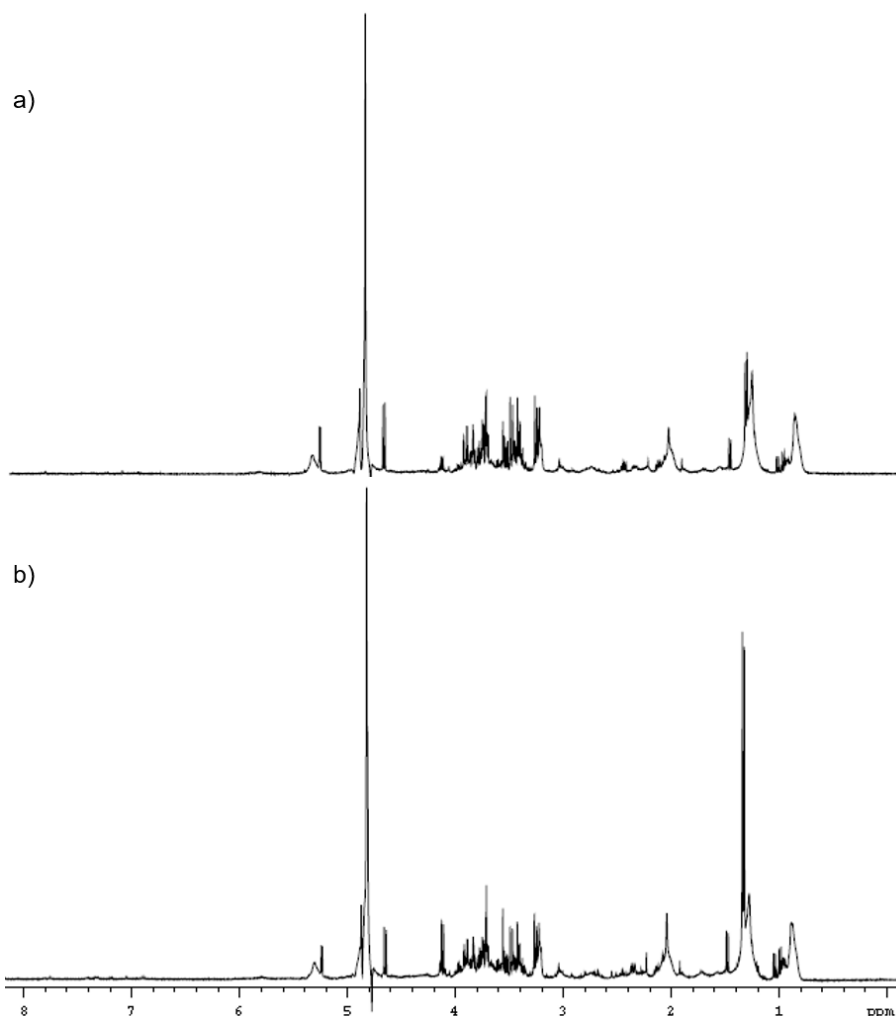


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H para a) voluntário saudável; b) paciente diagnosticado com câncer de próstata.

A análise por componentes principais (PCA) não resultou em agrupamentos nas classes de interesse (Figura 24). As duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) reuniram 62,3% da variância total dos dados.

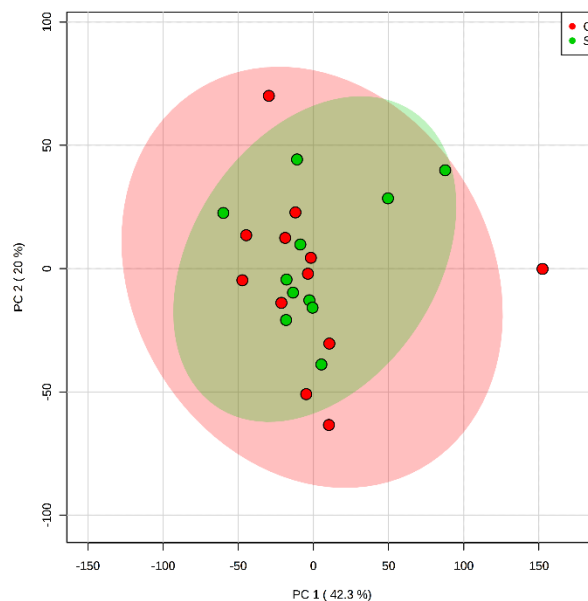


Figura 24. Panorama das duas primeiras componentes principais, reunindo 62,3% da variância explicada. Legenda: Bolinhas vermelhas representam os pacientes com câncer de próstata; as bolinhas verdes, voluntários saudáveis.

O modelo construído usando o formalismo PLS-DA não apresentou resultados satisfatórios. Porém, utilizando a variante ortogonal desse formalismo (OPLS-DA), pode-se observar uma tendência de separação entre as classes estudadas, mesmo ainda, ocorrendo uma região de confundimento entre as classes estudadas (Figura 25).

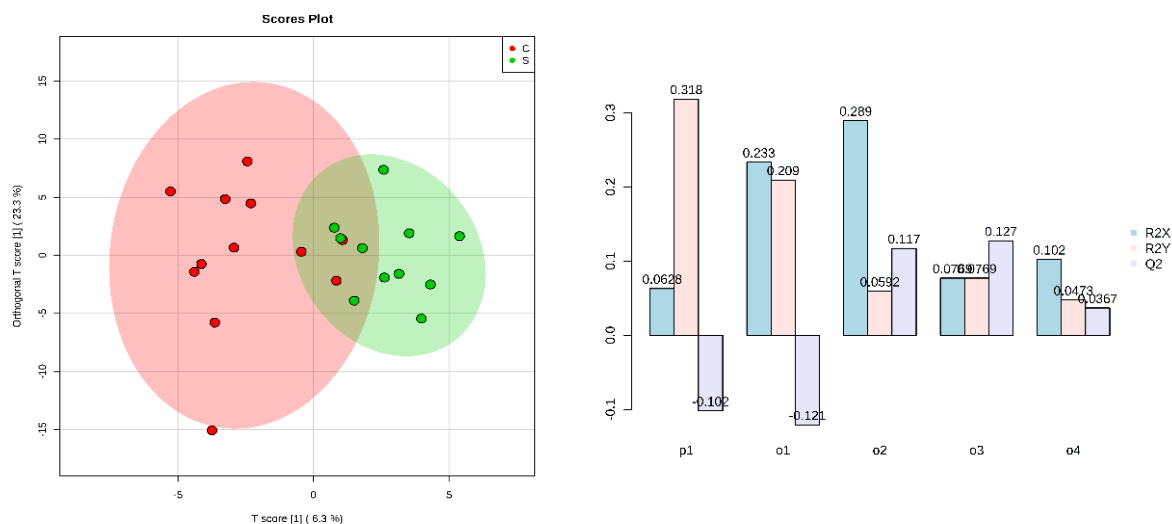


Figura 25. À esquerda, gráfico de escores OPLS-DA e, à direita, Gráfico com os valores de R^2X , R^2Y e Q^2 obtidos para o modelo OPLS-DA após a validação cruzada (LOOCV).

Na Figura 25, pode-se constatar que o formalismo OPLS-DA discrimina os grupos estudados, apesar de apresentar uma zona de confundimento, e os

valores de R^2X , R^2Y e Q^2 iguais a 76,26%, 71,04 % e 5,77%, respectivamente, para a primeira componente PLS junto com as quatro primeiras componentes ortogonais. Sendo estes valores considerados não-satisfatórios.

Usando o formalismo LDA, visando um melhor desempenho frente à classificação das amostras estudadas, voluntários saudáveis *versus* pacientes diagnosticados com câncer de próstata, construímos o modelo e estes resultados são sumarizados na Figura 26 e Tabela 3.

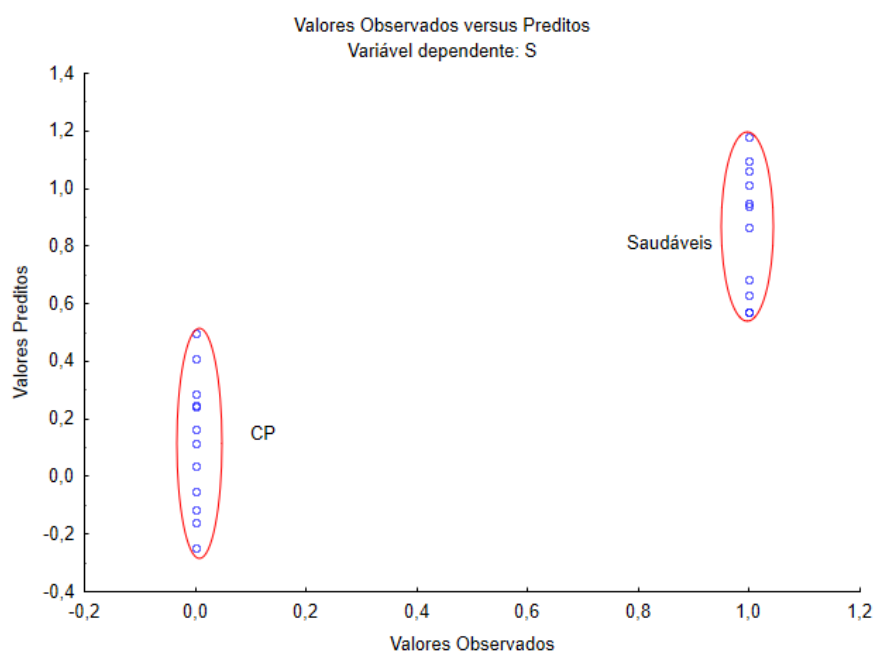


Figura 26. Gráfico dos escores obtidos na função discriminante (LDA).

Tabela 3. Matriz de Classificação e Validação cruzada (LOOCV) obtidos pela LDA com 4 variáveis.

Matriz de Classificação - LDA			
Modelo Metabonômico		CP	Saudável
		P = 0,5625	P = 0,4375
	CP	12	0
	Saudável	0	11
	Total	12	11
LDA após validação cruzada LOOCV (com 4 variáveis)			
Modelo Metabonômico		CP	Saudável
	CP	11	0
	Saudável	1	11
	Total	12	11

Os resultados indicam que modelo metabonômico baseado no formalismo LDA possui uma alta significância estatística ($p < 0,001$) com uso de 4 variáveis discriminantes. Com isso, os parâmetros de avaliação de diagnósticos puderam ser obtidos. Os valores preditivos positivo e negativo, VPP e VPN, foram iguais a 100% e 91,7%, respectivamente. Os valores de sensibilidade e especificidade foram de 91,7% e 100%, respectivamente, após a validação cruzada.

As variáveis discriminantes associadas à classificação das amostras em estudo, foram os deslocamentos químicos (δ): 0,16 ppm; 1,56 ppm; 2,68 ppm; 7,80 ppm. Investigando na literatura e em diversos bancos de dados envolvendo informações diversas relacionadas com o metaboloma humano, como HMDB (do inglês, Human Metabolome Database), em conjunto com outros trabalhos já publicados (ARMSTRONG et al., 2012; BARAN et al., 2006; DONA, 2016; DONA et al., 2016; EVERETT, 2015; JUNG; HYEON; HWANG, 2016; PSYCHOGIOS et al., 2011; VERWAEST et al., 2011; WISHART; KNOX; GUO, 2009) pode-se chegar a algumas atribuições.

O sinal em $\delta 1,56$ ppm foi atribuído aos grupamentos metilênicos ($-\text{CH}_2-$) pertencentes às estruturas lipídicas (VLDL e/ou LDL). O sinal em $\delta 2,68$ ppm a um dos hidrogênios do grupo citrato e o sinal em $\delta 7,80$ ppm pode ser atribuído aos hidrogênios aromáticos da L-histidina (Figura 27). Ainda por meio destes resultados, observou-se que o valor médio da concentração relativa do sinal em $\delta 7,80$ ppm apresenta-se em menor valor, para amostras de pacientes com câncer de próstata, quando comparado com as amostras dos voluntários saudáveis. O sinal em $\delta 0,16$ ppm não pode ser atribuído a nenhuma estrutura conhecida;

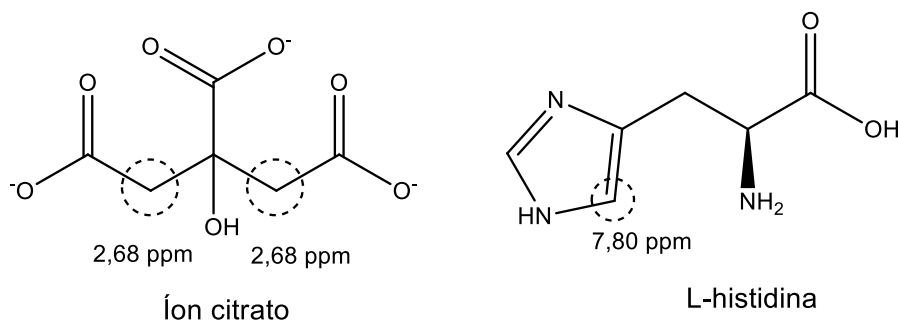


Figura 27. Estruturas do íon citrato e da L-histidina. Em destaque, os sinais atribuídos e associados à discriminação observada no modelo LDA – Câncer de próstata versus Voluntários saudáveis.

A mesma estratégia foi empregada para construir modelos usando amostras de urina. Não foram observados agrupamentos naturais nas classes de interesse. Também não foram observadas amostras anômalas. A modelagem usando os formalismos PLS-DA e OPLS-DA também apresentaram resultados insatisfatórios. Então, utilizamos o formalismo LDA, que resultou em um modelo muito promissor. A Figura 28 apresenta o gráfico valores observados versus preditos usando a função discriminante. A Tabela 4 apresenta a matriz de classificação para o modelo usando três variáveis (bins) discriminantes.

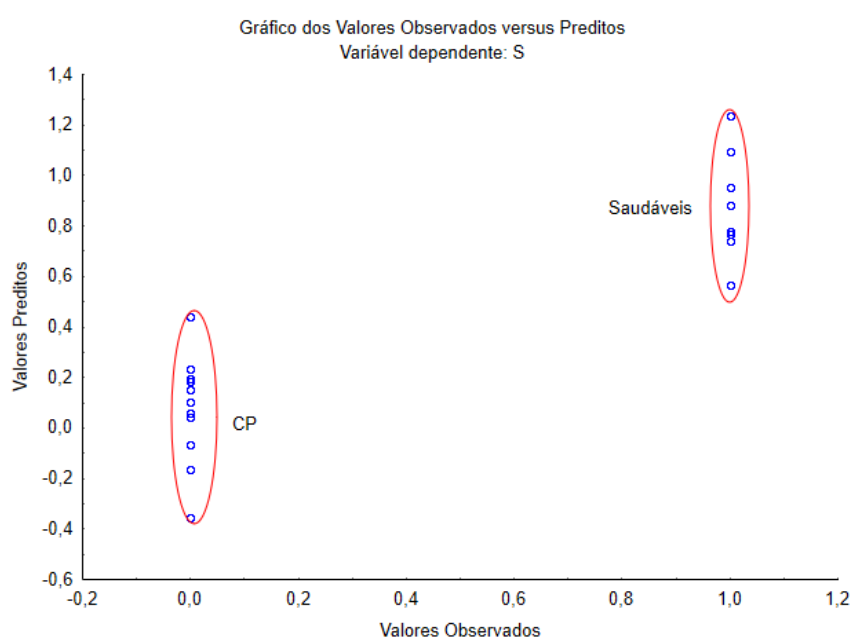


Figura 28. Gráfico dos escores obtidos na função discriminante (LDA) pelas amostras fornecidas por voluntários saudáveis e pacientes diagnosticados com câncer de próstata (CP).

Tabela 4. Matriz de Classificação e Validação cruzada (LOOCV) obtidos pela LDA.

Matriz de Classificação - LDA			
Modelo Metabonômico		CP P = 0,600	Saudável P = 0,400
	CP	12	0
	Saudável	0	8
	Total	12	8
LDA após validação cruzada LOOCV (com 3 variáveis)			
Modelo Metabonômico		CP	Saudável
	CP	12	1
	Saudável	0	7
	Total	12	8

Os resultados indicam que modelo metabonômico baseado no formalismo LDA possui uma alta significância estatística ($p < 0,001$) com uso de três variáveis discriminantes. Com isso, os parâmetros de avaliação de diagnósticos puderam ser obtidos. Os valores preditivos positivo e negativo, VPP e VPN, foram iguais a 92,3% e 100%, respectivamente. Os valores de sensibilidade e especificidade foram de 100% e 87,5%, respectivamente, após a validação cruzada.

As variáveis discriminantes associadas a classificação das amostras em estudo, foram os deslocamentos químicos (δ): 3,85 ppm; 4,30 ppm e 8,95 ppm. Buscando informações na literatura, pode se atribuir que: o δ 3,85 ppm pode ser associado ao grupo metileno presente em sacarídeos, enquanto os sinais em δ 4,30 e 8,95 ppm foram atribuídos ao grupo metila e a um dos hidrogênios do anel benzênico da trigonelina (Figura 29).

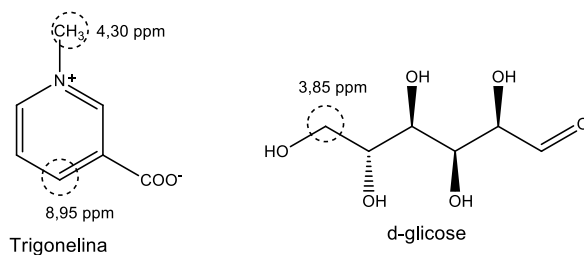


Figura 29. Estruturas da trigonelina e da *d*-glicose (exemplo de sacarídeo). Em destaque, os bins discriminates e suas atribuições.

Para o estudo piloto, envolvendo amostras de urina entre voluntários saudáveis (S) e pacientes diagnosticados com câncer de bexiga ou rim (CB/CR), os espectros de RMN de ^1H para os grupos, não apresentaram distinções claras entre as classes estudadas, conforme mostrado na Figura 30.

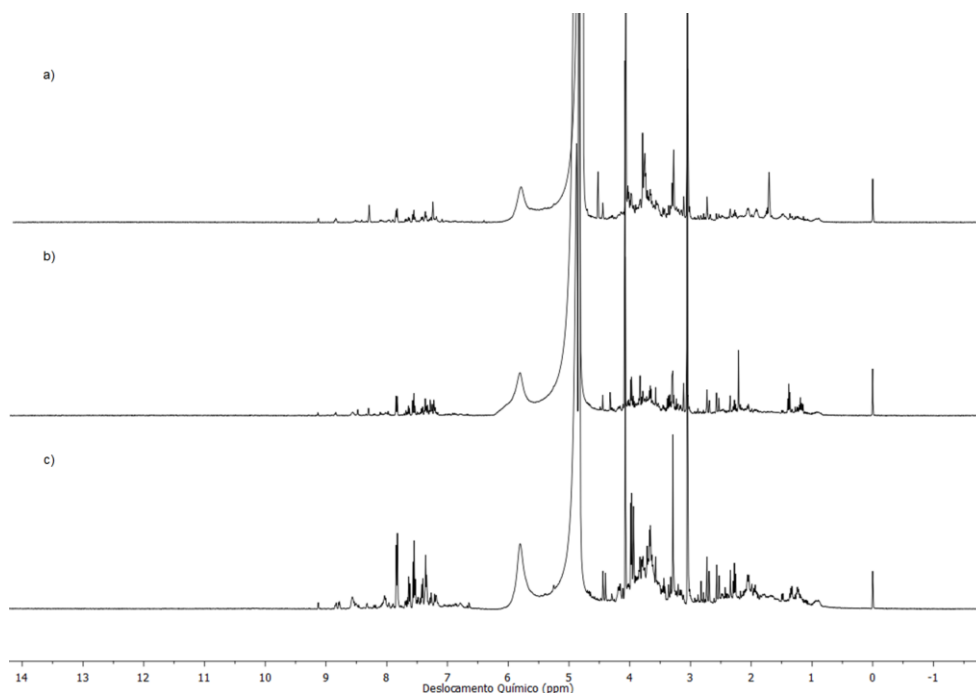


Figura 30. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) para amostras: a) voluntários saudáveis, b) pacientes com Câncer Renal, c) pacientes com Câncer de Bexiga.

Na PCA, não foi possível observar agrupamento natural nas classes de interesse. Entretanto, o modelo construído usando o formalismo PLS-DA apresentou resultados promissores frente a classificação das amostras em estudo, empregando duas variáveis latentes, conforme ilustrado nas Figuras 31 e 32.

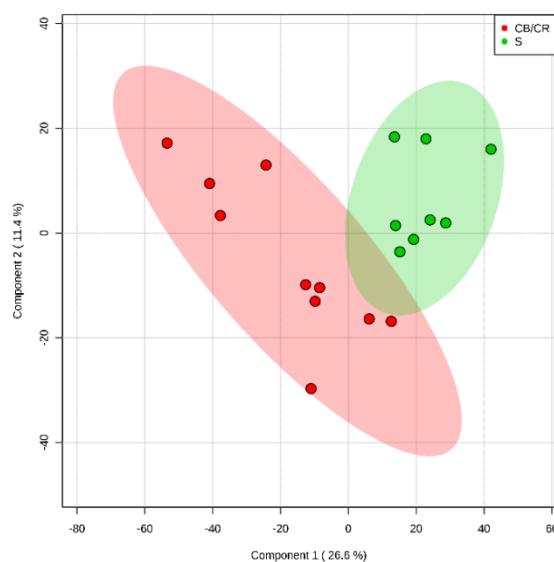


Figura 31. Formalismo PLS-DA. Gráfico de escores com 38% da variância explicada pelo modelo para as componentes PLS1 e PLS2.

Os valores de R^2 , Q^2 e poder de predição total de 80,5%, 46,9% e 83,3%, respectivamente, para as duas primeiras componentes PLS, demonstra

um bom desempenho para este formalismo. Graficamente, pode-se inferir que o modelo metabonômico, baseado no PLS-DA, obteve 100% de acerto em relação as amostras utilizadas no presente estudo (Figura 31). Através do gráfico VIP (Figura 32), é possível identificar quatro regiões espectrais com maior poder de discriminação. São elas: δ 1,95 ppm; δ 3,05-3,10 ppm; δ 3,75-3,85 ppm; δ 4,00-4,10 ppm.

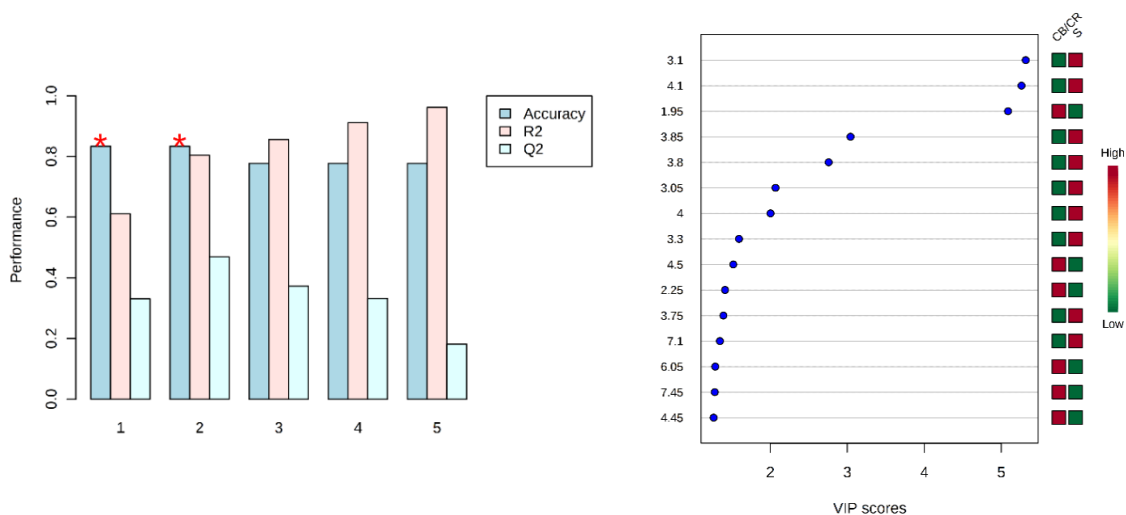


Figura 32. À esquerda, Validação cruzada (LOOCV) com os valores de R^2 , Q^2 e exatidão. À direita, gráfico com os valores VIP, indicando quais variáveis são mais importantes na classificação das amostras.

As regiões espectrais em δ 3,05-3,10 ppm e δ 4,00-4,10 ppm são atribuídas aos grupos metila e metileno da creatinina. O sinal em δ 1,95 ppm é atribuído à metila do acetato. A região em δ 3,75-3,85 ppm é atribuída a grupos metilenos de sacarídeos. O sinal centrado em δ 3,75 ppm pode ser atribuído ao metileno do íon gluconato, conforme ilustrado na Figura 33.

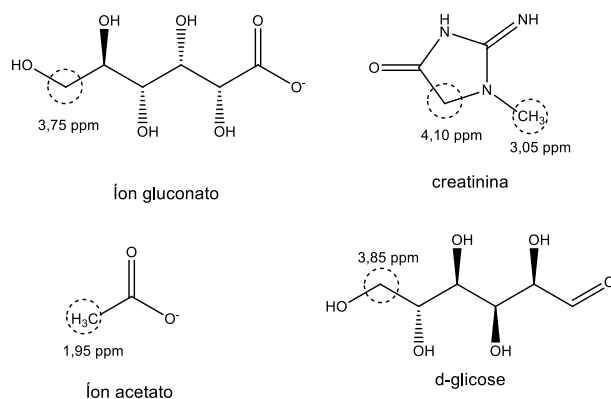


Figura 33. Estruturas da creatinina, do acetato, do gluconato e da *d*-glicose, identificados como metabólitos discriminantes no modelo LDA, a partir de amostras de urina, para discriminar voluntários saudáveis de pacientes com câncer de bexiga ou rim.

Pelo gráfico VIP, pode-se observar que os sinais atribuídos à creatinina, ao gluconato e aos açúcares possuem concentração relativa maior nos voluntários saudáveis que nos pacientes diagnosticados com câncer urológico (CB/CR). Porém, para o sinal atribuído ao acetato, essa relação é invertida.

Utilizando-se o formalismo LDA, pode-se obter um modelo metabonômico com respostas excelentes. Estes resultados são mostrados na Figura 34 e Tabela 5.

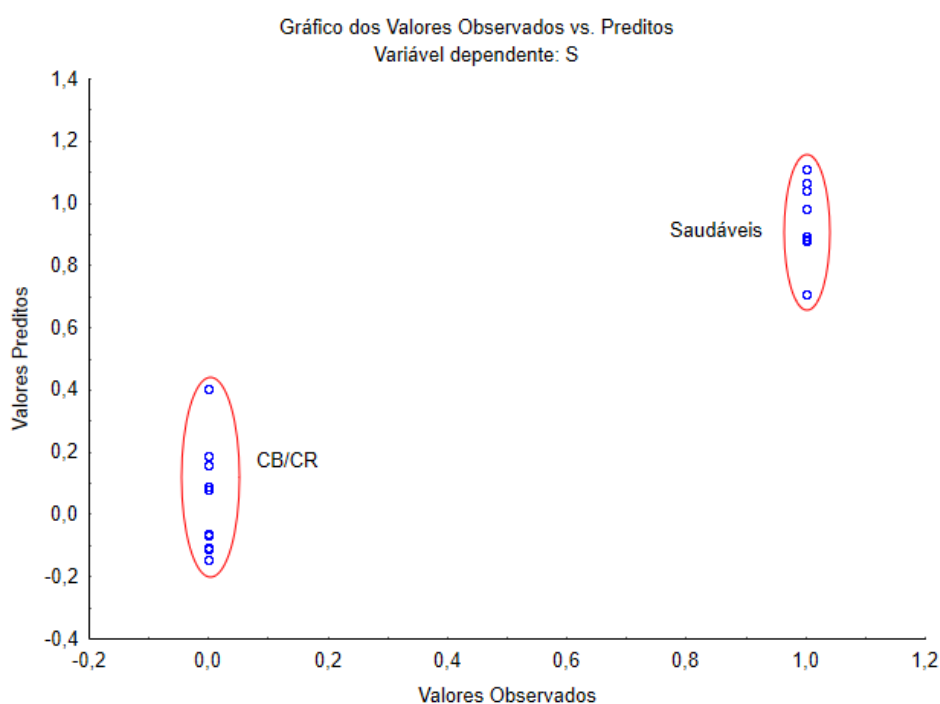


Figura 34. Gráfico dos escores obtidos na função discriminante (LDA) pelas amostras fornecidas por voluntários saudáveis e pacientes diagnosticados com câncer de bexiga ou rim (CB/CR).

Tabela 5. Matriz de Classificação e Validação cruzada (LOOCV) obtidos pela LDA.

		Matriz de Classificação - LDA		Total
		CB/CR P = 0,5556	Saudável P = 0,4444	
Modelo Metabonômico	CB/CR	10	0	10
	Saudável	0	8	8
	Total	10	8	18
		LDA após validação cruzada LOOCV (com 3 variáveis)		Total
		CB/CR	Saudável	
Modelo Metabonômico	CB/CR	10	0	10
	Saudável	0	8	8
	Total	10	8	18

Os resultados indicam que o modelo metabonômico, construído com o formalismo LDA, possui uma alta significância estatística ($p < 0,001$) com uso de três variáveis discriminantes. Com isso, pode-se obter os valores de VPP, VPN, sensibilidade e especificidade, após a validação cruzada, iguais a 100%. No que pese o número reduzido de amostras, é uma forte indicação que a estratégia é a adequada.

As variáveis discriminantes, associadas à classificação das amostras em estudo, foram os deslocamentos químicos (δ): 3,85 ppm; 4,30 ppm e 7,75 ppm. Novamente, o sinal em δ 3,85 ppm foi atribuído a grupos metilenos presentes em açúcares, como por exemplo a D-glicose; o sinal em δ 4,30 ppm ao grupo metila presente na trigonelina e o sinal em δ 7,75 ppm pode ser atribuído a um dos hidrogênios aromáticos presente no íon hipurato (Figuras 35 e 36).

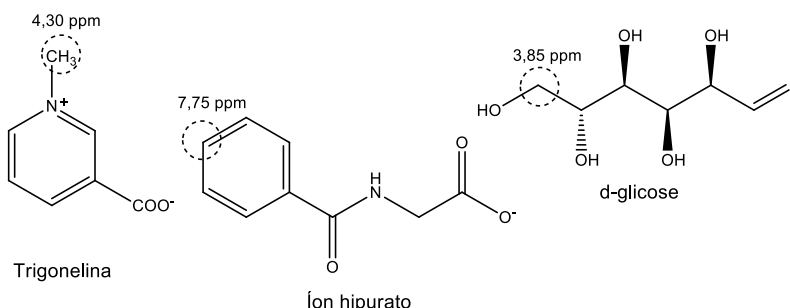


Figura 35. Estruturas da trigonelina, hipurato e d-glicose, identificados como metabólitos discriminantes no modelo metabonômico usando LDA para discriminar voluntários saudáveis de pacientes com câncer de urológico (CB/CR).

Os resultados usando amostras de urina foram recentemente publicados (ARAÚJO et al., 2017). Apesar de ser um estudo piloto, os valores de sensibilidade e especificidade entre 90-100% e 92-100%, respectivamente, obtidos a partir do formalismo LDA, utilizando amostras de urina e soro, demonstra a relevância e a potencialidade da estratégia metabonômica, como uma promissora ferramenta de diagnóstico não-invasiva para cânceres urológicos, em especial próstata, rim ou bexiga (AGGIO et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017; BUSATO JR.; ALMEIDA, 2016; GOODISON et al., 2012; MENGUAL et al., 2016; MOROTE; MALDONADO; MORALES-BÁRRERA, 2016; NICE, 2014; RIBAL et al., [s.d.]; SAKARYA et al., 1998; SOHAIL et al., 2015; VENDERBOS; ROOBOL, 2011).

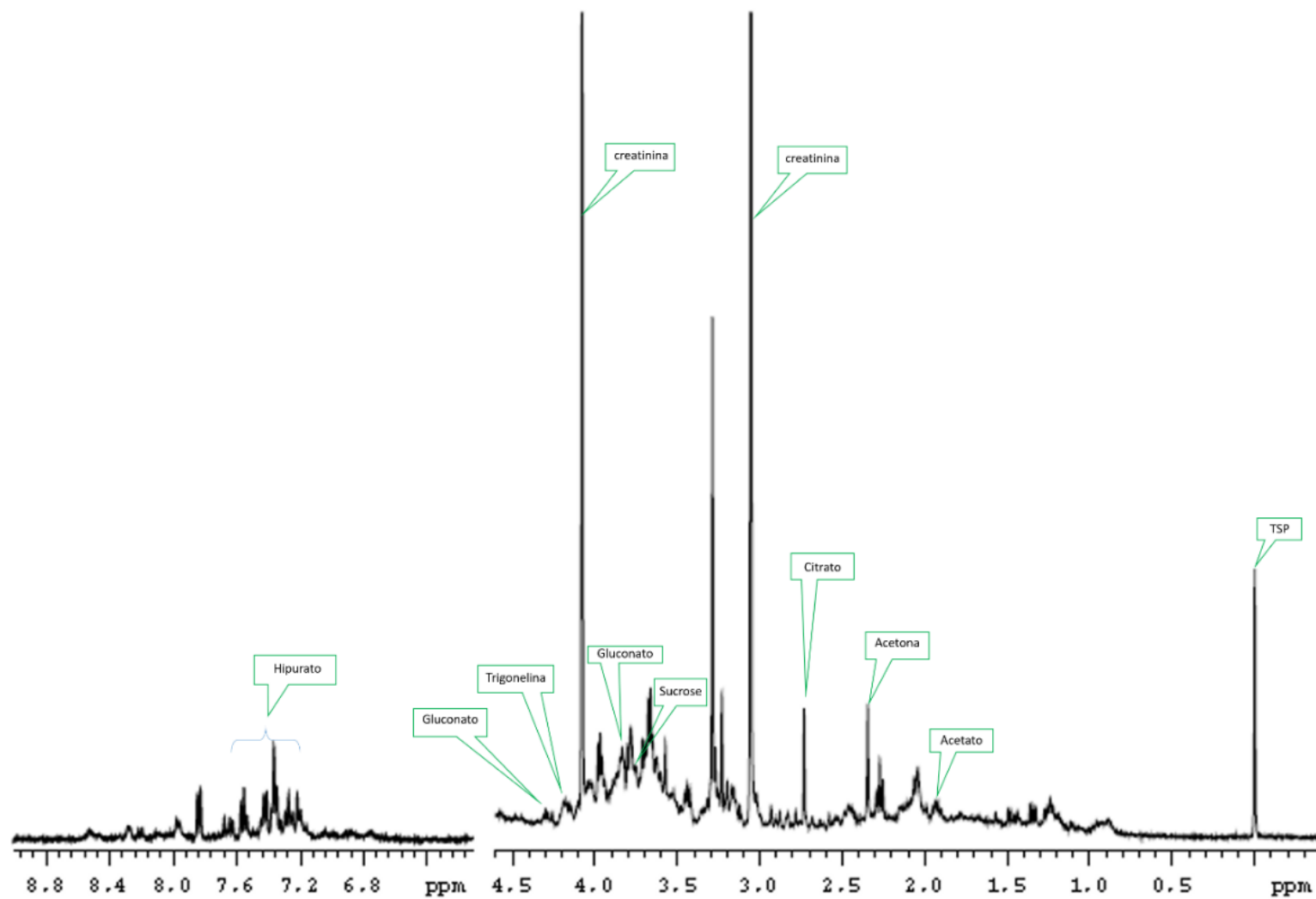


Figura 36. Atribuições de sinais de alguns metabólitos (discriminantes) no espectro de RMN de ^1H na amostra de urina.

3.5 Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a estratégia metabonômica, usando o formalismo Análise por Discriminantes Lineares (LDA), mostrou-se bastante eficaz na classificação das amostras de urina e soro para o diagnóstico do câncer de próstata, bexiga e rim.

Em relação ao modelo para o diagnóstico de câncer de próstata (CP), utilizando amostras de soro, foi necessário uso de quatro variáveis (*bins*) discriminantes. O modelo apresentou alta significância estatística ($p < 0,001$), com valores preditivos positivo e negativo (VPP e VPN), sensibilidade e especificidade iguais a 100%, 91,7%, 91,7% e 100%, respectivamente. As variáveis discriminantes foram atribuídas às estruturas lipídicas (VLDL e LDL), ao grupo citrato e a L-histidina.

O modelo CP *versus* S, utilizando amostras de urina, foi construído usando três variáveis discriminantes. O VPP e o VPN obtido foram iguais a 92,3% e 100%, respectivamente. Enquanto os valores de sensibilidade e especificidade foram iguais a 100% e 87,5%, respectivamente. As variáveis discriminantes foram atribuídas a açúcares e a trigonelina.

Para o modelo de diagnóstico câncer urológico (CB/CR) *versus* voluntários saudáveis, utilizou-se três variáveis, resultando em 100% de classificações corretas. As variáveis discriminantes foram atribuídas a açúcares, trigonelina e hipurato.

4. Aplicações Metabonômicas usando RMN de ^1H – Classificação de amostras de azeite extra virgem de produção orgânica

4.1 Azeite de Oliva – Extra Virgem Orgânico

A agricultura orgânica baseia-se no uso de recursos naturais e socioeconômicos para produzir cultivos, respeitando a integridade cultural das comunidades agrícolas, garantindo a sustentabilidade ecológica e econômica (BRASIL, 2007, 2003).

A atração de consumidores, vem aumentando de forma considerável, visto que este produto é isento de pesticidas, fungicidas, fertilizantes sintéticos e outros contaminantes. Comercialmente, isto promove um maior valor agregado a esta classe de produtos em comparação com alimentos produzidos de maneira convencional.

O Conselho Internacional de Óleos e Bagaços de Oliva define azeite de oliva como o óleo obtido da oliveira somente através de processos mecânicos e/ou físicos e, em alguns casos especiais, térmicos, desde que este último não promova alterações significativas no óleo. Além disso, este óleo não poderá receber nenhum tratamento, a não ser o de lavagem, decantação, centrifugação e filtração (BRASIL, 2007, 2003).

A classificação extra virgem se dará quando o óleo, considerado o extrato natural da oliva, for obtido apenas por processos físicos como corte, prensagem, centrifugação e filtração. Desde os anos 90, o comitê internacional, elaborou regras que estabelecem critérios analíticos para definir parâmetros de autenticidade do azeite de oliva. (ALONSO-SALCES et al., 2010; ANGEROSA et al., 2000; APARICIO; MORALES; ALONSO, 1997; LONGOBARDI et al., 2012b; NINFALI et al., 2008; ROMERO et al., 2015; SACCHI et al., 1998; VIGLI et al., 2003; VLAHOV, 1999; ZHANG et al., 2014).

Há diversos relatos na literatura, utilizando diferentes técnicas analíticas, como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1, carbono-13 e fósforo-31, que conseguiram detectar adulterações, definir a origem geográfica e caracterizar os mais diversos tipos de azeites – virgem (ALONSO-SALCES et al., 2010; CAPOZZI; TRIMIGNO, 2015), extra

virgem e puro (CIFUENTES, 2009; LONGOBARDI et al., 2012b; SAVORANI et al., 2013; VALDÉS et al., 2013; ZHANG et al., 2014), produzidos no mundo.

O padrão oficial de classificação do azeite de oliva e do óleo de bagaço de oliva, no Brasil, é feito através do órgão regulador, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), via instruções normativas que visam definir, considerando seus requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem, nos aspectos referentes à classificação do produto. Além destes, existe outro parâmetro de classificação destes produtos vigente em nosso país, diferenciando-os em produtos orgânicos e comuns (BRASIL, 2007).

A Lei federal nº 10.831, de dezembro de 2003, regulada pelo decreto n.º 6323 de setembro de 2007, define a produção orgânica assim:

“Considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente”. (BRASIL, 2007, 2003)

Na literatura, pode-se observar diversos trabalhos que envolvem estudos sobre azeite de oliva. Em trabalho pioneiro envolvendo a espectroscopia de RMN de ^1H e técnicas de análise multivariada não supervisionadas para caracterização e distinção entre amostras de azeite extra virgem na região centro-sul da Itália, os autores relatam discreta separação entre os grupos estudados, demonstrando certa dificuldade em distinguir a variedade dos azeites em função da variabilidade do clima, no qual as oliveiras foram submetidas (SACCHI et al., 1998).

No trabalho desenvolvido por Vlahov, em seu artigo de revisão, mostra que a espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C são técnicas bastante eficazes para a caracterização dos diversos compostos presentes no azeite de oliva e quando

estas estão associadas à análise multivariada, permite-se obter modelos estatísticos com bons desempenhos. O autor faz algumas ressalvas quanto a natureza das amostras, no qual assume-se que em todas as amostras de azeite de oliva estudadas, as mesmas são compostas por um conjunto de unidades estruturais semelhantes pertencentes aos ácidos graxos e triglicerídeos (VLAHOV, 1999). Além de considerar que as diferenças entre as amostras de cada classe, estão associadas a apenas, a quantidade relativa de cada componente e o seu respectivo deslocamento químico (bin).

Vigli et al mostra, em seu trabalho, a possibilidade de combinar a espectroscopia RMN de ^1H e ^{31}P com análise multivariada para a distinção entre amostras pertencentes a 13 tipos de óleos vegetais na região da Grécia (VIGLI et al., 2003). Marini descreve a utilização de parâmetros físico-químicos de azeites extra virgem adquiridos nas diferentes regiões da Itália, associando essas informações a técnicas quimiométricas multivariadas, construiu modelos LDA, utilizando 12 variáveis na construção do modelo, obtendo valores preditivos positivos na faixa de 90-92% para 5 cultivares distintos (MARINI et al., 2004).

Rezzi e colaboradores utiliza a espectroscopia de RMN de ^1H acoplada a um sistema de fluxo de amostras para a construção de modelos baseados na análise multivariada de dados, para distinção das amostras de azeite de oliva através do tipo de processamento e origem geográficas. Neste estudo, os mesmos utilizam diversas ferramentas estatísticas como PCA, LDA, PLS-DA, redes neurais (PNN), obtendo rendimentos na faixa 35-92% nos valores preditivos positivos (REZZI et al., 2005).

Como um dos primeiros trabalhos na literatura, Ninfali e colaboradores propõem um estudo fundamentado na caracterização físico-química, organoléptica e nutricional entre amostras de azeite de oliva extra virgem, orgânico e comum. Os autores observaram que houve diferenças significativas dos parâmetros estudados entre as amostras estudadas, mas que estas distinções eram minimizadas ou mesmo desapareciam durante um período médio de 3 (três) anos, tempo que se levou para obter os dados do referido estudo (NINFALI et al., 2008).

Longobardi e colaboradores utilizam a espectroscopia de RMN de ^1H aliada a análise multivariada (LDA, PLS-DA, SIMCA, PLS-DA, entre outras) para fins de autenticação e determinação da origem geográfica, envolvendo amostras de azeite extra virgem comercializados em diversos países da Europa, obtendo modelos estatísticos bastante satisfatórios, com poderes de predição na faixa de 60-100% de classificação correta (ALONSO-SALCES et al., 2010; LONGOBARDI et al., 2012a).

Hatzakis e colaboradores fazem um panorama dos diversos trabalhos encontrados na literatura, que utilizam a espectroscopia RMN de diversos núcleos como (^1H , ^{13}C , ^{31}P , etc) com a análise multivariada de dados em amostras de azeite virgem e extra virgem para determinação de origem geográfica, processos de obtenção, entre outros (DAIS; HATZAKIS, 2013).

Fang e colaboradores, utilizam a espectroscopia de RMN de ^1H e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) associadas a técnicas de análise multivariada de dados, comparando-as aos parâmetros de classificação, predição e detecção de adulterantes em amostras de óleos e gorduras, em geral. Os autores demonstraram que os resultados obtidos com ambas as técnicas foram satisfatórios e que a análise por PLS-DA utilizando dados obtidos através do CG/EM apresentou excelentes resultados de sensibilidade e especificidade entre as amostras estudadas (FANG et al., 2013).

Aqui, nós estamos propondo o emprego da estratégia metabonômica para criar uma ferramenta de classificação que permita a distinção entre os modos de produção— convencional ou orgânico — utilizando amostras de azeite extra virgem, a partir da Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 e Análise Multivariada.

4.2 Hipótese

É possível discriminar amostras de azeite de oliva extra virgem produzidas a partir de modos distintos – convencional ou orgânico, através da estratégia metabonômica utilizando a ressonância magnética nuclear de ^1H e análise multivariada de dados.

4.3 Objetivos

4.3.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver modelos metabonômicos, utilizando espectros de RMN de ^1H de azeite de oliva extra virgem para discriminar amostras produzidas da forma convencional daquelas obtidas por meio de produção orgânica.

4.3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar quais ferramentas de análise multivariada melhor se aplica aos dados coletados – PCA, PLS-DA, OPLS-DA e LDA, e construir modelos metabonômicos para diferenciação entre azeites extra virgem - orgânicos e convencionais - de diversas marcas comercializadas na Região metropolitana do Recife-PE;
- ✓ Identificar se há diferenças nos perfis metabonômicos das amostras de azeite comum e orgânico através da espectroscopia de RMN de ^1H .
- ✓ Construir os modelos e identificar quais metabólitos endógenos estão associados às discriminações observadas nos casos investigados.

4.4 Materiais e Métodos

Foram usadas 40 amostras de azeite extra-virgem, das quais 24 (vinte e quatro) amostras foram produzidas a partir do modo convencional e 16 (dezesseis) amostras foram produzidas a partir do modo orgânico de produção agrícola. Estas amostras foram oriundas de cinco países, como segue: Portugal (23 amostras), Itália (6 amostras), Espanha (3 amostras), Chile (7 amostras) e Argentina (1 amostra). O índice de acidez total de todas amostras ficaram distribuídos na faixa de 0,2-0,5%. Todas as amostras utilizadas no presente estudo foram adquiridas nos supermercados da região metropolitana de Recife, Pernambuco, Brasil (Tabela 6). (BRASIL, 2007, 2003)

Tabela 6. Informações relativas aos azeites de oliva extra virgem utilizados no estudo

Amostra	Acidez total (%)	Sistema de Produção	Origem	Envase
C1	0,5	Convencional	Portugal	12/2013
C2	0,5	Convencional	Itália	07/2013
C3	0,5	Convencional	Portugal	12/2013
C4	0,5	Convencional	Portugal	11/2015
C5	0,5	Convencional	Itália	01/2014
C6	0,5	Convencional	Espanha	06/2013
C7	0,4	Convencional	Portugal	05/2014
C8	0,3	Convencional	Portugal	09/2013
C9	0,3	Convencional	Portugal	07/2014
C10	0,5	Convencional	Portugal	07/2014
C11	0,5	Convencional	Portugal	05/2013
C12	0,5	Convencional	Argentina	05/2013
C13	0,3	Convencional	Espanha	08/2014
C14	0,5	Convencional	Portugal	11/2013
C15	0,5	Convencional	Portugal	02/2014
C16	0,5	Convencional	Portugal	07/2014
C17	0,2	Convencional	Portugal	11/2014
C18	0,2	Convencional	Chile	06/2014
C19	0,2	Convencional	Chile	05/2016
C20	0,3	Convencional	Portugal	04/2016
C21	0,2	Convencional	Chile	09/2015
C22	0,4	Convencional	Espanha	05/2016
C23	0,3	Convencional	Itália	09/2015

C24	0,4	Convencional	Portugal	08/2016
O1	0,5	Orgânico	Portugal	04/2014
O2	0,2	Orgânico	Itália	08/2012
O3	0,5	Orgânico	Portugal	07/2014
O4	0,2	Orgânico	Chile	02/2014
O5	0,2	Orgânico	Chile	04/2014
O6	0,2	Orgânico	Chile	12/2014
O7	0,2	Orgânico	Portugal	12/2011
O8	0,2	Orgânico	Portugal	12/2011
O9	0,2	Orgânico	Portugal	04/2014
O10	0,2	Orgânico	Itália	07/2012
O11	0,2	Orgânico	Portugal	10/2013
O12	0,5	Orgânico	Portugal	11/2013
O13	0,4	Orgânico	Itália	08/2013
O14	0,2	Orgânico	Chile	03/2015
O15	0,5	Orgânico	Portugal	12/2013
O16	0,2	Orgânico	Portugal	02/2015

Para análise das amostras de azeite extra virgem, foram utilizados 60 μL da amostra, que foram dissolvidos em 640 μL de CDCl_3 , em um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro. O sinal residual do solvente foi utilizado como referência de deslocamento químico (δ). Os espectros de RMN foram obtidos utilizando o espectrômetro VNMRS400, operando a 399,99 MHz, para o núcleo de ^1H , com janela espectral 6,4 kHz, tempo de espera (d1) igual a 1 s, tempo de aquisição igual a 2,556 s, pulso de radiofrequência (RF) de 90° , 64 repetições e temperatura de 26°C . Os espectros foram processados com *line broadening* igual a 0,3 Hz. Após a análise espectroscópica, as amostras foram armazenadas em um recipiente limpo de âmbar, para futuro descarte adequado.

Os espectros de RMN de ^1H tiveram suas fases ajustadas, correção de linha de base e construção dos bins de forma manual utilizando o software *MestreNova 9.0*. Os espectros foram divididos em regiões (bins) foram definidos em intervalos de 0,04 ppm entre os δ 0,00 e 7,00 ppm. Os dados foram dispostos numa matriz para tratamento quimiométrico (metabonômico).

Utilizando-se a plataforma online *MetaboAnalyst 3.0* (XIA et al., 2009, 2012, 2015), foram construídos os modelos baseados na Análise por Componentes Principais (PCA) e Regressão por mínimos quadrados parciais acoplado a Análise por Discriminantes (PLS-DA). A análise por discriminantes lineares (LDA) foi realizada utilizando-se o programa *Statistica 10.0*. Para validar os modelos, foram utilizados os modelos de permutação dos dados e a validação cruzada (LOOCV). A técnica de pré-processamento utilizada neste trabalho foi a normalização pela soma, como foi mostrado na equação 14.

4.5 Resultados e Discussão

A Figura 37 apresenta dois espectros RMN de ^1H de amostras de azeite extra virgem, um convencional e um proveniente da produção orgânica. No espectro, é possível identificar três regiões distintas: δ 3.5 até 0.5 ppm, região associada às cadeias alquílicas pertencentes aos ácidos graxos; δ 4.5 até 4.0 ppm, pode ser atribuída aos grupos metilenos (CH_2) presente no glicerol; e δ 5.5 até 5.0 ppm, região associada aos sinais de olefinas ($-\text{CH}=\text{CH}-$) e grupo metino (CH) presente no glicerol. (ALONSO-SALCES et al., 2010; APARICIO; MORALES; ALONSO, 1997; LONGOBARDI et al., 2012a; POPESCU et al., 2015; SACCHI et al., 1998)

Visualmente, os espectros de RMN de ^1H das amostras de azeite extra virgem utilizada neste estudo – modo de produção orgânica e convencional, não apresentam diferenças significativas. Dessa forma, justifica-se o uso de ferramentas estatísticas de natureza, uni e/ou multivariada, para investigar se há distinção.

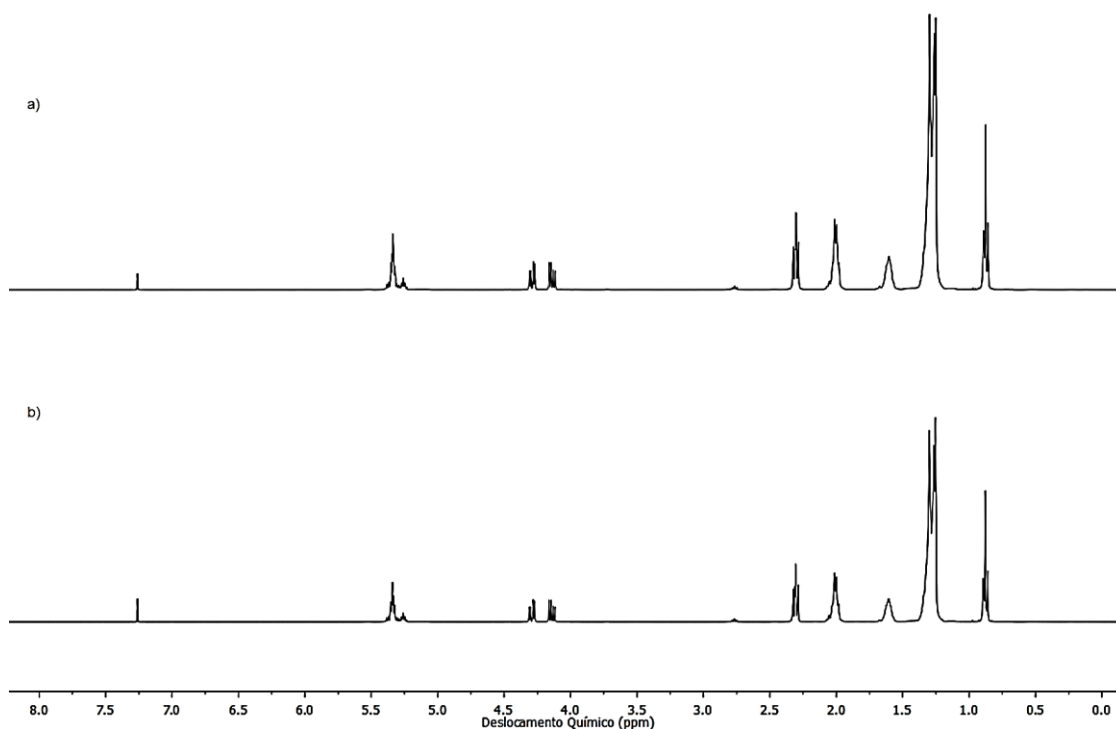


Figura 37. Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz). a) azeite extra virgem convencional b) azeite extra virgem orgânico.

Utilizando o formalismo não supervisionado, a análise por componentes principais (PCA) não se mostrou efetiva quanto a separação natural entre as classes (Figura 38). Pode-se observar que há uma grande região de

recobrimento entre as amostras analisadas. As duas primeiras componentes reuniram cerca de 93,3% da variância dos dados, demonstrando que os mesmos são altamente correlacionados e provando a não possibilidade de separação entre as classes estudadas por este formalismo.

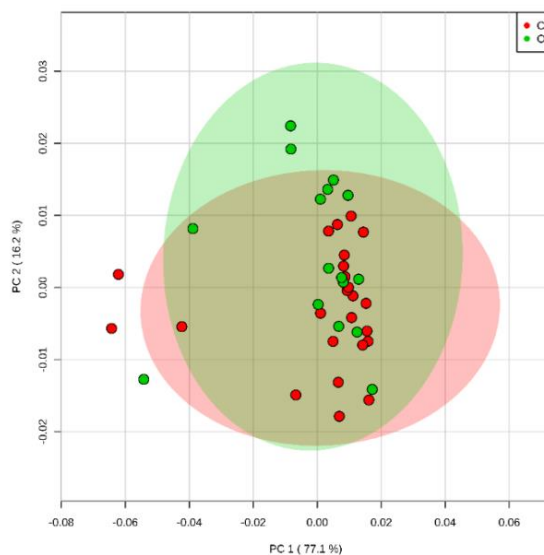


Figura 38. Representação da projeção das duas primeiras componentes principais, PC1 e PC2, reunindo 93,3% da variância explicada. [Legenda: Bolinhas verdes – amostra de azeite extra virgem orgânico; Bolinhas vermelhas – amostras de azeite extra virgem convencional]

Baseando-se no formalismo supervisionado PLS-DA, observa-se que há uma região de recobrimento entre as amostras, demonstrando a não capacidade desta técnica em classificar estas amostras (Figura 39).

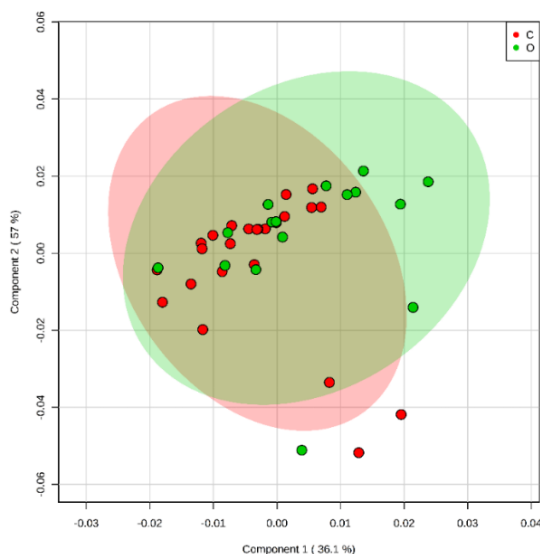


Figura 39. Projeção das duas primeiras componentes, PLS1 e PLS2, reunindo 93,1% da variância explicada pelo modelo. [Legenda: Bolinhas verdes – amostra de azeite extra virgem orgânico; Bolinhas vermelhas – amostras de azeite extra virgem convencional]

Para fins de comprovação, realizou-se a validação cruzada (LOOCV) deste modelo e pode-se obter como valores de R^2 , Q^2 e poder de predição do modelo, para as cinco primeiras componentes PLS, 26,8%, -24,4% e 75%, respectivamente. Estes valores comprovam a premissa de que o formalismo PLS-DA não foi capaz de classificar, com exatidão, as amostras de azeite extra virgem proveniente de modos de produção distintos aqui estudados. Estes resultados são sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados obtidos no formalismo PLS-DA após validação cruzada (LOOCV) para as cinco primeiras componentes PLS.

Número de comp. PLS	1	2	3	4	5
Poder de predição	0,6	0,65	0,725	0,7	0,75
R^2	0,119	0,153	0,197	0,226	0,268
Q^2	-0,164	-0,030	-0,136	-0,284	-0,244

Utilizando-se o formalismo supervisionado, OPLS-DA, variante do PLS-DA, não se observou uma separação entre as amostras estudadas, obtendo-se resultados semelhantes quando comparados com o formalismo PLS-DA. (Figura 40).

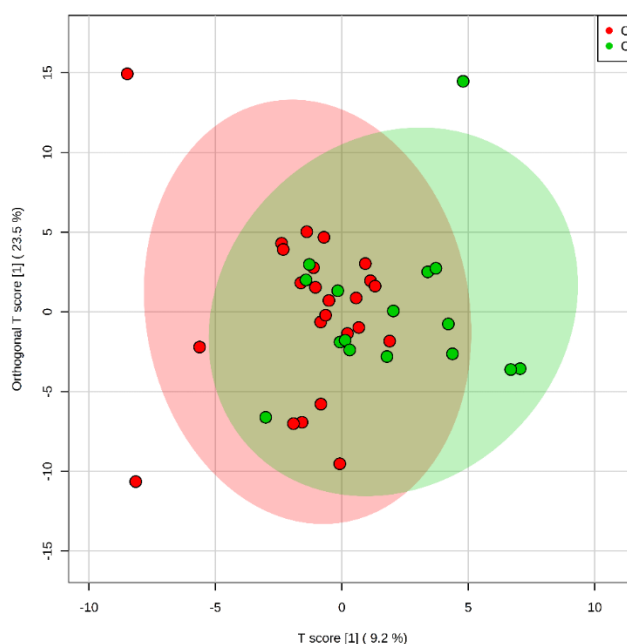


Figura 40. Representação da projeção das primeiras componentes, PLS1 versus OPLS1, reunindo 32,7% da variância explicada pelo modelo. [Legenda: Bolinhas verdes – amostra de azeite extra virgem orgânico; Bolinhas vermelhas – amostras de azeite extra virgem convencional]

Baseando-se no formalismo da análise por discriminantes lineares, LDA, foi construída uma função discriminante usando cinco deslocamentos químicos (δ , em ppm), selecionados a partir do lambda de Wilks, para o modelo de classificação das amostras estudadas. Os valores de deslocamento químicos selecionados com o maior poder de discriminação entre as classes, foram (em ppm): δ 0,96; δ 2,36; δ 2,72; δ 4,44 e δ 5,32. A matriz de classificação das amostras de azeite extra virgem obtidas por diferentes modos de produção (EVOO), após validação cruzada (LOOCV) foi obtida, como mostra-se na Tabela 8.

Tabela 8. Matriz de classificação das amostras de azeite após a validação cruzada (LOOCV).

Modelo Metabonômico	Classe	Poder de Predição	Classificação Comercial	
			Convencional	Organico
	C	91.7%	22	0
	O	100%	2	16
	Total	95.0%	24	16

O modelo LDA apresentou um poder de predição total de 95%. Individualmente, para as amostras de azeite extra virgem produzidos de forma convencional, apresentou 91,7% de poder de predição e para as amostras obtidas pelo modo de produção orgânica, um valor de 100% para este parâmetro. Realizando o teste F de Fisher para o modelo, usando 34 e 5 graus de liberdade, obteve-se um F igual a 16,7 ($p < 0,01$), demonstrando a alta significância estatística do modelo para fins de classificação das amostras estudadas.

A Figura 41, mostra os valores das amostras utilizadas no presente estudo, na função discriminante linear. Antes de realizar a validação cruzada, pode se observar que uma amostra de azeite extra virgem, obtido pelo modo de produção convencional foi classificado de maneira equivocada pela estratégia metabonômica. Após a validação cruzada, pode-se observar que mais uma amostra foi classificada de forma errônea. Por sua vez, o modelo metabonômico classificou corretamente todas as amostras de azeite obtidas pelo modo de produção orgânica. (Figura 41 e Tabela 8)

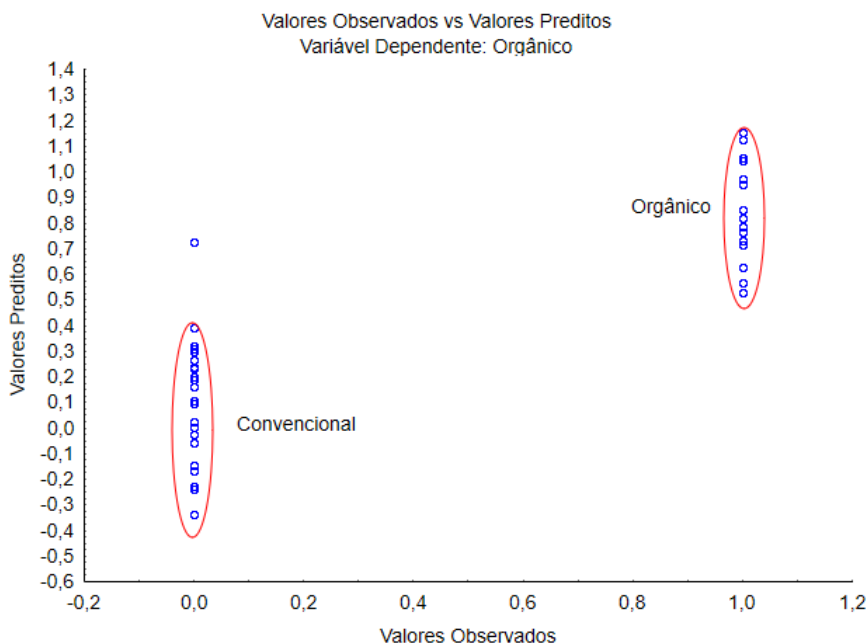


Figura 41. Gráfico dos valores observados versus valores preditos obtidos pelo formalismo LDA.

A partir dos resultados obtidos pelo formalismo LDA, foi possível a identificação dos sinais responsáveis pela discriminação entre as amostras de azeite extra virgem aqui estudadas. Contudo, para as atribuições serem confirmadas e associadas aos metabólitos endógenos, necessita-se do uso de técnicas de RMN mais sofisticadas, experimentos bidimensionais, para este fim.

Considerando que a espectroscopia de RMN é uma poderosa ferramenta para elucidação estrutural, usando diferentes técnicas para este fim (NATH et al., 2016; SILVA et al., 2010). Dessa forma, as atribuições foram confirmadas usando a informação obtida através do espectro COSY ^1H - ^1H (Figura 42).

Na Figura 42, pode-se observar uma correlação entre os sinais em δ 0,96 ppm e δ 1,25 ppm. Estes sinais podem ser atribuídos aos grupamentos metil e metilenos, respectivamente, presentes em cadeias alquílicas de ácidos graxos. O sinal em δ 2,36 ppm, mostra uma única correlação com o sinal em δ 1,60 ppm, podendo ser atribuídos aos grupos metilenos nas posições α e β , respectivamente, em relação ao grupo carboxílico ($-\text{O}(\text{O})\text{C}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-$) presentes nos ácidos graxos.

O sinal em δ 2,72 ppm mostra uma correlação com o sinal centrado em δ 5,32 ppm (Figura 42). Considerando a desblindagem e a correlação observada no espectro de COSY ^1H - ^1H , o deslocamento químico em δ 2,72 ppm, pode ser atribuído ao grupamento metileno, localizado entre duas ligações π , pertencente ao ácido linolênico ($-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}=\text{CH}-$). O sinal em δ 5,32 ppm, pode ser atribuído aos hidrogênios olefínicos ($-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{H}}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}=\text{CH}-$), presente nessa estrutura.

O sinal em δ 4,44 ppm pode ser facilmente atribuído ao glicerol, uma vez que mostra correlação com os sinais em δ 4,30 ppm e δ 5,24 ppm, ambos pertencentes ao glicerol. Todas as atribuições aqui feitas estão de acordo com resultados já relatados na literatura (Figura 42 e 43). (POPESCU et al., 2015)

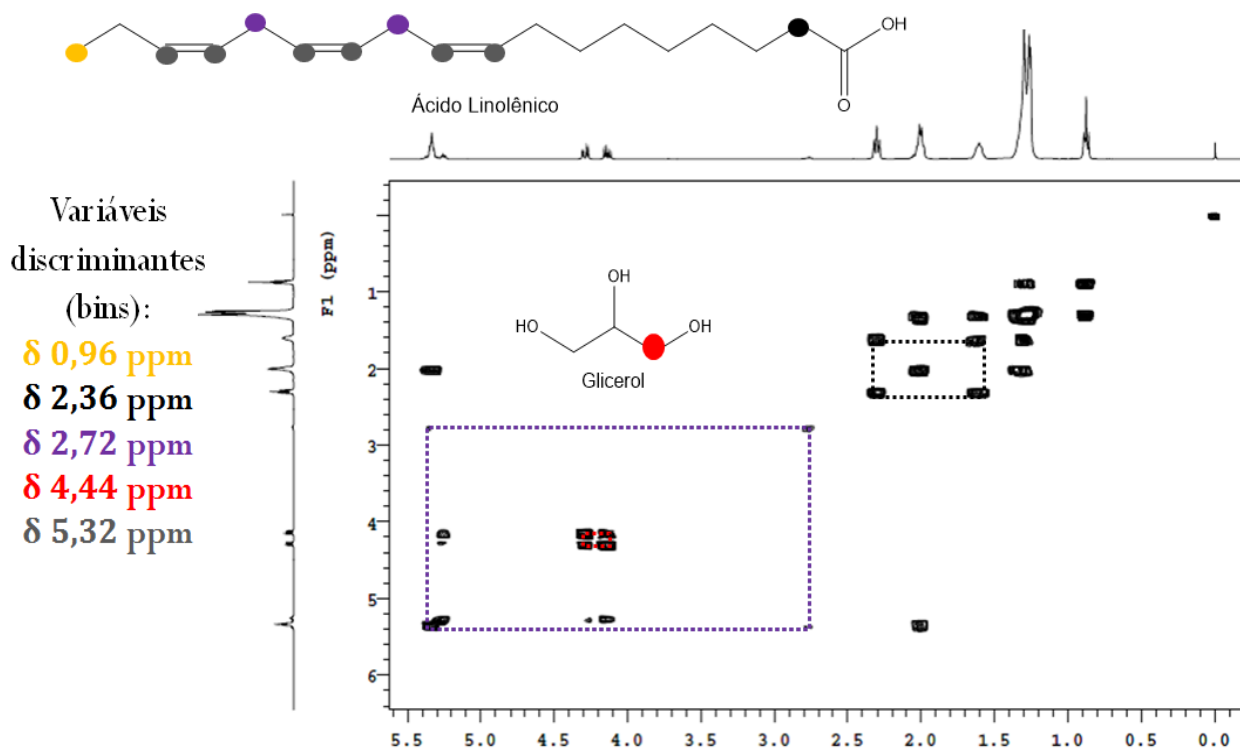


Figura 42. Espectro COSY ^1H - ^1H de uma amostra de azeite extra virgem.

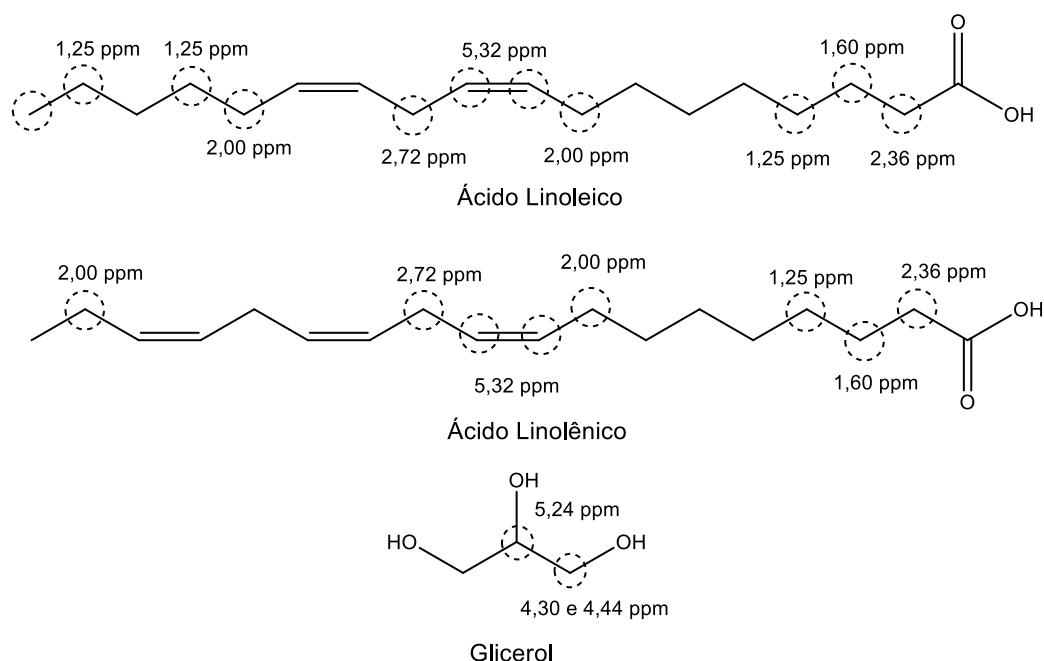


Figura 43. Estruturas dos ácidos graxos linoleico e linolenico, e o glicerol. Identificados como metabólitos discriminantes no modelo metabonômico usando LDA para discriminar azeites extra virgem de produção orgânica daqueles oriundos de uma produção convencional.

De acordo com a função discriminante e as atribuições realizadas, as variáveis mais importantes para discriminação das amostras de azeite extra virgem obtidos por diferentes modos de produção podem ser atribuídas aos ácidos graxos insaturados, ácidos linolênico e/ou linoleico e ao glicerol. Este resultado pode sugerir que a distinção entre as amostras de azeite, convencional e orgânica, podem estar associadas ao índice de acidez livre total ou a presença do ácido linolênico.

Para avaliar essa hipótese, aplicou-se o Teste t usando os valores do índice de acidez livre total mostrado na Tabela 6 e os valores médios foram calculados para cada grupo. Os resultados obtidos são sumarizados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados do Teste t para as variáveis discriminantes e o valores médios da acidez total livre para as amostras de azeite extra virgem utilizadas no presente estudo.

Amostra	Acidez total (média)	0.96 ppm	2.36 ppm	2.72 ppm	4.44 ppm	5.32 ppm
Convencional	0.388	0.001785	0.010788	0.000167	0.000073	0.007479
Organico	0.317	0.001756	0.011688	0.000140	0.000069	0.007080
<i>p</i>	0.0872	0.951	0.124	0.566	0.870	0.345

Estes resultados sugerem que não há diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos estudados, baseando na premissa sobre o teor de acidez total das amostras de azeite extra virgem utilizadas no presente estudo. Por outro lado, o formalismo LDA mostrou ser possível a distinção de forma satisfatória entre as amostras, propondo que o uso da estratégia metabonômica na avaliação e distinção de amostras de azeite extra virgem oriundas de modos de produção distintos – convencional e orgânica, seja posto como uma ferramenta de varredura (“*screaming*”).

4.6 Conclusão

A estratégia metabonômica mostrou-se eficaz na obtenção de um modelo para discriminação entre amostras de azeite extra virgem de acordo com o modo de produção agrícola – orgânico ou convencional.

O modelo metabonômico, baseando se no formalismo LDA obteve 100% de classificação correta para as amostras orgânicas e 91,7% para amostras convencionais, resultando em um poder de predição total igual a 95,0%.

A partir do modelo LDA, foi possível obter cinco variáveis discriminantes, entre as classes, foram (em ppm): δ 0,96; δ 2,36; δ 2,72; δ 4,44 e δ 5,32. Estes sinais foram atribuídos aos ácidos graxos insaturados (linoleico e linolênico) e ao glicerol.

Ficou evidenciado que não houve diferenças, estatisticamente significativas, entre as amostras em estudo, e estas não são provenientes dos diferentes teores de acidez máxima presente em cada produto analisado.

5. Considerações Finais

A estratégia metabonômica mostrou, através dos resultados obtidos, ser uma ferramenta eficaz de classificação e identificação dos metabólitos endógenos responsáveis pela distinção entre diferentes amostras, urina, soro e azeite de oliva extra virgem, utilizadas no presente estudo.

Em relação a proposta de elaboração de um modelo para prognóstico para pacientes diagnosticados com câncer de próstata (CP), bexiga e rim (CB/CR), obteve-se modelos de classificação baseados no formalismo LDA bastante satisfatórios, com valores de VPP e VPN entre, entre 90-100% e valores de especificidade e sensibilidade entre 87,5-100%, usando amostras de urina e soro. Em cada caso estudado, foi possível observar os diferentes perfis metabonômicos dos pacientes participantes do estudo piloto para a construção do modelo de prognóstico de câncer de próstata (CP), bexiga e rim (CB/CR) e de voluntários saudáveis (S).

Foi possível identificar os metabólitos discriminantes, sugerindo que os compostos lipídicos (VLDL e LDL), ao grupo citrato e a L-histidina, para o modelo CP *versus* S, utilizando amostras de soro. As variáveis discriminantes foram atribuídas aos açúcares e a trigonelina, no modelo CP *versus* S, utilizando amostras de urina. As variáveis discriminantes foram atribuídas aos açúcares, trigonelina e hipurato, no modelo CB/CR *versus* S, utilizando amostras de urina, sendo uma ferramenta bastante útil para definir possíveis rotas metabólicas baseadas nessas informações, não elaboradas até o presente momento, por se tratar de um estudo piloto.

O estudo com amostras de azeites extra virgem convencionais e orgânicos mostrou-se promissor, com excelentes resultados para os dados normalizados pela soma. O melhor desempenho de classificação foi obtido com a técnica LDA, utilizando a matriz de escores da PCA, resultando em um percentual de acerto de 100% para as amostras de azeite orgânico e 91,7% para as amostras de azeite convencional. Além disso, foi possível através do formalismo LDA, identificar diferentes impressões digitais metabólicas, presentes nas diferentes amostras de azeite convencional e orgânico. Foram identificados os possíveis metabólitos responsáveis pela distinção entre os diferentes grupos de amostra – convencional e orgânico, sendo atribuídos ao ácido linolênico e ao glicerol.

6. Perspectivas

- ✓ Retomar as coletas de sangue e urina, aumentando o número de amostras para cada grupo estudado, para tornar os modelos metabonômicos desenvolvidos para o câncer de próstata e urológico mais robustos;
- ✓ Iniciar o projeto intitulado O uso da Estratégia Metabonômica para fins de prognóstico de Varicoceles e a sua relação com a fertilidade.

Referências

- AGGIO, R. B. M. et al. The use of a gas chromatography-sensor system combined with advanced statistical methods, towards the diagnosis of urological malignancies. **Journal of Breath Research**, v. 10, n. 1, p. 17106, 11 fev. 2016.
- ALGER, J. R. Magnetic Resonance Spectroscopy. In: SQUIRE, L. R. (Ed.). . **Encyclopedia of Neuroscience**. Oxford: Academic Press, 2009. p. 601–607.
- ALONSO-SALCES, R. M. et al. Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. **Food Authenticity & Traceability**, v. 118, n. 4, p. 956–965, 15 fev. 2010.
- ANDRADE, ALSS., ZICKER, F. **Métodos de Investigação Epidemiológica em Doenças Transmissíveis**. 2ª ed. [s.l: s.n.]. v. I
- ANGEROSA, F. et al. Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 283–287, 15 fev. 2000.
- APARICIO, R.; MORALES, M. T.; ALONSO, V. Authentication of European Virgin Olive Oils by Their Chemical Compounds, Sensory Attributes, and Consumers' Attitudes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1076–1083, 1 abr. 1997.
- ARAÚJO, L. et al. Diagnosis of Urological Cancer by 1H NMR Based Metabonomics Urinalysis: A Pilot Study. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 19, n. 3, p. 1–8, 10 jan. 2017.
- ARMSTRONG, C. W. et al. NMR metabolic profiling of serum identifies amino acid disturbances in chronic fatigue syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 19–20, p. 1525–1531, out. 2012.
- BARAN, R. et al. MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 530, 2006.
- BARROS, A. J. D. Epidemiología básica. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 228–229, 2006.
- BARRY DELONGCHAMPS, N. Prostate cancer: Review in 2014. **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 95, n. 7–8, p. 739–742, jul. 2014.
- BONITA R; BEAGLEHOLE R; KJELLSTRÖM. **Epidemiologia básica**. [s.l: s.n.].
- BRASIL. **Decreto n.º 6323**, Setembro 2007.
- BRASIL. **Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva**Ministério da Saúde, , 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 1 nov. 2017
- BRASIL, 2003. **Lei nº 10.831**, Dezembro 2003.
- BRERETON, R. G. Chemometrics and Statistics: Multivariate Classification Techniques. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2013a.

BRERETON, R. G. Chemometrics and Statistics: Multivariate Classification Techniques. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2013b.

BUSATO JR., W. F. S.; ALMEIDA, G. L. Prostate cancer screening in Brazil: should it be done or not? **International braz j urol**, v. 42, n. 6, p. 1069–1080, dez. 2016.

BUYDENS, L. M. . et al. Molecular data-mining: a challenge for chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 49, n. 2, p. 121–133, 4 out. 1999a.

BUYDENS, L. M. . et al. Molecular data-mining: a challenge for chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 49, n. 2, p. 121–133, 4 out. 1999b.

CAPITANIO, U.; MONTORSI, F. Renal cancer. **The Lancet**, v. 387, n. 10021, p. 894–906, fev. 2016.

CAPOZZI, F.; TRIMIGNO, A. 11 - Using metabolomics to describe food in detail. In: BRENNAN, J.-L. S. (Ed.). . **Metabolomics as a Tool in Nutrition Research**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2015. p. 203–229.

CAVILL, R. et al. Genetic algorithms for simultaneous variable and sample selection in metabonomics. **Bioinformatics**, v. 25, p. 112–118, 2008.

CHEUNG, G. et al. Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, dez. 2013.

CIFUENTES, A. Food analysis and Foodomics. **Advanced Separation Methods in Food Analysis**, v. 1216, n. 43, p. 7109, 23 out. 2009.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R. Chapter 4 - Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics to Assess Geographical Origin and Quality of Traditional Food Products. In: STEVE L. TAYLOR (Ed.). . **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Academic Press, 2010. v. Volume 59p. 87–165.

DAIS, P.; HATZAKIS, E. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, n. 0, p. 1–27, 26 fev. 2013.

DIEHL, B. Chapter 1 - Principles in NMR Spectroscopy. In: DIEHL, U. H. W. (Ed.). . **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 1–41.

DONA, A. C. et al. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 135–153, 2016.

DONA, A. C. Standardized NMR Protocols for Metabonomics. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2016.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, abr. 2005.

DYSON, H. J.; PALMER III, A. G. 1.9 Introduction to Solution State NMR Spectroscopy. In: EGELMAN, E. H. (Ed.). . **Comprehensive Biophysics**. Amsterdam: Elsevier, 2012. p. 136–159.

EVERETT, J. R. A New Paradigm for Known Metabolite Identification in Metabonomics/Metabolomics: Metabolite Identification Efficiency. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 131–144, 2015.

FANG, G. et al. Characterization of oils and fats by ¹H NMR and GC/MS fingerprinting: Classification, prediction and detection of adulteration. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1461–1469, 1 jun. 2013.

FIEHN, O. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, n. 3, p. 155–168, jun. 2001.

GAO, H. et al. Application of ¹H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. **Cancer Science**, v. 100, n. 4, p. 782–785, 2009.

GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, n. 12, p. 854–858, 2010.

GOODISON, S. et al. A Multi-Analyte Assay for the Non-Invasive Detection of Bladder Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47469, 2012.

GOODPASTER, A. M.; ROMICK-ROSENDALE, L. E.; KENNEDY, M. A. Statistical significance analysis of nuclear magnetic resonance-based metabonomics data. **Analytical Biochemistry**, v. 401, n. 1, p. 134–143, 1 jun. 2010.

GRIFFITHS, W. J. et al. Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 32, p. 5426–5445, 2010.

GROMSKI, P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 10–23, jun. 2015.

GRUTZNER, J. B. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY | Principles. In: POOLE, P. W. T. (Ed.). . **Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 2005a. p. 211–237.

GRUTZNER, J. B. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY | Principles. In: POOLE, P. W. T. (Ed.). . **Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 2005b. p. 211–237.

GUYON, I.; ELISSEEFF, A. An Introduction to Variable and Feature Selection. **J. Mach. Learn. Res.**, v. 3, p. 1157–1182, mar. 2003.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton and Hall textbook of medical physiology**. 12th ed ed. Philadelphia, Pa: Saunders/Elsevier, 2011.

HENDRIKS, M. M. W. B. et al. Data-processing strategies for metabolomics studies. **In-Vivo and On-Site Analysis II**, v. 30, n. 10, p. 1685–1698, nov. 2011.

JONASCH, E.; GAO, J.; RATHMELL, W. K. Renal cell carcinoma. **BMJ**, v. 349, n. nov10 11, p. g4797–g4797, 10 nov. 2014.

JUCHEM, C.; ROTHMAN, D. L. Chapter 1.1 - Basis of Magnetic Resonance. In: ROTHMAN, C. S. (Ed.). **Magnetic Resonance Spectroscopy**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 3–14.

JUNG, Y.-S.; HYEON, J.-S.; HWANG, G.-S. Software-assisted serum metabolite quantification using NMR. **Analytica Chimica Acta**, v. 934, p. 194–202, ago. 2016.

JURS, P. C. Pattern recognition used to investigate multivariate data in analytical chemistry. **Science**, v. 232, n. 4755, p. 1219–1224, 1986.

KSHIRSAGAR, A. M. Wilks's Lambda Criterion. In: **Encyclopedia of Statistical Sciences**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2004.

KUMAR, V. et al. (EDS.). **Robbins basic pathology**. 9th ed ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2013.

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical Strategies in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 443–458, Dezembro 2006.

LI, H. et al. A Proton Nuclear Magnetic Resonance Metabonomics Approach for Biomarker Discovery in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 6, p. 2797–2806, Maio 2011.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 39, n. 1, p. 1–40, 2 jul. 2001.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Peer Reviewed: So What's the Deal with Metabonomics? **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 384 A-391 A, Setembro 2003.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. Directly coupled HPLC–NMR and HPLC–NMR–MS in pharmaceutical research and development. **Hyphenated Techniques in LC and their input in Biosciences**, v. 748, n. 1, p. 233–258, Outubro 2000.

LONGOBARDI, F. et al. Classification of olive oils according to geographical origin by using ¹H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 130, n. 1, p. 177–183, 1 jan. 2012a.

LONGOBARDI, F. et al. Instrumental and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Apulian virgin olive oils. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 579–584, 15 jul. 2012b.

LUDWIG, C. et al. Birmingham Metabolite Library: a publicly accessible database of 1-D ¹H and 2-D ¹H J-resolved NMR spectra of authentic metabolite standards (BML-NMR). **Metabolomics**, v. 8, n. 1, p. 8–18, 2012.

MALWADE, C. R. et al. Chemometrics for analytical data mining in separation process design for recovery of artemisinin from *Artemisia annua*. In: ANDRZEJ KRASLAWSKI AND ILKKA TURUNEN (Ed.). **Computer Aided Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. Volume 32p. 49–54.

MARINI, F. et al. Supervised pattern recognition to authenticate Italian extra virgin olive oil varieties. **8th Scandinavian Symposium on Chemometrics (SSC8)**, Mariehamn, Åland, Finland 14-18 June 2003, v. 73, n. 1, p. 85–93, Setembro 2004.

MAZUMDER, A.; DUBEY, D. K. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2013.

MEDRONHO, R., BLOCH, KV., LUIZ, RR., WERNECK, GL. **Epidemiologia**. 2^a ed. [s.l.] Atheneu, 2008. v. I

MENGUAL, L. et al. Using gene expression from urine sediment to diagnose prostate cancer: development of a new multiplex mRNA urine test and validation of current biomarkers. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, dez. 2016.

MOROTE, J.; MALDONADO, X.; MORALES-BÁRRERA, R. Cáncer de próstata. **Medicina Clínica**, v. 146, n. 3, p. 121–127, fev. 2016.

NATH, N. et al. Determination of Relative Configuration from Residual Chemical Shift Anisotropy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 30, p. 9548–9556, 3 ago. 2016.

NICE. **Prostate cancer: diagnosis and management**. London: National Institute for Health and Care Excellence, 2014.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181–1189, nov. 1999.

NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 21, n. 4–5, p. 449–501, 1989.

NINFALI, P. et al. A 3-year Study on Quality, Nutritional and Organoleptic Evaluation of Organic and Conventional Extra-Virgin Olive Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 2, p. 151–158, 1 fev. 2008.

PALMER, A. G. 1.13 NMR Spectroscopy: NMR Relaxation Methods. In: EGELMAN, E. H. (Ed.). **Comprehensive Biophysics**. Amsterdam: Elsevier, 2012. p. 216–244.

PAN, Z. et al. Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI–MS in patients with inborn errors of metabolism. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 2, p. 539–549, 1 jan. 2007a.

PAN, Z. et al. Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI–MS in patients with inborn errors of metabolism. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 2, p. 539–549, 1 jan. 2007b.

POPESCU, R. et al. Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics. **Recent Advances of Food Analysis**, v. 48, n. 0, p. 84–90, fev. 2015.

PSYCHOGIOS, N. et al. The Human Serum Metabolome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16957, 16 fev. 2011.

REZZI, S. et al. Classification of olive oils using high throughput flow 1H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 13–24, 3 nov. 2005.

RIBAL, M. J. et al. Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study. **European Journal of Cancer**, v. 54, p. 131–138, [s.d.].

ROBERTSON, D. G. et al. Metabonomics: Evaluation of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Pattern Recognition Technology for Rapid in Vivo Screening of Liver and Kidney Toxicants. **Toxicological Sciences**, v. 57, n. 2, p. 326–337, Outubro 2000.

ROBERTSON, D. G.; WATKINS, P. B.; REILY, M. D. Metabolomics in Toxicology: Preclinical and Clinical Applications. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. suppl 1, p. S146–S170, 1 mar. 2011.

ROMERO, I. et al. Validation of SPME–GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects. **Talanta**, v. 134, n. 0, p. 394–401, 1 mar. 2015.

ROSS, R. K.; COETZEE, G. A. The Epidemiology and Etiology of Prostate Cancer. In: PETROVICH, Z.; BAERT, L.; BRADY, L. W. (Eds.). . **Carcinoma of the Prostate: Innovations in Management**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996. p. 1–11.

SACCHI, R. et al. Characterization of Italian Extra Virgin Olive Oils Using ^1H -NMR Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 3947–3951, 1 out. 1998.

SAKARYA et al. The role of power Doppler ultrasonography in the diagnosis of prostate cancer: a preliminary study. **British Journal of Urology**, v. 82, n. 3, p. 386–388, 1 set. 1998.

SAVORANI, F. et al. Chapter 12 - Interval-Based Chemometric Methods in NMR Foodomics. In: FEDERICO MARINI (Ed.). . **Data Handling in Science and Technology**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. Volume 28p. 449–486.

SCHRAMM, J. M. DE A. et al. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, p. 897–908, 2004.

SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 14–21, 2010.

SILVA, R. O. et al. Complete ^1H and ^{13}C NMR signal assignments and chemical shift calculations of four 1,2,4-oxadiazole-based light-emitting liquid crystals. **Structural Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 485–494, jun. 2010.

SILVA, J. B. P. DA et al. Aplicação de análise de componentes principais para verificação de atribuições de sinais nos espectros de RMN ^1H : o caso dos 3-aril (1,2,4)-oxadiazol-5-carboidrazida benzilidenos. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 492–496, jun. 2005.

SKOV, T. et al. Chemometrics in foodomics: Handling data structures from multiple analytical platforms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 60, n. 0, p. 71–79, set. 2014.

SMOLINSKA, A. et al. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. **750th Anniversary Volume**, v. 750, n. 0, p. 82–97, Outubro 2012.

SOHAIL, S. K. et al. Power doppler ultrasonography guided and random prostate biopsy in prostate cancer diagnosis - a comparative study. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 65, n. 1, p. 65–68, jan. 2015.

TAPP, H. S.; KEMSLEY, E. K. Notes on the practical utility of OPLS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1322–1327, dez. 2009.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 469–479, Dezembro 2006.

ULRICH, E. L. et al. BioMagResBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, p. D402–D408, jan. 2008.

VALDÉS, A. et al. Foodomics strategies for the analysis of transgenic foods. **Modern Food Analysis and Foodomics**, v. 52, n. 0, p. 2–15, dez. 2013.

VAN DER MEIJDEN, A. P. M. Bladder cancer. **BMJ : British Medical Journal**, v. 317, n. 7169, p. 1366–1369, 14 nov. 1998.

VANDEGINSTE, B. G. M.; SIELHORST, C.; GERRITSEN, M. The NIPALS algorithm for the calculation of the principal components of a matrix. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 286–287, set. 1988.

VENDERBOS, L. D.; ROOBOL, M. J. PSA-based prostate cancer screening: the role of active surveillance and informed and shared decision making. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 2, p. 219–224, mar. 2011.

VERWAEST, K. A. et al. ¹H NMR based metabolomics of CSF and blood serum: A metabolic profile for a transgenic rat model of Huntington disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 11, p. 1371–1379, nov. 2011.

VIGLI, G. et al. Classification of Edible Oils by Employing ³¹P and ¹H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis. A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5715–5722, 1 set. 2003.

VLAHOV, G. Application of NMR to the study of olive oils. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 35, n. 4, p. 341–357, 1 dez. 1999.

WESTERHUIS, J. et al. Assessment of PLS-DA cross validation. **Metabolomics**, v. 4, n. 1, p. 81–89, 1 mar. 2008.

WISHART, D. S.; KNOX, C.; GUO, A. C. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D603–610, 2009.

WOLD, S. Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it? **InCINC '94 Selected papers from the First International Chemometrics Internet Conference**, v. 30, n. 1, p. 109–115, nov. 1995.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M. Chemometrics, present and future success. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 44, n. 1–2, p. 3–14, 14 dez. 1998.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **PLS Methods**, v. 58, n. 2, p. 109–130, Outubro 2001a.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **PLS Methods**, v. 58, n. 2, p. 109–130, 28 out. 2001b.

WU, D.; ZHU, B.; WANG, X. Metabonomics-based omics study and atherosclerosis. **Journal of Clinical Bioinformatics**, v. 1, n. 1, p. 30, 2011.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl 2, p. W652–W660, 2009.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W127–W133, 2012.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W251–W257, 1 jul. 2015.

XU, J. et al. Statistical two-dimensional correlation spectroscopy of urine and serum from metabolomics data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 112, n. 0, p. 33–40, 15 mar. 2012.

ZHANG, L. et al. Untargeted fatty acid profiles based on the selected ion monitoring mode. **Analytica Chimica Acta**, v. 839, n. 0, p. 44–50, 11 ago. 2014.

ZHANG, X.; LIU, M.; MAO, X. Solvent Resonance Suppression Methods in NMR Spectroscopy. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2014.

Atividades complementares

Além dos trabalhos relacionados à elaboração, execução e obtenções dos resultados para construção da tese apresentada, realizei algumas atividades complementares que proporcionaram um maior enriquecimento profissional e formação acadêmica ao longo desses cinco anos de doutoramento.

- (1) Em 2009, obtive aprovação em concurso público federal, no qual, pude exercer o cargo de professor efetivo, disciplina Química, do Instituto Federal de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico do estado de Alagoas (IFAL) – campus Palmeira dos Índios, durante o período, março de 2009 à fevereiro de 2014. Neste período, ministrei disciplinas vinculadas ao ensino médio integrado, técnico e do curso de graduação Bacharelado em Engenharia Civil. Neste intervalo, setembro de 2010 a julho de 2011, exerci o cargo de coordenador de Ciências Exatas e da Natureza no campus supracitado.
- (2) Em 2012, obtive aprovação no concurso público federal, obtendo o 4º lugar, sendo nomeado em fevereiro de 2014, para Instituto Federal de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico do estado de Pernambuco (IFPE) – campus Vitória de Santo Antão, no qual exerço o cargo de professor de Química, ministro(ei) disciplinas vinculadas ao ensino médio integrado e aos cursos de graduação, Bacharelado em Agronomia e Licenciatura em Química, nos quais sou membro permanente dos respectivos colegiados e membro permanente do Núcleo Docente Estruturante do curso de Licenciatura em Química.
- (3) De 2012 a 2017, cursei as disciplinas necessárias para obtenção do título de doutor em química, publiquei um artigo vinculado ao objeto de investigação descrito na tese, 20 trabalhos apresentados em congressos e simpósios envolvendo temas diversos, voltados para popularização da Ciência & Tecnologia, voltados também, para o ensino de química e suas áreas correlatas.
- (4) Orientei dois trabalhos de conclusão de curso (TCC), dos estudantes Diésia Araújo e Leandro Soares, vinculados ao curso de Licenciatura

em Química do IFPE Campus Vitória de Santo Antão, trabalhos estes finalizados em fevereiro de 2017.

- (5) Colaborei como Co-orientador, no TCC da estudante Rafaela Nathália, vinculada ao curso de Licenciatura em Química, no Departamento de Química Fundamental da UFPE. Neste trabalho, a aluna aplicou a estratégia metabonômica para estudo de casos de hepatite viral, usando amostras de soro.
- (6) Exerci a função de Coordenador do Programa Institucional para Bolsas de Iniciação a Docência (PIBID) – Licenciatura em Química no IFPE campus Vitória de Santo Antão no período de setembro de 2014 a abril de 2016, orientando 21 estudantes regularmente matriculados, os quais atuaram em escolas públicas da microrregião da cidade de Vitória de Santo Antão.

Anexos

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de Câncer de Próstata por Metabonômica baseada na Espectroscopia de RMN de Soro de Sêmen

Pesquisador: Leslie Clifford Noronha Araujo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 33003214.3.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 728.780

Data da Relatoria: 24/07/2014

Apresentação do Projeto:

O Câncer de próstata é um dos tipos mais frequentemente diagnosticados em homens, com cerca de 915 mil casos diagnosticados no mundo em 2008. No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) é que, em 2012, foram diagnosticados 60180 novos casos. Seu diagnóstico é realizado pela biópsia prostática guiada por ultrassonografia transretal, que é um método invasivo e doloroso. A estratégia metabonômica, usa

ferramentas de estatística multivariada, a partir dos dados espectrais obtidos de biofluidos ou tecidos. Desde 1990, tem-se diversos trabalhos que buscam criar modelos que sejam capazes de auxiliar o diagnóstico das mais diferentes doenças usando a estratégia metabonômica. A construção de um modelo metabonômico por um meio não-invasivo como a Ressonância Nuclear Magnética (RNM) do soro do sêmen, poderá servir como um novo marcador para o câncer de próstata. Construir um modelo metabonômico, a partir de dados espectrais de RNM de hidrogênio obtidos de soro de sêmen, iniciado por uma investigação diagnóstica, prospectiva, com delineamento transversal, afim de estudar um novo teste diagnóstico quanto a validade e confiança, considerando o "gold standart", ou seja, o teste padrão ouro definido pela literatura. Serão convidados 70 pacientes para o projeto de pesquisa, dividindo-se em dois grupos, um com câncer de próstata e um de voluntários saudáveis. Todos serão encaminhados ao laboratório para

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 728.780

a coleta de PSA (Antígeno Prostático Específico) e sêmen para análise no laboratório de Química Experimental da UFPE. Através da RNM do soro deste sêmen, deverá ser criado um modelo metabonômico para avaliação espectral deste fluido, onde se espera ter distinção estatística entre os grupos. Para análise de frequência entre os grupos será utilizado o teste qui-quadrado ou teste F. A comparação entre médias será realizada com teste t, considerando estatisticamente significativo $p < 0,05$. O modelo metabonômico possui a possibilidade de um diagnóstico

futuro de forma simples, não invasiva e indolor, evitando também o constrangimento do paciente, podendo, no futuro, tornar-se um substituto da biópsia convencional.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Construir um modelo metabonômico, a partir de dados espectrais de RMN de 1H obtidos de soro de sêmen.

Objetivo Secundário:

Diferenciar pacientes saudáveis de pacientes diagnosticados com Câncer de Próstata, a partir do modelo proposto; Investigar quais metabólitos endógenos presentes no soro do sêmen estão associados à discriminação entre as amostras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos estimados são relativos à queixa de dor ou desconforto durante a coleta de sangue e ao constrangimento ou mal estar social dos participantes para coleta do sêmen e entrega do material.

Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos, quanto aos benefícios indiretos, são esperados resultados relacionados com o possível desenvolvimento de um método diagnóstico não invasivo seguro e poderá servir tanto para o diagnóstico quanto para o acompanhamento dos pacientes com câncer de próstata.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma proposta inovadora de diagnóstico para um dos tumores que mais afeta o sexo masculino. Apresenta uma técnica não invasiva. Investigação clínica diagnóstica, prospectiva, com delineamento transversal, a fim de estudar um novo teste diagnóstico quanto à validade e confiança, considerando o "gold standard", ou seja, o padrão ouro definido pela literatura.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 728.780

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto traz toda a documentação necessária.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação " e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado .

RECIFE, 25 de Julho de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Apêndice

APÊNDICE I

Cópia do Artigo publicado na Revista British
Journal of Medicine and Medical Research
intitulado Diagnosis of Urological Cancer by ^1H
NMR Based Metabonomics Urinalysis: A Pilot
Study



British Journal of Medicine & Medical Research
19(3): 1-8, 2017; Article no.BJMMR.30340
 ISSN: 2231-0614, NLMID: 101570965

SCIENCEDOMAIN international
www.sciencedomain.org



Diagnosis of Urological Cancer by ^1H NMR Based Metabonomics Urinalysis: A Pilot Study

Leslie Clifford Noronha Araújo^{1*}, Flávia Cristina Morone Pinto²,
 Tássia Brena Barroso Carneiro Costa³, Ronaldo Dionísio Silva³,
 Salvador Vilar Correia Lima² and Ricardo Oliveira Silva³

¹Urologic Service, Clinical Hospital, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brazil.

²Postgraduate Program in Surgery, Department of Surgery, Center for Health Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brazil.

³Department of Fundamental Chemistry, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors LCNA and FCMP developed the idea and presented in the article. Author LCNA wrote the protocol and wrote the first draft. Authors TBBCC and RDS managed the literature searches, analyses of the study, performed the spectroscopy based in ^1H NMR. Authors SVCL and ROS managed the final analyses and manuscript corrections. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/BJMMR/2017/30340

Editor(s):

- (1) Toru Watanabe, Department of Pediatrics, Niigata City General Hospital, Japan.
 (2) Costas Fourtounas, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Greece.

Reviewers:

- (1) Kashaev Rustem Sultan-Hamit, Kazan State Power Engineering University, Russia.
 (2) Santiago de Dios, University Hospital La Zarzuela, Spain.
 (3) Anonymous, Case Western Reserve University, USA.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/17230>

Short Research Article

Received 3rd November 2016
Accepted 9th December 2016
Published 14th December 2016

ABSTRACT

Aims: The most prevalent urological malignancies are prostate cancer (PC), bladder cancer (BC) and renal cancer (RC). The diagnosis of each of these diseases is conducted, in most cases, invasively and each procedure may lead to complications. The method of metabonomic spectrometry by nuclear magnetic resonance of hydrogen (^1H NMR) provides pathways of diagnostic information that can identify pathologies without invasive procedures. The possibility of using this method for the diagnosis of those cancers by a single sample of urine has not been described yet.

Study Design: Prospective, observational.

*Corresponding author: E-mail: leslie.clifford@gmail.com

Place and Duration of the Study: Department of Urology and Department Fundamental Chemistry of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), between July of 2015 to February of 2016.

Methodology: A sample of 3 ml of urine was collected from 25 volunteers distributed into 4 groups: A control group (07 volunteers), a PC (08 volunteers), a BC (05 volunteers), and an RC (05 volunteers). All samples underwent ¹H MRI to generate spectra. A multivariate statistics analysis for the development of metabonomic models and comparison analysis groups was performed.

Results: These models showed a slight separation between the control group and each of the three groups of patients with oncological diseases. For the elaboration of the definitive models it was necessary to incorporate the volunteers of the BC and RC into one group (BC/RC). The metabonomic method when compared to control group, shown sensitivity of 90.9%, specificity of 100%, 100% PPV and NPV of 85.7% for CB/CR and sensitivity, specificity, PPV and NPV of 100% for the PC.

Conclusion: This pilot study demonstrates that the method is feasible with easy execution, showing simplicity besides being not invasive and allowing the diagnosis of oncological diseases with a single urine collection.

Keywords: Metabonomics; nuclear magnetic resonance; prostate cancer; bladder cancer; kidney cancer; diagnosis.

1. INTRODUCTION

The most common urological malignancies are prostate cancer (PC), bladder cancer (BC) and renal cancer (RC) [1]. These cancers have aggressive treatments and are related to a significant loss of quality of life of patients. The diagnosis of each of these diseases is conducted, in most cases invasively, and each procedure includes complications [2-7].

For these reasons, the search for non-invasive diagnostic methods is being studied. Nuclear magnetic resonance of proton (¹H NMR) spectra of the metabonomics routes can provide information for pathology diagnosis without the need for invasive procedures [8].

This methodology is based on the principle of homeostasis. That is, if a living being is exposed to stress, disease or some chemical agent, the response is in an attempt to neutralize this external action, changing the concentration and endogenous metabolite flow, breaking the balance, and triggering extracellular environment adjustments in order to maintain stability. It is this change in the metabolic profile that can be evaluated by MRI spectroscopy [8-10], expecting these spectra to identify a particular profile for each specific aggression.

Recently, there are many reports of studies that use metabonomics/metabolomics strategies for clinical diagnosis of several diseases, as liver, lung, kidney, breast, ovarian and colorectal cancers or not malignant conditions [11-17].

The possibility of using this method for the diagnosis of those cancers by a single urine sample has not been described yet.

2. MATERIALS AND METHODS

The patients were selected from the outpatient clinic of the Department of Urology. All patients were approached, and voluntarily decided to participate signing the free and informed consent.

For the major study the total number of volunteers calculated was 120, 30 in each the experimental group and 30 in the control. This number was established as follow: the margin of error (5%), the confidence level (95%). The expected accuracy for determining the results taken as true based on previous research using metabonomics, whose expected ratio for positivity was 94% [18]. The calculation was based on a normal distribution, according to the formula described below.

$$C = Z * Z (P (1-P)) / (D * D)$$

Where P refers to the proportion expected; D, the semi amplitude of the confidence interval (CI); and Z (standardized standard curve) is equal to 1.96, thus the 95% CI [19].

The number of volunteers for this pilot study was established as a fraction of 20% of the total number of participants. In this case, the number of participants in the pilot would be at least 24 [19]. The volunteers were allocated into four

groups: Control (without any malignances); PC (with prostate cancer); BC (with Bladder cancer) and RC (with renal cancer).

Volunteers for the control group were selected by the same criteria as for the study group and had no history of urological disease. Volunteers with PC had all been diagnosed by transrectal prostatic biopsy and had not yet started any treatment.

Volunteers with BC who had undergone immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin or mitomycin C, as well as other specific treatments were excluded from the study.

Volunteers with RC were those who had a confirmed diagnosis of clear cell carcinoma by pathological examination in the postoperative period. Those volunteers in RC group diagnosed with urothelial carcinoma were excluded.

All volunteers ages were submitted to normality test and one-way ANOVA using GraphPad prism® 4.0 statistical package, for comparison among groups.

The samples were obtained from urination. Volunteers provided 3ml of urine for analysis that were cooled for storage and sent to the Fundamental Chemistry Department (DQF) to undergo to ^1H NMR. The spectra were obtained using a mixture of 400 μL of natural urine and 200 μL of buffer solution of phosphates ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.2 mol L^{-1}) to avoid pH variation.

After homogenization, the solution was transferred to a NMR tube with an inner diameter of 5 mm and introduced into a spectrometer (VNMR5400), operating at 400 MHz to ^1H nucleus. It was used a pulse sequence with pre-saturation to suppress the water signal in the spectrum. The following parameters were used: spectral window equal to 6.4 kHz, acquisition time equal to 2.56 s, 90° radiofrequency (RF) pulse, saturation delay equal to 2.0 s and 64 repetitions. All spectra were processed using line broadening equal to 0.3 Hz and the signal at 3.06 ppm, assigned to methyl group of creatinine, was used as the chemical shift reference.

The baseline and phase distortions were adjusted manually. ^1H NMR spectra (δ 0.0 to 10.0 ppm) were automatically reduced to 154 parts (bins) of equal length (δ 0.05 ppm), excluding the region between δ 4.2 and 6.4 ppm, to eliminate the signals from water and urea.

Binned data were used to build a matrix where in the lines are the samples and in the columns are the variables [20-22]. In addition, the spectra were normalized by sum.

Due to the complexity, the multivariate statistical technique was used to resize the data without loss of results, being unsupervised or supervised methods.

Principal Components Analysis (PCA) is an unsupervised method where the original data matrix is projected into a subspace defined by linear combinations with maximum variance. The first major component obtained is the axis that describes the maximum possible variance in the original multidimensional space and the second is the orthogonal component. The junction of these axes provide the best representations possible in terms of biochemistry.

The Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), its orthogonal variant (OPLS-DA) and linear discriminant analysis (LDA) are supervised methods which make it possible to analyze the spectra in a simple, fast and reproducible. PCA, PLS-DA and OPLS-DA were performed using MetaboAnalyst Platform (online), while LDA was performed using Statistica® 10.0 software [23-25]. The selection of variables to build the LDA models was performed using Wilks' Lambda. For Prostate Cancer Model were used four variables, while for BC/RC Model were used five variables. The models were validated by leave-one-out-cross validation (LOOCV) [26].

Once the inferences were created, metabonomic models calculated for sensitivity, specificity, and positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were built.

3. RESULTS AND DISCUSSION

A total of 25 volunteers from the outpatient clinic were distributed into the following groups: A control group with healthy volunteers (07); Prostate cancer (PC) with 08 volunteers; Bladder cancer (BC) with 05 volunteers and Renal Cancer (RC) with 05 volunteers.

The control group consists of men aged between 60 and 67 years (mean: 62.4 SD: 2.1 years); PC with men aged between 61 and 69 years (mean: 65.2; SD: 3.0 years); BC with 02 men aged between 70 and 76 years and three women aged between 57 and 75 years (total group mean: 69.4; SD: 7.5 years); and RC with one man and

35 years of age and four women aged between 54 and 64 years (total group mean: 53.0; SD: 10.9 years); BC/RC group (total group mean: 61.2 SD: 12.6 years). All results assume a normal curve and there were no statistical differences among groups after the ANOVA procedure, considering $p < 0.05$.

In the exploratory analysis (PCA), there was no separation of the spectra in any of the cases. The samples were then subjected to the supervised methods PLS-DA, OPLS-DA and LDA. A separation between groups BC and RC was observed. Due to the small sample size, it was not possible to build a LDA based metabonomic model for each group, so the two groups were treated together. In this case, samples from the BC and RC groups were pooled for analysis as if they were a single group (BC/RC), thus creating an arrangement for analysis and comparison with the control group. The split in the PC group allowed for the creation of a specific model, despite not having the ideal sample size.

Two models were created: (1) Bladder Cancer and Renal Cancer (BC/RC) versus Healthy; and (2) Prostate Cancer (PC) versus Healthy.

In this study, the variables are the integration areas under each signal. We defined that the spectrum will be divided into regions (bins) equals to 0.05 ppm between δ 0.00 and 10.0 ppm, excluding the region between δ 4.20 and 6.40 ppm. These signals can be attributed to

metabolites presents into sample. The attribution was made using HMDB platform online [27].

When PC model is considered, the discriminatory bins are: δ 2.05, 2.50, 2.75 and 7.40 ppm. These signals can be attributed to citrate (δ 2.50 and 2.75 ppm) and hippurate (δ 7.40 ppm). We did not able of attribute the signal at δ 2.05 ppm. Already there are reports in the literature associating citrate and hippurate to diagnosis of prostate cancer [28], however, the results here presented were obtained in a simpler way.

To BC/RC model, the discriminatory bins are: δ 2.30, 2.50, 4.20, 4.30 and 7.40 ppm. Again, citrate and hippurate were identified in this group. Beyond them, we attributed also the signals at δ 2.30 ppm to acetone, δ 4.20 ppm to gluconate and δ 4.30 ppm to trigonelline.

For the BC/RC group, 17 urine samples were used, as follows: 7 healthy, 5 volunteers diagnosed with bladder cancer and 5 diagnosed with renal cancer. Below are presented the results of OPLS-DA and LDA models, represented separately.

In order to obtain an alternative model for the classification of the samples studied, a statistical model based on the LDA was built. The results indicate that metabonomic model built obtained 100% PPV, NPV of 85.7%, 100% specificity and 90.9% sensitivity. These results are reported in Table 1.

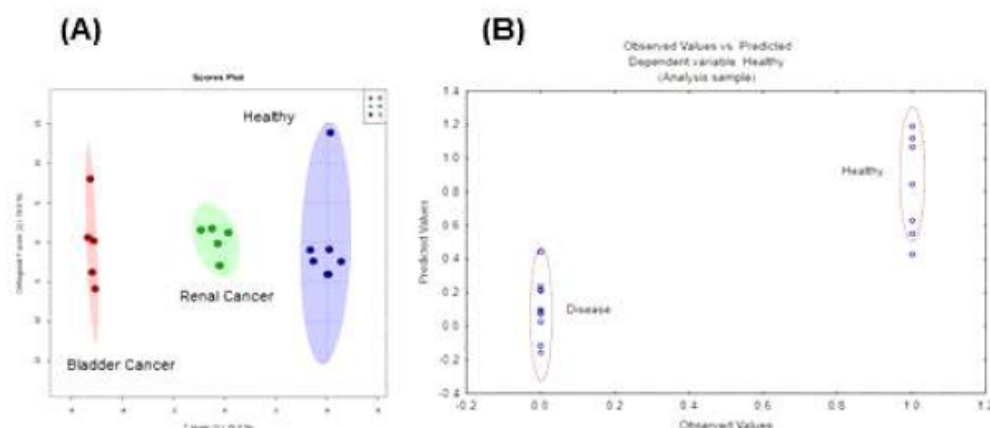


Fig. 1A and B. Scores plot: Metabonomics models for discrimination between bladder or renal cancer and healthy samples. (A) Score plot of OPLS-DA and (B) Classifications of urine samples by LDA formalism. Samples provided by healthy volunteers in the control group (healthy) and patients diagnosed with bladder or renal cancer (disease)

Table 1. Matrix of Leave-one-out cross-validation (LOOCV) obtained from LDA. Control vs BC/RC

Classification matrix - LDA			
Class	Correct percentage	Control	BC/RC
Control	100%	7	0
BC/RC	100%	0	10
Total	100%	7	10

LDA with LOOCV (5 variables)			
		Control	BC/RC
Control	85.7%	6	1
BC/RC	100%	0	10
Total	94.1%	6	11

Table 1 shows the PPV and NPV for samples together after cross analysis of variance, showing a clear separation between the control group and the BC/RC group.

For PC group the model was constructed from 15 samples of urine, taken from 7 healthy volunteers and 9 diagnosed with prostate cancer. Similar to the above analysis, we built statistical models using the following arrangements: PCA, PLS-DA, and DA-OPLS LDA, with pre-processing and normalization by the total.

Fig. 2A and B discriminate among the groups without intersecting the areas, showing the R²_Y (91.4%) and Q² (15.8%) values. The results from the LDA indicate that the metabonomic model built correctly classified all samples. Thus, the values of PPV, NPV, specificity and sensitivity were equal to 100%. These results are shown in Table 2.

The NMR spectra of biofluids can be evaluated quantitatively in relation to the physical shape of

the spectrum and qualitatively in relation to the chemical structure of the substances composing the spectrum.

Table 2. Matrix of Leave-one-out cross-validation (LOOCV) obtained from LDA. Control vs PC

Classification matrix - LDA			
Class	Correct percentage	Control	PC
Control	100%	7	0
PC	100%	0	8
Total	100%	7	8

LDA with LOOCV (4 variables)			
		Control	PC
Control	100%	7	0
PC	100%	0	8
Total	100%	7	8

The aim of the qualitative evaluation is not so much the quantification of a substance but rather an analysis of the profile changes of the endogenous metabolites, producing a pattern for a particular change, which can then be diagnosed or classified, enabling a "fingerprint" of a particular disease or condition [29].

With respect to the composition of the sample, it must be taken into consideration that the selection of volunteers was not homogeneous for gender or age. The control group was composed exclusively of men perfectly matched for the PC group; but the match was weak for the BC and RC groups. The absence of women in the control group generates a confounding factor, especially for the metabolism inherent in women. Furthermore, there was a discrepancy in ages, most markedly in the RC group.

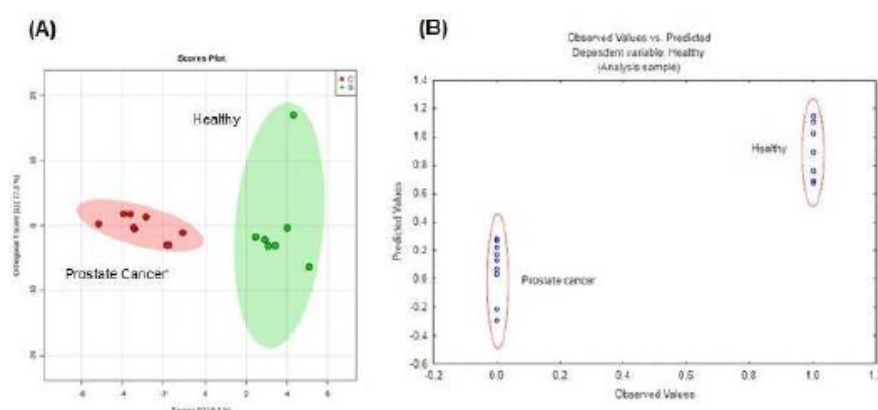


Fig. 2A and B. Scores plot Metabonomics models for discrimination between prostate cancer and healthy samples. (A) Score plot of OPLS-DA and (B) Classifications of urine samples by LDA formalism

Therefore, a better distribution of volunteers with a larger control sample, including women and volunteers from other age groups, is needed.

To equalize the samples it was decided to create a single model, merging the BC and RC groups (BC/RC).

The results presented by the BC/RC spectra, although not a comparison with the other groups, indicate a promising way to discover the presence of malignant disease, as the control group was known to be healthy and the BC/RC group, although composed of volunteers with different diseases, was composed entirely of people with a malignant urological disease.

The sensitivity profile of 90.9%, specificity of 100%, 100% PPV and NPV of 85.7% for the model demonstrates its ability to diagnose these pathologies. Thus it reveals positive way to validate the diagnosis method for renal and bladder cancer. Direct biopsy has values above 90% for bladder and kidney cancer, but it is a result from a direct evaluation of tissue using an invasive method [30].

In the specific case of kidney cancer, biopsy guided by imaging, particularly CT, has a sensitivity 97.7%, specificity of 100%, PPV and NPV of 100% [30], but is invasive. The values found in the metabonomic model are close to those observed with biopsy, but with the great advantage of resulting from a non-invasive method. There are no reliable publications for non-invasive diagnostic methods for cancer of the kidney.

For the diagnosis of bladder cancer using non-invasive methods, such as urinary cytology, positivity depends on the tumor differentiation grade, with a sensitivity ranging between 21-53%, specificity between 81-95%, VPP between 71-90% and VPN between 57-67% [5]. Other non-invasive methods, for example, gene transcription of urinary sediment, have demonstrated sensitivity of 81.5% and specificity of 91.3% [31]. Goodison et al. [32] using a complex statistical model, using an intersection of 8 biomarkers with sensitivity 90% and specificity of 97% for the diagnosis of bladder cancer, similar to the results found in this study.

For PC the values found were 100% sensitivity, specificity, PPV and NPV, which is higher than all values from transrectal biopsy, which were sensitivity 86.4%, specificity 60.7%, PPV 63.3% and NPV of 85% [3]. This makes it a promising

method for the diagnosis of this pathology, mainly because it is completely noninvasive.

When compared to other non-invasive methods, Mengual et al. in 2016, found sensitivity of 77% and specificity of 67% with the gene transcription method of urinary sediments [33]. These were lower than values found in the present study.

Aggio et al. [34] used a gas chromatography technique that achieved satisfactory results for bladder and prostate cancers. Further, they included a group that had samples of these two types of cancer, achieving sensitivity and specificity respectively of 96% and 100% for BC, sensitivity of 95% and specificity of 96% for PC and 78% and 98% (both cancer group) [34]. These results are similar to those found in this study, mainly by trying to detect more than one pathology and achieving a high degree of sensitivity and specificity.

Besides, to obtain ^1H NMR spectra of biofluids as urine and serum, practically it is not necessary great interventions in the sample preparation, as extraction or derivatization, and the spectra are obtained in minutes. However, when are used chromatography based metabolomics, there are necessary various interventions in the samples and the runs are performed in long periods, compared with NMR experiments [35].

Limitations of this study are mainly due to the number, homogeneity of the sample and the composition of the groups, especially the BC and RC groups. Despite this, the metabonomics seems to be an acceptable model for diagnosis of urologic cancer, being better in some cases than other invasive procedures, but further studies with larger samples are needed.

4. CONCLUSION

In the present study metabonomics has shown to be a promising non-invasive method in the diagnosis of urological tumors in urine samples of patients with prostate, bladder and kidney cancer.

ETHICAL APPROVAL

This study was submitted, approved by the ethical committee of the institution and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. (protocol number: 33003214.3.0000.5208).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the National Council of Scientific and Technological

Development (CNPq), Foundation for Science and Technology Support of Pernambuco State (FACEPE), Brazil and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil (CAPES). The English version of this text has been revised by a native speaker, Sidney Pratt, Canadian, BA, MAT (The Johns Hopkins University), RSA diploma (TEFL).

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Oliveira MM, Malta DC, Guauche H, Moura L, Silva GA. Estimated number of people diagnosed with cancer in Brazil: Data from the National Health Survey, 2013. *Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology*. 2013;18 Suppl 2:146-57.
- Anastasiadis A, Zapala L, Cordeiro E, Antoniewicz A, Dimitriadis G, De Reijke T. Complications of prostate biopsy. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2013; 13(7):829-37.
- Sohail SK, Sarfraz R, Imran M, Khan NA, Yusuf NW. Power doppler ultrasonography guided and random prostate biopsy in prostate cancer diagnosis - A comparative study. *Jpma*. 2015;65(1):65-8.
- Zyczynski HM, Sirls LT, Greer WJ, Rahn DD, Casiano E, Norton P, et al. Findings of universal cystoscopy at incontinence surgery and their sequelae. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2014;210(5):480 e1-8.
- McCroskey Z, Pambuccian SE, Kleithers S, Antic T, Cohen MB, Barkan GA, et al. Accuracy and interobserver variability of the cytologic diagnosis of low-grade urothelial carcinoma in instrumented urinary tract cytology specimens. *American Journal of Clinical Pathology*. 2015;144(6): 902-8.
- Volpe A, Terrone C, Scarpa RM. The current role of percutaneous needle biopsies of renal tumours. *Arch Ital Urol Androl*. 2009;81(2):107-12.
- Laird A, Couper CH, Glancy S, O'Donnell M, Riddick AC. Renal cell carcinoma needle biopsy: Sowing the seed for later complications? *BMJ Case Reports*; 2014.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica: The Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*. 1999;29(11):1181-9.
- Webb-Robertson BJ, Lowry DF, Jarman KH, Harbo SJ, Meng QR, Fuciarelli AF, et al. A study of spectral integration and normalization in NMR-based metabolomic analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005;39(3-4):830-6.
- Zhang S, Nagana Gowda GA, Ye T, Raftery D. Advances in NMR-based biofluid analysis and metabolite profiling. *The Analyst*. 2010;135(7):1490-8.
- Gao H, Lu Q, Liu X, Cong H, Zhao L, Wang H, et al. Application of ¹H-NMR-based metabolomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Sci*. 2009;100(4):782-5.
- Carrola J, Rocha CM, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Carreira IM, et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabolomics of urine. *Journal of Proteome Research*. 2011;10(1):221-30.
- Ganti S, Weiss RH. Urine metabolomics for kidney cancer detection and biomarker discovery. *Urologic Oncology*. 2011;29(5): 551-7.
- Slupsky CM, Steed H, Wells TH, Dabbs K, Schepansky A, Capstick V, et al. Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23):5835-41.
- Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCann SE, Tammela J, et al. Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabolomics. *International Journal of Cancer*. 2005; 113(5):782-8.
- Chan ECY, Koh PK, Mai M, Cheah PY, Eu KW, Backshall A, et al. Metabolic profiling of human colorectal cancer using High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance (HR-MAS NMR) Spectroscopy and Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). *Journal of Proteome Research*. 2009;8(1):352-61.
- Kashaev RS-H, Khaziahmetova LR. NMR-Relaxometer for diagnosis and control of chronic kidney disease patients parameters (Urea and Creatinine). *Open Access Library Journal*. 2014;1:e151.
- Godoy MM, Lopes EP, Silva RO, Hallwass F, Koury LC, Moura IM, et al. Hepatitis C

- virus infection diagnosis using metabonomics. *Journal of Viral Hepatitis*. 2010;17(12):854-8.
19. Thabane L, Ma J, Chu R, Cheng J, Ismaila A, Rios LP, et al. A tutorial on pilot studies: The what, why and how. *BMC Medical Research Methodology*. 2010;10:1.
 20. Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(1):9-27.
 21. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2005;24(4):285-94.
 22. Hoerr V, Duggan GE, Zbytnuik L, Poon KK, Grosse C, Neugebauer U, et al. Characterization and prediction of the mechanism of action of antibiotics through NMR metabolomics. *BMC Microbiology*. 2016;16(1):82.
 23. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful; 2015.
 24. Boccard J, Rutledge DN. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. *Analytica Chimica Acta*. 2013;769:30-9.
 25. Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*. 2006;20(8-10):341-51.
 26. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(2):443-58.
 27. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, et al. The human urine metabolome. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e73076.
DOI: 10.1371/journal.pone.0073076
 28. Struck-Lewicka W, Kordalewska M, Bujak R, Mpanga AY, Markuszewski M, Jacyna J, et al. Urine metabolic fingerprinting using LC-MS and GC-MS reveals metabolite changes in prostate cancer: A pilot study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;111:351-361.
Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.026>
ISSN: 0731-7085
 29. Lodi A, Ronen SM. Magnetic resonance spectroscopy detectable metabolomic fingerprint of response to antineoplastic treatment. *PloS one*. 2011;6(10):e26155.
 30. Maturen KE, Nghiem HV, Caoili EM, Higgins EG, Wolf JS, Jr., Wood DP Jr. Renal mass core biopsy: Accuracy and impact on clinical management. *AJR*. 2007;188(2):563-70.
 31. Ribal MJ, Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Palou J, Rodriguez-Faba O, et al. Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study. *Eur J Cancer*. 2016;54:131-8.
 32. Goodison S, Chang M, Dai Y, Urquidí V, Rosser CJ. A multi-analyte assay for the non-invasive detection of bladder cancer. *PloS one*. 2012;7(10):e47469.
 33. Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Izquierdo L, Musquera M, Ribal MJ, et al. Using gene expression from urine sediment to diagnose prostate cancer: Development of a new multiplex mRNA urine test and validation of current biomarkers. *BMC Cancer*. 2016;16:76.
 34. Aggio RB, de Lacy Costello B, White P, Khalid T, Ratcliffe NM, Persad R, et al. The use of a gas chromatography-sensor system combined with advanced statistical methods, towards the diagnosis of urological malignancies. *Journal of Breath Research*. 2016;10(1):017106.
 35. Robertson DG, Watkins PB, Reilly MD. Metabolomics in toxicology: Preclinical and Clinical Applications. 2011;S146-S70.

© 2017 Araújo et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:

<http://sciencedomain.org/review-history/17230>

APÊNDICE II

Planilha com os dados espectrais de RMN de ^1H a partir de amostras de Soro, usando o pré-processamento Normalização pela soma, utilizadas no presente trabalho

Amostras	Classe	0,04	0,08	0,12	0,16	0,2	0,24	0,28	0,32	0,36	0,4	0,44	0,48	0,52	0,56	0,6	0,64	0,68	0,72
A1	CP	0,000121	0,000547	0,000156	2,24E-05	0,000128	4,08E-05	1,06E-05	-3,7E-05	5,67E-05	1,33E-05	-2,7E-05	-1,3E-05	1,75E-05	9,67E-06	0,000102	9,32E-05	0,00025	0,000621
A2	CP	0,001263	0,00155	0,001046	0,001191	0,001393	0,001418	0,001436	0,001584	0,001724	0,001935	0,002086	0,002308	0,002582	0,002878	0,003266	0,003678	0,004455	0,005396
A3	CP	0,000232	0,000573	0,000276	0,000272	0,00027	0,000221	0,000227	0,000314	0,000403	0,000382	0,000428	0,000478	0,000579	0,000602	0,000771	0,000935	0,001169	0,001855
A4	CP	0,000392	0,000511	0,00034	0,000482	0,000402	0,000423	0,00049	0,000568	0,000591	0,000746	0,00078	0,000903	0,001045	0,001221	0,001381	0,001698	0,00208	0,002707
A5	CP	-0,00014	8,34E-05	-0,00021	-0,0002	-9,4E-05	-0,00027	-6,4E-05	-0,00038	-0,00034	-0,00017	-1,4E-05	-0,00022	-0,00024	-0,0003	-9,7E-05	-0,00022	-5,9E-05	0,000646
A6	CP	0,000108	0,000323	0,000144	7,82E-05	9,74E-05	9,86E-05	0,000143	0,000144	0,000163	0,000183	0,000248	0,000298	0,00028	0,000367	0,00047	0,000545	0,000748	0,001159
A11	CP	-7,5E-05	0,000172	-0,00013	-0,00021	-0,00024	-0,00015	-0,00021	-0,00026	-0,00012	5,61E-05	0,000133	0,000262	0,000304	0,000123	-0,00014	-0,00053	-0,00067	-0,00067
A12	CP	3,17E-05	8,02E-05	5,84E-05	9,85E-06	2,51E-05	7,2E-06	1,88E-05	3,48E-05	5,26E-05	4,62E-05	5,31E-05	7,39E-05	6,86E-05	8,91E-05	0,000106	0,000158	0,000165	0,000268
A15	CP	5,58E-05	0,000251	0,000133	0,000145	6,93E-05	5,8E-05	3,19E-05	0,000132	0,000117	0,000161	0,000199	0,000217	0,000331	0,000318	0,000381	0,000467	0,000548	0,000913
A16	CP	0,000176	0,00045	0,0002	0,000196	0,000233	0,000228	0,000211	0,000319	0,00027	0,000348	0,000382	0,000398	0,000403	0,000439	0,000635	0,000709	0,000958	0,001475
A17	CP	0,000496	0,000651	0,000422	0,00036	0,000452	0,000591	0,000642	0,000619	0,000803	0,000869	0,000976	0,001101	0,001157	0,001402	0,001686	0,001909	0,002375	0,003115
A10	CP	-0,00013	-6,9E-05	-0,00033	-0,00032	-0,00022	-0,00015	-0,00028	-0,00039	-0,00034	-0,00023	-0,00019	-0,0003	-0,00012	-0,00014	-6,1E-05	7,71E-05	0,000205	0,000558
B1	S	0,000578	0,001295	0,000571	0,000553	0,0006	0,000514	0,00067	0,000674	0,000745	0,00084	0,000864	0,001042	0,001165	0,001293	0,001501	0,001858	0,002163	0,002971
B2	S	2,66E-05	0,000348	-4,5E-05	-6,3E-05	-2E-05	-0,00013	-9,6E-05	-0,00016	-0,0001	-0,00012	-0,00011	-8,6E-05	-8,6E-05	-5,6E-05	-9,4E-05	-1,1E-05	0,000169	0,000585
B3	S	0,00011	0,000249	5,32E-05	-1,3E-05	6,59E-05	6,18E-05	2,3E-06	6,48E-06	3,95E-05	5,28E-05	7,73E-05	7,25E-05	0,000155	0,000181	0,00024	0,000324	0,000496	0,00128
B5	S	5,46E-05	0,000314	6,03E-05	3,71E-06	9,74E-05	-2,3E-05	-3,5E-05	1,24E-05	9,66E-06	-1,5E-05	2,19E-05	4,29E-05	1,33E-05	6,43E-05	7,72E-05	0,000207	0,00033	0,000726
B6	S	9,55E-05	0,000214	3,27E-05	2,55E-05	-2,8E-06	3E-05	-9,8E-06	-6,8E-05	-5,3E-05	-7E-05	-6,4E-05	8,71E-06	2,77E-05	-7,8E-05	-3E-05	-6,5E-06	0,000146	0,000501
B7	S	4,44E-06	0,000359	6,42E-05	-1,2E-05	-4,2E-05	-0,0001	-9,6E-05	-6,9E-05	-7,5E-05	-7,4E-05	-0,00012	-0,00011	-7,1E-05	-4,9E-05	2,99E-05	0,000186	0,000313	0,000782
B8	S	-5,5E-05	6,79E-05	0,000132	-5,8E-05	1,61E-05	-9,3E-05	-5,5E-05	-0,00011	-0,00017	-0,00011	-8,7E-05	-8,4E-05	-8,4E-05	-8,5E-05	-7E-05	-7,4E-05	-1,8E-05	5,81E-05
B10	S	0,000246	0,000343	0,000459	0,000431	0,00043	0,000515	0,000437	0,000451	0,000555	0,000607	0,00063	0,000684	0,000727	0,000871	0,000909	0,00098	0,001134	0,001313
B11	S	2,87E-05	0,000271	0,000179	5,68E-05	3,33E-05	-2,1E-05	-1,7E-05	-1,7E-05	-1,9E-05	1,46E-05	-7,4E-05	-7,2E-05	-0,00011	-0,00014	-7,6E-05	-6,7E-05	-9,4E-05	6,8E-05
B09	S	0,000282	0,000667	0,000334	0,00033	0,000352	0,000375	0,000386	0,000447	0,000427	0,000527	0,000529	0,000637	0,000722	0,000778	0,000838	0,000976	0,001241	0,001746
B4	S	0,000355	0,000704	0,000526	0,000332	0,000482	0,00045	0,000502	0,000548	0,000499	0,000652	0,000718	0,000799	0,000897	0,001007	0,001127	0,001355	0,001695	0,002321

0,76	0,8	0,84	0,88	0,92	0,96	1	1,04	1,08	1,12	1,16	1,2	1,24	1,28	1,32	1,36	1,4	1,44	1,48	1,52
0,000679	0,001393	0,01009	0,034301	0,041741	0,012597	0,012158	0,007402	0,00391	0,001321	0,002312	0,004718	0,013221	0,044519	0,079628	0,063904	0,013341	0,006127	0,008481	0,007368
0,00647	0,009651	0,022983	0,042482	0,024057	0,013294	0,012633	0,007234	0,004087	0,003539	0,006695	0,011959	0,022353	0,048031	0,046178	0,035761	-0,00043	0,000683	0,008435	0,004305
0,002285	0,003612	0,015378	0,045298	0,045497	0,011613	0,00998	0,005754	0,003234	0,002093	0,003938	0,007821	0,019231	0,059784	0,093838	0,057418	0,009557	0,003823	0,006857	0,005682
0,003388	0,005457	0,018556	0,045054	0,034361	0,012966	0,013049	0,007036	0,004427	0,002618	0,005395	0,010912	0,023317	0,057117	0,068617	0,1046	0,004503	0,001988	0,006439	0,006865
0,000611	0,00132	0,010155	0,033474	0,035705	0,013703	0,012808	0,007809	0,004619	0,001408	0,002914	0,005642	0,014235	0,048227	0,070443	0,079683	0,010422	0,004746	0,007853	0,009088
0,001508	0,002374	0,011897	0,037651	0,050154	0,010719	0,008115	0,003976	0,002562	0,001425	0,002675	0,004904	0,015881	0,055834	0,136012	0,067196	0,014262	0,005084	0,005946	0,005907
-0,00106	-0,00092	0,012041	0,036975	0,02467	0,01225	0,011361	0,005576	0,004188	0,001333	0,001666	0,004754	0,0153	0,043919	0,061036	0,042078	0,009557	0,006026	0,009267	0,009727
0,000373	0,000453	0,00151	0,00648	0,014249	0,004754	0,003355	0,001696	0,001617	0,000794	0,001017	0,001703	0,003515	0,009582	0,030727	0,019989	0,005256	0,001415	0,000976	0,001959
0,00116	0,001365	0,005149	0,025461	0,046813	0,014855	0,011111	0,00642	0,00558	0,002552	0,00346	0,005511	0,012439	0,03643	0,104888	0,064488	0,014734	0,004475	0,003387	0,008582
0,001609	0,002245	0,01474	0,052815	0,049866	0,012831	0,010456	0,006633	0,005193	0,003291	0,004648	0,008222	0,026249	0,078225	0,123279	0,057814	0,010594	0,003762	0,005306	0,006439
0,003901	0,006633	0,026869	0,054553	0,025936	0,011359	0,008865	0,005468	0,00375	0,0033	0,00559	0,011637	0,032094	0,06831	0,065407	0,034751	0,001135	0,000646	0,004868	0,003917
0,000884	0,002105	0,011793	0,045764	0,038149	0,017209	0,01793	0,012814	0,005864	0,002297	0,005722	0,008602	0,018086	0,058508	0,088473	0,157688	0,006976	0,003249	0,009342	0,010841
0,003649	0,005587	0,01805	0,047772	0,045125	0,012808	0,010893	0,006741	0,003925	0,002659	0,005239	0,008896	0,021006	0,05638	0,086655	0,057305	0,00932	0,002562	0,005149	0,00493
0,00059	0,001198	0,011894	0,042458	0,042209	0,013503	0,012402	0,006147	0,003221	0,001186	0,00239	0,004902	0,01546	0,059134	0,087351	0,054142	0,011374	0,005794	0,008014	0,007734
0,001317	0,002016	0,011828	0,054498	0,062035	0,013507	0,010605	0,005656	0,003314	0,002165	0,003749	0,006744	0,020378	0,08282	0,143054	0,073784	0,019	0,006454	0,006433	0,005499
0,000829	0,001586	0,013774	0,039073	0,030229	0,011433	0,012017	0,00748	0,003982	0,001535	0,003063	0,005233	0,017569	0,052786	0,062009	0,039206	0,007813	0,00384	0,007159	0,006387
0,000517	0,001523	0,012688	0,041361	0,038116	0,012223	0,010114	0,005275	0,003191	0,001112	0,002684	0,004704	0,015339	0,054327	0,071192	0,059067	0,012259	0,006109	0,008233	0,009167
0,001049	0,001894	0,01005	0,051609	0,048049	0,014284	0,014299	0,008098	0,004353	0,001271	0,003761	0,004713	0,010984	0,044763	0,058452	0,068441	0,011097	0,005355	0,010576	0,012786
0,000312	0,000398	0,000944	0,011209	0,031062	0,023968	0,011087	0,008613	0,003982	0,002761	0,001455	0,002204	0,004926	0,01488	0,053412	0,063319	0,032839	0,006114	0,003219	0,004603
0,00161	0,001956	0,002329	0,005521	0,024269	0,034414	0,011747	0,009149	0,006077	0,005525	0,00264	0,003375	0,005093	0,010324	0,029075	0,071649	0,046767	0,010968	0,002571	0,002181
0,000144	-4,3E-05	0,001971	0,024949	0,048791	0,020197	0,009564	0,006373	0,005131	0,002013	0,002143	0,003111	0,008609	0,033292	0,109416	0,079397	0,026339	0,008393	0,004963	0,008377
0,002009	0,002869	0,013841	0,041019	0,039418	0,011479	0,011412	0,007246	0,005238	0,002625	0,003726	0,006835	0,018956	0,055726	0,099576	0,054481	0,009221	0,00337	0,00531	0,006258
0,003031	0,003822	0,009842	0,034881	0,055229	0,018693	0,019155	0,007622	0,007882	0,002123	0,004697	0,00934	0,018402	0,039474	0,085988	0,067136	0,015445	0,002555	0,003594	0,008702

1,56	1,6	1,64	1,68	1,72	1,76	1,8	1,84	1,88	1,92	1,96	2	2,04	2,08	2,12	2,16	2,2	2,24	2,28	2,32
0,004619	0,006659	0,004217	0,003284	0,00503	0,005506	0,002919	0,002398	0,002668	0,005148	0,005717	0,008944	0,023758	0,02674	0,011043	0,007899	0,002944	0,005372	0,006567	0,004951
0,000467	0,001991	0,001482	0,002597	0,005693	0,005001	0,002198	0,002327	0,004104	0,008245	0,007533	0,013796	0,02836	0,021601	0,007541	0,005768	-0,00044	0,002935	0,004316	0,004734
0,003793	0,006333	0,00333	0,002475	0,004198	0,004089	0,001948	0,001506	0,002228	0,005047	0,005217	0,011004	0,028015	0,025595	0,009497	0,006885	0,001978	0,005323	0,006262	0,004138
0,002505	0,003242	0,001626	0,002228	0,004294	0,003862	0,001703	0,001628	0,002676	0,005891	0,006421	0,012342	0,028255	0,025796	0,009836	0,005564	0,001307	0,005406	0,004637	0,004789
0,006189	0,006315	0,003531	0,003336	0,005398	0,005847	0,002277	0,001746	0,002197	0,005737	0,005041	0,008806	0,022142	0,023649	0,010864	0,008513	0,003128	0,005927	0,006081	0,004509
0,00471	0,010099	0,005525	0,002766	0,003317	0,003024	0,001856	0,001657	0,002263	0,003815	0,004023	0,009723	0,026483	0,021294	0,008251	0,005482	0,002357	0,006846	0,010263	0,004066
0,004831	0,005702	0,004302	0,00378	0,005557	0,005331	0,003111	0,002359	0,00262	0,004601	0,003711	0,00977	0,02819	0,023996	0,012155	0,00883	0,00343	0,006782	0,006674	0,006069
0,000866	0,00206	0,001718	0,0008	0,000894	0,001045	0,000592	0,000401	0,000439	0,000967	0,001272	0,001676	0,00552	0,008301	0,003496	0,002252	0,000929	0,001183	0,002874	0,001484
0,003603	0,007729	0,006107	0,003332	0,004006	0,004798	0,003069	0,002216	0,002315	0,0042	0,004986	0,007297	0,021321	0,032094	0,013133	0,007728	0,004054	0,005149	0,010169	0,005859
0,00513	0,00969	0,005143	0,002912	0,00356	0,003605	0,002252	0,001974	0,002603	0,003984	0,005064	0,013428	0,029634	0,025881	0,008868	0,005859	0,002508	0,00768	0,008916	0,004124
0,001719	0,003671	0,002028	0,002124	0,00395	0,003453	0,001711	0,001383	0,002384	0,004699	0,005469	0,013876	0,028357	0,023574	0,008488	0,005664	0,000949	0,004001	0,005222	0,004365
0,002499	0,00382	0,002112	0,002334	0,005909	0,006616	0,002018	0,00074	0,000813	0,004466	0,005381	0,009958	0,031336	0,03645	0,013049	0,008177	0,001805	0,005877	0,005038	0,004358
0,003124	0,005528	0,00279	0,001835	0,003452	0,003525	0,001561	0,001358	0,002176	0,004669	0,005825	0,011022	0,026859	0,023846	0,008065	0,005959	0,001445	0,004886	0,006004	0,003708
0,005535	0,007374	0,004141	0,003429	0,004982	0,005012	0,002641	0,002112	0,002606	0,004976	0,005097	0,010632	0,026096	0,028583	0,011351	0,007036	0,002606	0,006093	0,006278	0,00431
0,00578	0,009681	0,005075	0,002855	0,003404	0,003088	0,001471	0,001059	0,001672	0,003303	0,004069	0,011424	0,030618	0,031076	0,008733	0,003843	0,002248	0,006819	0,008231	0,00344
0,004106	0,005115	0,002919	0,002479	0,003958	0,004198	0,0021	0,001621	0,001808	0,00374	0,004809	0,009346	0,021806	0,024969	0,009321	0,00641	0,002534	0,00482	0,004993	0,003938
0,005659	0,006624	0,003779	0,003007	0,004101	0,004103	0,00241	0,001977	0,002251	0,004445	0,005136	0,010449	0,025904	0,024419	0,011168	0,008623	0,003061	0,006113	0,005774	0,004694
0,005253	0,004137	0,003306	0,003683	0,006191	0,006048	0,002618	0,001915	0,002472	0,005677	0,006396	0,009802	0,023671	0,024726	0,009981	0,006464	0,002562	0,00362	0,004316	0,004501
0,004654	0,003492	0,005795	0,002962	0,002516	0,003403	0,00307	0,001513	0,001163	0,001437	0,003087	0,00275	0,008126	0,022614	0,01879	0,007241	0,004987	0,001832	0,005932	0,005847
0,006269	0,002332	0,004977	0,004748	0,002039	0,002696	0,003693	0,002234	0,001564	0,001789	0,003413	0,003742	0,005271	0,014038	0,021084	0,008987	0,006183	0,00296	0,003036	0,007499
0,004756	0,008412	0,008996	0,004188	0,003687	0,004433	0,003287	0,002409	0,002208	0,002948	0,003731	0,006181	0,018759	0,029681	0,014004	0,00842	0,005054	0,004453	0,011676	0,006679
0,003946	0,008011	0,004726	0,002901	0,004554	0,0043	0,002348	0,001878	0,002637	0,004544	0,004223	0,009514	0,02365	0,025682	0,009915	0,006506	0,002805	0,006575	0,008891	0,004888
0,003592	0,003978	0,003328	0,001744	0,003587	0,005694	0,00283	0,001863	0,002334	0,005963	0,007719	0,006943	0,019371	0,035531	0,030407	0,006352	0,000904	0,001569	0,00601	0,003709

2,36	2,4	2,44	2,48	2,52	2,56	2,6	2,64	2,68	2,72	2,76	2,8	2,84	2,88	2,92	2,96	3	3,04	3,08	3,12
0,006626	0,004734	0,003889	0,006048	0,003211	0,002386	0,001163	0,001315	0,002596	0,003744	0,005573	0,004879	0,003266	0,001831	0,002254	0,002775	0,003697	0,007773	0,007191	0,00254
0,008141	0,003499	0,004409	0,006287	0,001178	0,000528	0,00028	0,001324	0,003431	0,004048	0,004461	0,003722	0,002865	0,003099	0,005079	0,006185	0,008222	0,013529	0,009443	0,006018
0,00629	0,003724	0,003503	0,005597	0,00223	0,001326	0,000404	0,000801	0,002305	0,003149	0,005019	0,00437	0,002588	0,001489	0,002055	0,002658	0,003842	0,007546	0,005541	0,002642
0,0081	0,004618	0,003083	0,003731	0,002071	0,00178	0,00044	0,001242	0,003472	0,004679	0,005629	0,004234	0,002558	0,001821	0,002499	0,003202	0,004603	0,008238	0,006281	0,003329
0,006526	0,005735	0,003552	0,006334	0,002423	0,001503	0,000508	0,000598	0,002365	0,003247	0,004568	0,003867	0,002602	0,001338	0,001917	0,002915	0,00382	0,008463	0,008087	0,003322
0,004439	0,003481	0,003175	0,004496	0,002257	0,001707	0,001407	0,001837	0,002538	0,003273	0,005095	0,005569	0,003887	0,002487	0,002627	0,002915	0,003623	0,005845	0,00494	0,002995
0,009084	0,006605	0,00724	0,008082	0,00431	0,002803	0,001578	0,0021	0,003405	0,003986	0,004813	0,004119	0,006859	0,002095	0,003412	0,003589	0,004811	0,009075	0,005213	0,002384
0,001425	0,001468	0,001044	0,001857	0,001072	0,000616	0,000536	0,000554	0,000737	0,001004	0,001487	0,002116	0,002143	0,001345	0,001139	0,001367	0,001512	0,002059	0,002372	0,00155
0,005767	0,006041	0,004421	0,00626	0,004017	0,002631	0,002254	0,001946	0,002884	0,004125	0,005358	0,006352	0,006829	0,00348	0,002808	0,003797	0,004096	0,006389	0,008668	0,003896
0,004689	0,003999	0,004821	0,005997	0,002453	0,001637	0,001373	0,002006	0,002969	0,00459	0,007632	0,007963	0,007719	0,002135	0,003106	0,003799	0,004529	0,007138	0,005617	0,003643
0,005727	0,004453	0,005429	0,00639	0,001848	0,000721	0,000121	0,001016	0,002715	0,003843	0,004489	0,0041	0,006038	0,001308	0,002506	0,003347	0,004905	0,00824	0,005869	0,003874
0,008742	0,01285	0,005189	0,004522	0,000459	-0,00076	-0,00116	-0,00119	8,02E-05	0,001745	0,002997	0,00249	0,008048	-0,00038	-0,00025	0,001801	0,00258	0,007912	0,006959	0,000496
0,005648	0,003041	0,003094	0,00504	0,00153	0,00102	7,52E-06	0,000421	0,002086	0,003461	0,00579	0,005032	0,002531	0,001325	0,002107	0,003268	0,004285	0,008247	0,006443	0,002598
0,006615	0,004468	0,00381	0,005533	0,002553	0,00166	0,001038	0,001532	0,002688	0,003677	0,005673	0,005365	0,003556	0,001658	0,00231	0,002714	0,00419	0,007737	0,006121	0,002336
0,005327	0,002913	0,001662	0,002007	0,00129	0,000755	0,000346	0,000642	0,001327	0,002743	0,006488	0,005659	0,00295	0,001133	0,001347	0,001453	0,00277	0,004687	0,003739	0,001126
0,006088	0,004094	0,00285	0,004493	0,002284	0,00156	0,000771	0,001033	0,002138	0,003811	0,005621	0,004529	0,002465	0,001325	0,001974	0,002501	0,003662	0,006572	0,006104	0,002311
0,006657	0,004921	0,004251	0,006746	0,002915	0,001928	0,001126	0,001368	0,002568	0,003803	0,006276	0,005405	0,003715	0,001873	0,002337	0,002704	0,003326	0,00637	0,005813	0,002388
0,007998	0,005475	0,003121	0,003966	0,002333	0,001526	0,000278	0,000473	0,002002	0,003053	0,004502	0,003282	0,001585	0,000742	0,001866	0,002634	0,004082	0,008182	0,006179	0,002239
0,003869	0,004754	0,003472	0,003575	0,00397	0,001836	0,001185	0,00059	0,000999	0,001999	0,002758	0,004548	0,004969	0,006196	0,001609	0,001723	0,002052	0,002921	0,005213	0,00331
0,004289	0,003638	0,003727	0,003691	0,005966	0,003386	0,002063	0,001912	0,001828	0,002376	0,003368	0,004346	0,005659	0,005787	0,003735	0,002925	0,003962	0,004161	0,005834	0,007128
0,005245	0,005477	0,005075	0,006973	0,005027	0,003074	0,002554	0,00223	0,002733	0,003753	0,004873	0,006626	0,007542	0,004572	0,002903	0,003766	0,00383	0,005091	0,00668	0,003642
0,005686	0,004536	0,004782	0,006299	0,003197	0,002044	0,001692	0,001978	0,002783	0,004006	0,005832	0,005793	0,005973	0,002498	0,003196	0,003725	0,004297	0,007427	0,007426	0,003926
0,004779	0,006673	0,002478	0,004356	0,001372	0,000267	0,000355	0,000215	0,00102	0,002651	0,003632	0,004172	0,002499	0,001102	0,001794	0,003179	0,003905	0,007788	0,011385	0,002965

3,16	3,2	3,24	3,28	3,32	3,36	3,4	3,44	3,48	3,52	3,56	3,6	3,64	3,68	3,72	3,76	3,8	3,84	3,88	3,92
0,002656	0,004119	0,031518	0,030469	0,00442	0,004163	0,00971	0,0277	0,026668	0,018863	0,017262	0,012161	0,007946	0,011861	0,029421	0,031176	0,019508	0,019582	0,016722	0,021855
0,009037	0,016812	0,05201	0,031011	0,002503	0,008649	0,019799	0,037738	0,032242	0,019225	0,018267	0,009867	0,009301	0,017023	0,049314	0,026785	0,015246	0,020334	0,011275	0,018215
0,003176	0,006528	0,037744	0,027695	0,003611	0,004763	0,011022	0,027116	0,024902	0,016836	0,015498	0,010776	0,007644	0,012645	0,034828	0,025732	0,016228	0,017904	0,013736	0,01951
0,0042	0,008313	0,033291	0,023408	0,003585	0,006293	0,012459	0,022385	0,018949	0,012789	0,014914	0,014272	0,010781	0,014508	0,031397	0,021927	0,014743	0,016678	0,013085	0,01856
0,003	0,004811	0,027452	0,030504	0,004679	0,004673	0,012335	0,031868	0,028351	0,019085	0,017684	0,012277	0,010109	0,011377	0,02849	0,032906	0,018883	0,019842	0,016976	0,021718
0,003322	0,005978	0,034351	0,023913	0,004277	0,005017	0,010754	0,026402	0,025385	0,018014	0,016092	0,008246	0,007016	0,009822	0,025756	0,026047	0,014623	0,018261	0,014426	0,020033
0,002204	0,007566	0,039993	0,025945	0,005308	0,006792	0,014212	0,023907	0,025235	0,020912	0,017974	0,009975	0,008616	0,013582	0,041052	0,028303	0,016834	0,022409	0,018099	0,02502
0,00153	0,001739	0,005876	0,006708	0,003244	0,001972	0,002703	0,005513	0,00561	0,006162	0,003522	0,003839	0,002365	0,00282	0,004576	0,008921	0,00535	0,00392	0,005273	0,005103
0,004363	0,004925	0,019941	0,024461	0,011477	0,005642	0,007948	0,019892	0,020384	0,022757	0,013001	0,014257	0,009235	0,011744	0,018949	0,033189	0,02093	0,01502	0,020796	0,020975
0,004528	0,008564	0,037262	0,020548	0,002246	0,004753	0,009617	0,021933	0,019734	0,012779	0,011399	0,007071	0,005685	0,010445	0,023867	0,021472	0,009007	0,011842	0,01018	0,012988
0,004719	0,01225	0,04589	0,021917	0,003242	0,006744	0,012772	0,025618	0,024985	0,015928	0,014998	0,010044	0,00827	0,014797	0,037648	0,025901	0,014388	0,017798	0,015316	0,018185
-0,00012	0,002347	0,024491	0,020669	0,00285	0,002262	0,002017	0,008767	0,007498	0,005921	0,005882	0,01166	0,006589	0,010792	0,025252	0,014059	0,013753	0,007728	0,008534	0,012056
0,003706	0,007614	0,037735	0,030074	0,003133	0,00584	0,014328	0,03266	0,029881	0,019407	0,016741	0,009561	0,007278	0,011672	0,036546	0,026913	0,016009	0,01941	0,013425	0,019691
0,002093	0,004474	0,031202	0,024256	0,003486	0,003965	0,009665	0,024209	0,02391	0,016268	0,019236	0,012352	0,007916	0,014038	0,02796	0,030529	0,016014	0,019139	0,015643	0,022176
0,00107	0,00248	0,02144	0,017378	0,002105	0,002562	0,007395	0,018042	0,018081	0,01205	0,014549	0,009433	0,005545	0,011711	0,021336	0,021788	0,011663	0,014353	0,011224	0,016575
0,002312	0,004317	0,034599	0,032468	0,00357	0,003507	0,012425	0,038801	0,03905	0,0261	0,024189	0,012799	0,007781	0,013102	0,034764	0,042781	0,023239	0,028528	0,022724	0,031638
0,002353	0,004813	0,031469	0,02913	0,004477	0,005565	0,011857	0,029662	0,027712	0,019151	0,017242	0,012685	0,008354	0,010368	0,030908	0,028049	0,018206	0,019524	0,015801	0,02171
0,002854	0,006274	0,041592	0,032345	0,003443	0,005508	0,013303	0,030948	0,029416	0,019561	0,01896	0,013769	0,009088	0,012609	0,034855	0,032159	0,019097	0,019424	0,014436	0,020651
0,001385	0,001115	0,003928	0,030002	0,034659	0,003004	0,002639	0,016682	0,04455	0,045273	0,036447	0,02362	0,007314	0,006037	0,009765	0,043419	0,040077	0,021672	0,033222	0,022949
0,004229	0,004087	0,004897	0,018185	0,025476	0,009126	0,004785	0,007007	0,016914	0,017787	0,020111	0,011002	0,010761	0,006538	0,007834	0,013744	0,025466	0,016802	0,011255	0,016289
0,002974	0,002945	0,015607	0,031269	0,011947	0,005039	0,006322	0,014907	0,018184	0,022128	0,011656	0,012786	0,007771	0,008243	0,013177	0,027668	0,019273	0,012799	0,018077	0,018326
0,004262	0,006549	0,034028	0,022797	0,005998	0,005962	0,009002	0,020567	0,01931	0,014908	0,013722	0,010279	0,008655	0,012636	0,026208	0,027259	0,013982	0,01477	0,015023	0,018339
0,002365	0,003856	0,028943	0,02958	0,009204	0,003009	0,01439	0,021137	0,021086	0,024879	0,011988	0,019365	0,00992	0,013093	0,0207	0,04095	0,018401	0,015358	0,020191	0,021195

3,96	4	4,04	4,08	4,12	4,16	4,2	4,24	4,28	4,32	4,36	5,52	5,56	5,6	5,64	5,68	5,72	5,76	5,8	5,84
0,011227	0,005961	0,002809	0,003535	0,005327	0,005362	0,002012	0,002066	0,003027	0,003152	0,002961	5,99E-05	6,26E-05	5,75E-06	0,000135	9,96E-05	0,000149	0,000453	0,00111	0,000786
-0,00067	-0,00177	-0,00514	-0,00316	-0,00072	-0,00178	-0,00445	-0,00333	-0,00233	-0,00247	-0,00245	-0,00092	-0,00085	-0,00065	-0,00045	-8,3E-05	0,000342	0,001061	0,0022	0,001269
0,006466	0,00349	0,000622	0,001426	0,003063	0,002636	-0,00033	-1,7E-05	0,001074	0,001096	0,000523	0,000697	0,000596	0,000825	0,000431	0,000426	0,000637	0,000791	0,001148	0,000937
0,007054	0,005621	0,001499	0,00278	0,011027	0,010387	0,000907	0,001214	0,002782	0,00265	0,002438	-0,00185	-0,00149	-0,00162	-0,00137	-0,00145	-0,00116	-0,0007	0,000177	-0,00039
0,011846	0,006193	0,002938	0,004609	0,0079	0,008542	0,001703	0,001699	0,003599	0,003617	0,003466	0,000486	0,000247	0,000171	0,000487	0,000205	0,00031	0,001021	0,001012	0,000652
0,009585	0,005427	0,004012	0,005365	0,007239	0,006828	0,004364	0,004861	0,006222	0,0072	0,00637	-0,00243	-0,00234	-0,0022	-0,00204	-0,00204	-0,0019	-0,00169	-0,00135	-0,00143
0,009081	0,006303	0,003996	0,004964	0,009905	0,005949	0,003564	0,00376	0,004805	0,005003	0,004508	3,37E-05	5,93E-06	1,94E-05	7,03E-05	5,65E-05	0,000197	0,000327	0,000292	0,000133
0,003984	0,002232	0,001764	0,001881	0,002177	0,002749	0,001873	0,001839	0,002203	0,002535	0,002445	0,046404	0,04265	0,039475	0,036911	0,034762	0,032763	0,03107	0,029831	0,02843
0,014642	0,008166	0,006759	0,008426	0,008608	0,010158	0,006733	0,006694	0,008193	0,009557	0,009233	-0,00279	-0,00261	-0,00241	-0,00224	-0,00205	-0,00171	-0,00108	-2,1E-05	-0,0004
0,002848	-0,00032	-0,00084	0,000828	0,001956	0,000662	-0,00114	-0,0005	0,001291	0,001012	-0,00042	-0,00105	-0,00087	-0,00074	-0,00063	-0,00054	-0,00036	-0,00014	2,34E-05	-0,00017
0,0056	0,002556	0,000191	0,001507	0,003355	0,002191	-0,00014	0,000561	0,001825	0,002059	0,001317	-0,00014	-0,00011	-7,3E-06	3,32E-05	0,000138	0,00035	0,000897	0,001282	0,000944
0,00267	0,002064	-0,00169	-0,00142	0,014877	0,012267	-0,00482	-0,0056	-0,00483	-0,00542	-0,00642	0,00435	0,003981	0,003582	0,003435	0,003231	0,003455	0,004342	0,005323	0,003889
0,004471	0,001542	-0,00076	5,57E-05	0,001812	0,00098	-0,00183	-0,00147	-0,00014	-0,00026	-0,00074	0,00032	0,000397	0,000673	0,000851	0,00095	0,000661	0,001046	0,001537	0,001017
0,010727	0,005354	0,002928	0,00349	0,004672	0,004932	0,00204	0,002216	0,003251	0,003264	0,002771	3,26E-05	9,68E-05	0,000121	0,000292	0,000259	-0,00014	-0,00018	-0,00015	-0,00022
0,006953	0,002259	0,00094	0,002097	0,000594	3,08E-05	8,63E-05	6,81E-05	0,000946	0,001329	0,000532	0,000371	0,000285	0,000195	0,000169	5,7E-05	3,29E-05	7,17E-05	0,000104	3,74E-05
0,012853	0,00468	0,002305	0,003312	0,001483	0,00161	0,001222	0,00108	0,001556	0,002084	0,001932	-0,00013	-0,00017	-0,00018	-0,00011	-0,00016	-0,00014	0,000165	0,00048	1,08E-05
0,009773	0,00573	0,002717	0,003642	0,005346	0,006781	0,00203	0,002083	0,002605	0,002744	0,002485	0,000228	0,000185	0,000289	0,000287	0,000328	0,000466	0,000824	0,001639	0,001384
0,006368	0,003288	0,000105	0,001908	0,000146	0,000236	-0,00168	-0,00179	-0,00111	-0,00146	-0,00135	0,00123	0,001115	0,001054	0,001008	0,000994	0,000952	0,001396	0,001595	0,00097
0,038625	0,009695	0,00532	0,003578	0,004612	0,006778	0,005131	0,003073	0,003346	0,004726	0,004707	-2,7E-05	-1,6E-05	-8,3E-05	-2E-05	-2,9E-05	2,8E-05	0,0001	0,000345	0,00052
0,015478	0,010886	0,005386	0,004479	0,005006	0,005796	0,006418	0,00479	0,004818	0,005978	0,007144	0,012361	0,011197	0,010416	0,009583	0,00903	0,007958	0,006683	0,006695	0,007123
0,014675	0,008403	0,007011	0,006814	0,007945	0,009006	0,007181	0,006949	0,008024	0,009947	0,009662	-0,00165	-0,00155	-0,00157	-0,00153	-0,00139	-0,00129	-0,00117	-0,00089	-0,00083
0,009782	0,005655	0,00441	0,00595	0,00685	0,006367	0,003941	0,004436	0,005891	0,006515	0,00587	0,00428	0,002646	0,001007	-0,00043	-0,00188	-0,00152	-0,00105	-0,00068	-0,00098
0,013521	0,001573	-0,00102	-0,00084	-0,00109	-0,00158	-0,00201	-0,00178	-0,00237	-0,00115	-0,00133	6,13E-05	4,83E-05	-0,00019	-0,00029	-0,00061	-0,00049	-0,00039	-4E-05	-0,00015

5,88	5,92	5,96	6	6,04	6,08	6,12	6,16	6,2	6,24	6,28	6,32	6,36	6,4	6,44	6,48	6,52	6,56	6,6	6,64
0,000428	8,84E-05	-0,0001	-0,00013	-7,9E-05	-0,00015	-0,00019	-0,00014	-0,00014	-0,00012	-9,7E-05	-0,00014	-0,00016	-5,3E-05	-0,00016	-0,00016	-9,8E-05	-6,9E-05	-0,00011	-5,7E-05
0,000816	0,001229	0,001476	0,002021	0,002914	0,003369	0,003959	0,003473	0,001614	-0,00129	-0,00196	-0,00223	-0,00185	-0,00166	-0,00137	-0,00126	-0,00117	-0,00111	-0,00098	-0,00096
0,000671	0,000556	0,000352	-0,00014	-0,00012	-0,00016	-0,0002	-0,0002	-0,00029	-0,00016	-0,0001	-9,9E-05	-0,00011	-0,00018	-0,00022	-0,00019	-0,00012	-0,00013	-6E-05	-7,1E-05
-0,00085	-0,00094	-0,00095	-0,00098	-0,00103	-0,00124	-0,00138	-0,0013	-0,00122	-0,00111	-0,001	-0,00093	-0,00089	-0,00086	-0,00086	-0,00074	-0,00072	-0,00067	-0,00065	-0,0006
0,000338	0,000159	0,000222	0,00018	3,31E-05	-5,4E-05	0,00018	0,000102	8,72E-05	-0,00014	-0,00011	-0,00047	-0,00056	-0,00041	-0,00046	-0,00069	-0,00041	-0,00064	-0,00042	-0,00055
-0,00153	-0,00141	-0,0014	-0,00131	-0,00124	-0,00123	-0,00115	-0,00115	-0,00107	-0,00095	-0,0009	-0,00089	-0,00087	-0,00086	-0,0008	-0,00078	-0,00072	-0,0007	-0,00067	-0,00061
0,000118	7,93E-05	2,84E-05	-8,4E-05	-5,5E-05	-0,0001	-0,00011	-0,00015	-0,00011	-7,4E-05	-9,2E-05	-2E-05	-6,5E-05	-0,00011	-0,00014	-0,00011	3,98E-05	-9,8E-05	-0,00012	-8,2E-05
0,027217	0,026061	0,025029	0,023948	0,023078	0,021948	0,020874	0,019843	0,018733	0,017578	0,016413	0,015241	0,014082	0,012877	0,011621	0,010442	0,009505	0,008491	0,007574	0,006745
-0,00088	-0,00126	-0,00171	-0,00169	-0,00159	-0,00146	-0,00127	-0,00106	-0,00111	-0,00123	-0,0012	-0,00113	-0,00124	-0,00121	-0,00111	-0,00108	-0,00107	-0,00102	-0,00099	-0,00093
-6,9E-05	-4E-05	-1,5E-05	1,6E-05	-0,00036	-0,0005	-0,00045	-0,00027	-0,00042	-0,00034	-0,00035	-0,00042	-0,0004	-0,00031	-0,00025	-0,00024	-0,00019	-0,00017	-0,00014	-1,5E-05
0,000947	0,001333	0,00175	0,00225	0,002913	0,003377	0,003619	0,003304	0,002267	0,001372	0,000655	0,000203	-9,5E-05	-0,00032	-0,00041	-0,00053	-0,00046	-0,00052	-0,00045	-0,00046
0,002974	0,002512	0,00196	0,001406	0,001369	0,001141	0,001205	0,000887	0,000789	0,00073	0,000647	0,000708	0,000681	0,000584	0,000411	0,00033	0,000316	0,000368	0,000319	0,000176
0,000541	0,000498	0,000371	0,000547	0,000401	0,000385	-0,00067	-0,00062	-0,00048	-0,00052	-0,00047	-0,00058	-0,00047	-0,00055	-0,00051	-0,00049	-0,00039	-0,00038	-0,00038	-0,00039
-0,00019	-8,4E-05	-0,00014	-9,2E-05	-0,00011	-9,8E-05	-0,00015	-9,7E-05	-3,6E-05	-7,4E-05	-8,4E-05	-0,00012	-3,2E-05	-8,3E-05	-0,00011	-8,7E-05	-8,3E-05	-4,6E-05	-4,9E-05	-6E-06
5,94E-05	0,000118	2,76E-05	1,02E-05	-3,1E-05	-4E-05	-8,2E-05	-6E-05	-5,6E-05	-9,8E-05	-2,9E-05	-4,7E-05	-0,00011	-7E-05	-5,6E-05	-7,1E-05	-0,00012	-4,6E-05	-6,6E-05	-8,1E-05
6,98E-05	-3,3E-05	-0,00012	-0,00016	-0,00012	-0,00012	-0,00019	-0,00018	-0,00018	-0,00015	-0,00013	-0,0001	-0,00011	-0,00012	-0,00014	-6,1E-05	-0,00015	-9,6E-05	-4,7E-05	-6,6E-05
0,001114	0,000554	0,000235	5,54E-05	-0,00018	-9,5E-05	2,03E-06	-5E-05	-0,00011	6,51E-05	-1,6E-05	-3,3E-05	-0,00011	-6,3E-05	-8,2E-05	-9,3E-05	-4,7E-05	-4,2E-05	-8,4E-05	-4,3E-05
0,000653	0,000575	0,000473	0,000348	0,000317	0,000303	0,000329	0,000249	0,000192	0,000184	8,06E-05	0,000109	0,000106	9,59E-05	6,35E-05	8,95E-05	6,29E-05	6,76E-05	0,000104	3,89E-05
0,000558	0,000757	0,001053	0,001431	0,001982	0,002675	0,003705	0,004928	0,004974	0,003741	0,001626	0,000515	-5,1E-05	-0,00027	-0,00026	-0,00029	-0,00026	-0,00024	-0,00023	-0,00019
0,007303	0,00747	0,007871	0,008254	0,008453	0,00863	0,008763	0,008405	0,007814	0,006986	0,00606	0,005251	0,004248	0,003273	0,002501	0,001781	0,001337	0,00087	0,000567	0,000322
-0,00083	-0,00074	-0,00072	-0,00056	-0,00041	-0,00032	-0,00021	-0,0003	-0,00054	-0,00086	-0,00078	-0,00079	-0,0007	-0,00074	-0,00073	-0,0007	-0,00065	-0,0006	-0,00061	-0,00057
-0,00112	-0,00107	-0,00111	-0,00105	-0,00103	-0,00096	-0,0009	-0,00092	-0,00086	-0,00079	-0,00077	-0,00069	-0,00078	-0,00056	-0,00065	-0,00057	-0,00054	-0,00045	-0,00049	-0,00046
-0,00024	-0,00035	-0,00035	-0,00047	-0,00048	-0,00049	-0,00048	-0,0005	-0,00054	-0,00049	-0,00042	-0,00037	-0,00047	-0,0004	-0,0004	-0,00041	-0,0004	-0,00041	-0,00039	-0,00036

6,68	6,72	6,76	6,8	6,84	6,88	6,92	6,96	7	7,04	7,08	7,12	7,16	7,2	7,24	7,28	7,32	7,36	7,4	7,44
-8,5E-05	0,000137	-4,8E-06	9,14E-05	0,000154	0,00019	0,000768	0,000375	0,000265	0,000294	0,000791	0,000198	2,01E-05	0,000404	0,000374	0,000259	0,000362	0,000678	0,000371	0,000479
-0,00077	-0,0004	-0,00048	-0,00048	-0,0002	-8,2E-05	0,000428	-0,00012	-4,3E-05	1,6E-05	0,000566	-0,00031	-0,0003	0,000255	-2,4E-05	-4E-05	0,000389	0,000397	0,000134	0,000326
-7,2E-05	0,000139	6,95E-05	5,39E-05	0,000173	0,000197	0,000652	0,000386	0,00023	0,000285	0,000724	0,000184	9,09E-05	0,000375	0,00018	0,0002	0,000481	0,000673	0,000301	0,000446
-0,00051	-0,00034	-0,00045	-0,00038	-0,00022	-6,6E-05	0,000572	4,84E-05	-4,5E-05	2,34E-05	0,00033	-0,00018	-0,00021	0,000351	8,1E-05	1,23E-05	0,000496	0,000744	0,000304	0,000442
-0,00047	-0,00025	-0,00026	-0,00047	-0,00032	-0,00022	0,000695	-3,2E-05	8,35E-06	-8,6E-05	0,000225	-0,00033	-0,00027	0,000269	0,000474	1,24E-05	0,000231	0,000551	0,000321	0,000563
-0,0006	-0,00035	-0,00048	-0,00044	-0,00038	-0,00027	9,37E-05	-0,00016	-0,00015	-7,6E-05	6,76E-05	-0,00025	-0,0002	6,15E-05	-0,00013	-0,00013	2,57E-05	8,47E-05	-3,2E-05	-7,5E-06
1E-05	0,00029	8,67E-05	0,000196	0,000363	0,000521	0,000787	0,00036	0,000317	0,000667	0,000506	0,00019	0,00015	0,000738	0,000206	0,000205	0,000529	0,000377	0,000192	0,000214
0,00598	0,005333	0,004712	0,004149	0,003672	0,003242	0,002952	0,002558	0,002251	0,001972	0,001786	0,001454	0,001288	0,001146	0,00103	0,000906	0,00079	0,000711	0,000582	0,000473
-0,00091	-0,00076	-0,00056	-0,00066	-0,00055	-0,00051	-0,00023	-0,00026	-0,00014	-0,00026	1,44E-06	-0,00026	-0,00034	-0,00021	-9,8E-06	5,63E-05	1,15E-05	0,000405	0,000147	2,47E-05
1,44E-05	0,000199	1,77E-07	0,000108	0,000237	0,000197	0,000593	0,000173	0,000236	0,000341	0,000199	5,18E-05	6,66E-05	0,000382	0,000217	0,000169	0,00023	0,000161	7,12E-05	-4,8E-05
-0,00049	-0,00017	-0,00032	-0,00021	-0,00011	-6,5E-05	0,000392	2,79E-05	2,6E-05	0,000181	0,000251	-0,00021	-8,2E-05	0,000326	0,000173	0,000282	0,000334	0,000421	5,53E-05	4,37E-05
0,000143	0,000303	0,000244	0,000456	0,0007	0,0008	0,001378	0,000314	0,000278	0,000172	0,000335	0,001262	0,000458	0,000925	0,001195	0,00047	0,000588	0,002046	0,000959	0,001445
-0,00036	-9E-05	-0,00019	-0,00016	-8,9E-05	5,91E-05	0,000524	5,76E-05	0,000118	4,52E-05	0,000599	7,16E-05	-7,6E-05	0,000248	6,64E-05	-1,2E-05	0,000275	0,000507	0,000179	0,000374
-4,7E-05	0,000111	0,00011	0,000229	0,000249	0,000173	0,00082	0,000423	0,000424	0,000414	0,000707	0,000123	0,000121	0,00054	0,000377	0,000255	0,000597	0,000829	0,000493	0,000412
-3,9E-05	1,56E-05	-1,8E-07	0,000274	0,000143	0,000146	0,000459	0,000275	0,000267	0,000222	0,000348	6,73E-05	6,87E-05	0,000279	0,000173	0,00015	0,000455	0,000627	0,000367	0,000293
-0,00011	9,32E-05	8,86E-05	9,45E-05	0,000213	0,000184	0,000646	0,000397	0,00031	0,000373	0,000712	0,000197	7,89E-05	0,000475	0,000359	0,000237	0,000451	0,000823	0,000438	0,000596
-1,5E-05	0,000137	9,74E-05	6,48E-05	8,63E-05	0,000202	0,000761	0,000392	0,000352	0,000364	0,000776	0,000181	0,000164	0,000499	0,000351	0,000165	0,000406	0,000552	0,000287	0,000425
6,19E-05	0,000268	0,000192	0,000241	0,000348	0,000361	0,000995	0,000408	0,000488	0,000526	0,000987	0,000302	0,000169	0,000622	0,000496	0,000239	0,000643	0,001007	0,000431	0,000724
-0,00026	-0,00018	-9E-06	-0,00011	-0,00012	-5,1E-05	2,89E-05	0,000334	0,000225	7,51E-05	0,000139	0,000319	4,63E-05	1,68E-06	0,00026	3,92E-05	9,35E-05	0,000244	0,000338	0,000104
0,000181	-7,3E-05	-7,6E-05	-6,8E-05	-0,00015	-0,00021	-0,00022	7,37E-05	-3,9E-05	-0,00013	-0,00017	8,95E-05	-0,00029	-0,00034	-0,00019	-3E-06	-0,00014	-0,00014	-2,4E-05	-6,9E-05
-0,00054	-0,00046	-0,00026	-0,00037	-0,00027	-0,00029	-5,4E-05	2,73E-05	-0,00012	-6,1E-05	0,000242	-6,1E-05	-0,00017	-0,00011	0,000161	-3,4E-05	3,6E-05	7,01E-05	6,02E-05	4,66E-05
-0,0004	-0,00023	-0,00029	-0,00021	-0,00016	-0,00017	0,0004	0,000216	5,18E-05	0,000166	0,000202	-3,6E-05	-0,00012	0,000269	0,000278	0,000141	0,000209	0,000243	0,000111	9,3E-05
-0,00032	-0,00014	-0,00015	-8,7E-05	4,23E-05	-5E-05	0,000996	0,000789	0,000507	0,000337	0,000479	-0,00015	-9,1E-05	0,000217	0,000379	9,68E-05	0,000241	0,00064	0,000193	0,00017

7,48	7,52	7,56	7,6	7,64	7,68	7,72	7,76	7,8	7,84	7,88	7,92	7,96	8
0,000125	-1,3E-05	2,2E-05	5,89E-05	0,000246	0,000102	0,000165	0,000713	0,000333	0,000338	0,000152	8,87E-06	-1,4E-05	2,33E-07
-0,00036	-0,00032	-0,00014	-6,5E-05	0,000124	5,89E-05	3,86E-05	0,000896	2,08E-05	3,96E-06	7,37E-07	-0,00014	-0,00021	-9,7E-05
5,85E-05	5,05E-05	2,59E-05	8,99E-05	0,000226	0,000214	0,000169	0,000702	0,000263	0,000269	0,000167	3,19E-06	-4,4E-05	-3,7E-05
-0,00023	-0,00028	-0,00017	-0,00013	3,03E-05	-1,8E-05	3,8E-05	0,000642	0,000188	0,000204	-4,9E-05	-0,00011	-0,00012	-0,00016
-0,00017	-0,0004	-0,00033	-0,00026	-9,2E-05	-0,00019	-0,00015	0,000213	-7,4E-05	-0,00017	-5,6E-05	-0,00032	-8,2E-05	-0,00016
-0,0002	-0,0002	-0,00016	4,02E-05	-6,5E-05	-6,4E-05	2,82E-05	0,000339	0,000169	7,23E-05	-6,2E-05	-8,9E-05	-5,9E-05	-7,1E-05
-1,1E-05	-4,1E-05	5,15E-05	0,000424	0,000337	0,000233	0,000251	0,000785	0,000556	0,000279	3,57E-05	-4,3E-05	-9,4E-05	-7,7E-05
0,000372	0,000288	0,000251	0,000224	0,000214	0,000133	0,000129	0,000173	0,000174	8,57E-05	3,15E-05	9,61E-06	-2E-05	-1,6E-05
-0,00016	-0,0003	-0,00031	-0,00026	-2,1E-05	-0,00014	-0,00011	0,000138	0,00031	0,000179	-7E-05	-0,00012	-0,00014	-7,6E-05
-3,8E-05	-2,8E-05	5,9E-05	0,000374	0,000105	0,000187	0,000289	0,000562	0,000175	8,41E-05	-3E-05	-0,00013	-1,4E-05	2,07E-05
-0,00013	-0,0003	-0,00018	-0,00011	0,000125	-3,3E-05	-9,6E-06	0,000431	0,000294	0,000185	-1,8E-05	-4E-05	-0,00014	-0,00013
0,000189	-9,8E-05	5,65E-05	4,27E-05	-4,6E-05	-3,3E-05	-0,0001	-0,00032	-0,00022	7,86E-05	0,000166	0,000508	-0,00018	-4,6E-05
-0,00014	-0,00021	-0,00026	-9,8E-05	6,46E-05	0,000206	2,51E-05	0,000328	0,000397	9,72E-05	-4E-05	-2,2E-06	-0,00016	-0,00011
-7,2E-06	2,51E-05	1,39E-05	0,000228	0,000152	0,000254	0,000391	0,001124	0,00039	0,000235	7,5E-05	-2E-05	5,92E-05	7,05E-06
-5E-05	-4,6E-06	-3,4E-06	8,09E-05	0,000198	0,000294	0,00032	0,000678	0,000258	0,000121	-2,6E-06	-4,1E-05	-5,3E-05	-3,3E-05
8,83E-06	2,83E-05	-1,4E-06	0,000116	0,000349	0,000178	0,00021	0,000722	0,000578	0,000383	0,000162	1,53E-05	-5,2E-06	7,6E-05
0,000101	1,62E-05	-2,2E-05	3,75E-05	0,000223	9,16E-05	0,000145	0,000633	0,00036	0,000321	0,000118	7,3E-05	-3,5E-06	-9,4E-06
-5E-05	-8,6E-05	-9,6E-05	-8,9E-05	5,86E-05	0,000147	0,000116	0,000547	0,000546	0,000224	0,000134	-8,8E-05	-0,00011	-0,00013
0,000132	-5,9E-05	-0,00012	-2,3E-05	-7,1E-05	0,000169	2,21E-05	8,21E-05	0,000304	0,000258	0,00027	0,000107	-2,5E-05	-6E-05
-8,9E-05	-0,00021	-0,0003	-0,00021	-0,00023	-2,8E-06	-0,00017	-3,8E-05	6,92E-05	0,000252	0,000119	-3,2E-05	-9,2E-05	-6,9E-05
-5,3E-05	-0,00011	-7,4E-05	-0,00013	0,000192	3,42E-05	3,05E-05	5,61E-05	0,000465	0,000361	0,000167	-2,3E-05	3,04E-05	2,67E-05
-1,3E-05	-0,00011	-8,5E-05	0,000299	8,17E-05	6,75E-05	0,000331	0,000515	0,000374	0,000333	6,43E-05	-1,4E-05	-1,9E-05	4,8E-05
-0,00017	-0,00016	3,46E-05	0,000138	0,000135	0,000248	0,000792	0,001332	0,000348	0,000103	-0,00013	-0,00015	-0,00014	-0,00015

APÊNDICE III

Planilha com os dados espectrais de RMN de ^1H a partir de amostras de Urina, usando o pré-processamento Normalização pela soma, utilizadas no presente trabalho

Amostra	Classe	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9
A1	CP	0,00264	0,000239	0,000154	8,11E-05	-3,3E-05	5,82E-06	-6E-05	5,12E-07	-7,4E-05	-3,5E-05	-2,8E-05	1,07E-05	-6,5E-07	5,12E-05	0,000209	0,000319	0,000701	0,003434
A2	CP	0,002005	0,000159	0,000134	9,91E-05	0,000103	0,000135	0,000189	0,000335	0,000195	0,000186	0,000297	0,000369	0,000399	0,000555	0,000742	0,001034	0,001497	0,00442
A3	CP	0,006687	0,000311	0,000247	2,65E-05	8,15E-05	2,76E-06	0,000123	1,78E-05	1,95E-05	0,000145	0,000142	0,000191	0,000252	0,000425	0,000643	0,000928	0,001376	0,00364
A4	CP	0,001685	0,000424	0,000443	0,000431	0,000436	0,000472	0,000528	0,000587	0,000577	0,00061	0,00071	0,000771	0,000834	0,001019	0,00128	0,001703	0,002034	0,004962
A5	CP	0,002584	0,000133	0,000112	3,62E-05	1,93E-06	-2,8E-05	-1,8E-05	7,47E-05	-8,2E-06	-6,6E-05	3,14E-05	-3,8E-05	5,98E-05	0,000118	0,000287	0,000414	0,000781	0,003049
A6	CP	0,001785	0,000114	6,21E-05	3,52E-05	-1,3E-05	-1,8E-05	-1,9E-05	5,43E-05	4,28E-06	-1,1E-05	6,7E-05	8,91E-05	8,82E-05	0,000209	0,000609	0,000677	0,001268	0,005099
A7	CP	0,004731	0,000724	0,0003	0,00016	7,47E-05	8,62E-05	0,000151	0,000245	0,000213	0,000265	0,00035	0,000372	0,000433	0,000607	0,000831	0,001087	0,001639	0,004407
A10	CP	0,005614	0,000312	0,000187	8,77E-05	-1,7E-05	1,87E-05	-1,4E-05	2,39E-05	-4,4E-05	-0,00011	-5,3E-05	3,74E-05	5,17E-06	6,25E-05	0,000359	0,00074	0,000926	0,003697
A11	CP	0,010475	0,000247	0,000363	-5,6E-06	-9,9E-05	-0,00019	-0,00015	-6,7E-05	-7,9E-05	-0,00014	-0,00014	-2,2E-05	-3,1E-05	9,65E-05	0,000348	0,000545	0,000688	0,003571
A15	CP	0,014673	0,000241	0,000203	-1,2E-05	5,91E-05	-5E-05	-8,8E-05	3,73E-05	-1,1E-05	-1,4E-05	6,58E-05	-1,7E-05	2,71E-06	0,000187	0,000425	0,000556	0,001063	0,003399
A16	CP	0,002306	0,000128	9,6E-05	9,33E-05	7,71E-05	4,39E-05	0,000119	0,00017	0,000145	0,000133	0,000218	0,00029	0,000322	0,000422	0,000701	0,000869	0,001487	0,004587
A17	CP	0,001314	0,000149	0,000163	6,84E-05	5,11E-05	5,33E-05	9,99E-05	0,000132	0,000119	0,000186	0,000291	0,000372	0,000444	0,000561	0,000792	0,001004	0,001618	0,004365
B1	S	0,005207	0,00034	0,000191	1,84E-05	-2E-05	-5,6E-05	-3,2E-05	6,38E-06	0,000116	0,000167	0,000124	0,000164	0,000209	0,000253	0,000355	0,000719	0,001381	0,005188
B2	S	0,001279	9,68E-05	4,71E-05	3,52E-05	5,28E-06	-1,2E-05	9,91E-06	3,87E-05	2,03E-05	1,66E-05	6,4E-05	0,000135	0,000151	0,000288	0,003035	0,003347	0,002439	0,010088
B3	S	0,001501	0,000192	0,00014	4,54E-06	-2,1E-05	-4,4E-05	-2,6E-05	3,57E-06	-6,6E-05	-6,2E-05	-3,8E-05	-5,2E-05	-1,1E-05	7,7E-05	0,000223	0,000285	0,00083	0,004497
B4	S	0,004256	0,000389	0,000377	0,00031	0,000293	0,000321	0,000345	0,000431	0,000403	0,000413	0,000479	0,000616	0,000619	0,000722	0,000996	0,001444	0,001614	0,00394
B6	S	0,005483	0,000581	0,000417	0,000133	-3,2E-05	-4,4E-05	2,1E-05	8,11E-05	-6,3E-05	-0,00013	-5,4E-05	-1,5E-05	-4,6E-05	2,78E-05	0,000356	0,000423	0,000933	0,004641
B09	S	0,005579	7,9E-05	5,87E-05	-5,6E-05	-0,00014	-0,0002	-0,00018	-9,4E-05	-0,00024	-0,00025	-0,00023	-0,00022	-0,00022	-0,00016	5,92E-05	0,000199	0,000521	0,003064
B10	S	0,006118	0,000125	9,84E-05	-1,5E-05	-3,6E-05	-5,9E-05	-8,2E-05	2,3E-05	-5,4E-05	-6,8E-05	-5,5E-05	-2,2E-05	3,9E-06	0,000162	0,000401	0,00057	0,001045	0,003938
B11	S	0,006189	3,59E-05	0,000113	4,23E-05	9,53E-06	8,93E-05	5,08E-05	8,91E-05	5,95E-05	2,06E-05	8,71E-05	0,000131	0,000122	0,000252	0,000434	0,00057	0,001161	0,004611
CB1	CB/CR	0,00182	0,00012	0,000159	0,000106	7,36E-07	1,98E-05	6,74E-05	5,77E-05	7,14E-05	9,51E-05	0,000174	0,000211	0,000224	0,000352	0,000563	0,000862	0,001083	0,00353
CB3	CB/CR	0,003844	0,000538	0,00052	0,000629	0,000603	0,00065	0,000737	0,000744	0,000935	0,001068	0,001252	0,001439	0,001695	0,00212	0,002588	0,003078	0,004528	0,008511
CB4	CB/CR	0,00115	1,59E-05	4,67E-05	6,27E-05	5,79E-05	9,35E-05	0,000155	0,000243	0,000156	0,00019	0,000288	0,00035	0,000555	0,000894	0,001093	0,001375	0,001858	0,005661
CB5	CB/CR	0,001886	0,000444	0,000531	0,000567	0,000607	0,000677	0,000732	0,000928	0,000971	0,001107	0,001379	0,001612	0,001843	0,002294	0,00279	0,003527	0,005221	0,012446
CB6	CB/CR	0,026659	9,64E-05	0,000199	0,000189	-0,00013	-2,7E-05	-4,9E-05	0,000196	-6,8E-05	-0,00028	0,000208	-6,3E-05	0,000592	0,000299	0,000496	0,002387	0,001521	0,003599
CR1	CB/CR	0,017484	0,000428	0,000487	0,000228	0,000121	0,000106	7,92E-05	3E-05	7,54E-05	5,37E-06	8,23E-05	0,000294	0,000234	0,000219	0,000265	0,000475	0,00102	0,005137
CR2	CB/CR	0,00167	0,000238	0,000262	3,78E-05	2,87E-05	-2,2E-05	-3,9E-05	0,000135	-3,7E-06	6,7E-07	0,000121	0,000221	0,000168	0,000222	0,000535	0,000987	0,001041	0,003996
CR3	CB/CR	0,005279	-1,4E-05	0,00014	0,000144	7,55E-05	0,00012	0,000149	0,000238	0,000213	0,00027	0,000375	0,000448	0,000574	0,000677	0,001094	0,001527	0,002081	0,005432
CR4	CB/CR	0,005532	-8,4E-07	3,8E-06	1,12E-05	-2,7E-05	1,68E-05	4,69E-05	2,45E-05	6,86E-05	8,26E-05	0,000109	0,000171	0,000232	0,000336	0,000449	0,00074	0,001212	0,003606
CR5	CB/CR	0,008707	-0,00015	-2,1E-05	1,08E-05	-8,7E-05	-9,1E-06	3,7E-05	0,000138	-9,4E-07	3,52E-05	0,000167	0,000167	0,000276	0,000343	0,000609	0,000817	0,00139	0,004193

0,95	1	1,05	1,1	1,15	1,2	1,25	1,3	1,35	1,4	1,45	1,5	1,55	1,6	1,65	1,7	1,75	1,8	1,85	1,9
0,004354	0,002298	0,001554	0,002857	0,002694	0,005187	0,006764	0,005578	0,005477	0,004829	0,003281	0,004634	0,003732	0,004368	0,004958	0,005644	0,005428	0,006724	0,005322	0,005575
0,004765	0,003028	0,00221	0,002837	0,00361	0,005984	0,009555	0,007373	0,006582	0,005817	0,005958	0,00678	0,005107	0,005567	0,005525	0,005966	0,006584	0,006624	0,006286	0,006569
0,004255	0,002714	0,002317	0,003153	0,003792	0,005311	0,007344	0,006621	0,006424	0,005035	0,004529	0,006346	0,004474	0,004987	0,005386	0,005969	0,006137	0,006421	0,005811	0,005334
0,005489	0,003947	0,003012	0,00382	0,005252	0,008365	0,010562	0,010722	0,008622	0,00606	0,005042	0,006843	0,005841	0,007329	0,005891	0,006563	0,009743	0,006309	0,005391	0,005822
0,00399	0,002494	0,001863	0,002827	0,003309	0,005344	0,007838	0,00571	0,005921	0,005521	0,003739	0,005092	0,004103	0,004691	0,00523	0,006379	0,00583	0,006189	0,005844	0,005598
0,005888	0,003792	0,002558	0,003745	0,003843	0,005631	0,01338	0,009357	0,008635	0,006769	0,004731	0,007052	0,005806	0,00623	0,006006	0,006008	0,006433	0,007039	0,006854	0,006405
0,005628	0,002726	0,00211	0,002928	0,003057	0,00489	0,007172	0,006584	0,007384	0,006801	0,005156	0,004726	0,005506	0,005821	0,005703	0,006034	0,006515	0,007264	0,006398	0,00734
0,004292	0,00305	0,001872	0,00267	0,008759	0,012013	0,010725	0,006811	0,006422	0,005007	0,004537	0,005323	0,004425	0,006271	0,005482	0,006088	0,007165	0,00652	0,005524	0,005006
0,0042	0,002845	0,001678	0,002377	0,003057	0,006031	0,007417	0,006999	0,006884	0,005406	0,004796	0,006854	0,005485	0,007045	0,007611	0,008055	0,010026	0,00883	0,007613	0,007819
0,004105	0,002577	0,001912	0,002224	0,004235	0,012791	0,008997	0,006528	0,022088	0,015239	0,005403	0,00633	0,004422	0,004959	0,006951	0,008037	0,005406	0,008778	0,00885	0,005137
0,004721	0,003088	0,002176	0,003349	0,006282	0,006055	0,008021	0,006989	0,006735	0,005358	0,004268	0,006097	0,004323	0,004771	0,00535	0,005797	0,005088	0,005981	0,005906	0,006159
0,004468	0,003089	0,002284	0,003103	0,003449	0,005562	0,008882	0,006322	0,006316	0,005508	0,005853	0,006306	0,004473	0,005661	0,005401	0,005996	0,00619	0,006837	0,006093	0,006542
0,006023	0,003542	0,002229	0,003156	0,003716	0,00541	0,007734	0,007403	0,008603	0,006911	0,005596	0,007099	0,005656	0,00644	0,006289	0,006634	0,006705	0,006967	0,006542	0,005989
0,010876	0,004326	0,002859	0,003653	0,003753	0,004708	0,00939	0,007062	0,007578	0,006379	0,005921	0,006805	0,004872	0,005421	0,007026	0,008421	0,005698	0,007343	0,006239	0,005802
0,004958	0,002774	0,001587	0,002512	0,002837	0,004731	0,011584	0,008798	0,007543	0,005984	0,004527	0,007295	0,004663	0,004988	0,004772	0,004899	0,004669	0,004995	0,005026	0,00455
0,004662	0,002981	0,002366	0,003326	0,003991	0,008238	0,010694	0,007692	0,006135	0,005805	0,004432	0,005706	0,00481	0,005337	0,00614	0,007397	0,006513	0,008425	0,007574	0,005902
0,006206	0,002864	0,001758	0,002784	0,003335	0,004965	0,007949	0,006889	0,007374	0,006105	0,004952	0,00713	0,005935	0,006876	0,006495	0,007308	0,00951	0,009897	0,007518	0,006524
0,003736	0,002156	0,001217	0,002324	0,003131	0,003658	0,005397	0,004489	0,00489	0,005463	0,005585	0,008547	0,006191	0,004091	0,004118	0,009959	0,026566	0,007634	0,005129	0,007773
0,004318	0,002745	0,001937	0,002501	0,00429	0,004608	0,007004	0,00667	0,007056	0,004903	0,005017	0,007792	0,004104	0,004068	0,003978	0,00445	0,004474	0,004857	0,004322	0,004947
0,004421	0,002965	0,001928	0,002608	0,002952	0,005568	0,008527	0,007661	0,008715	0,007954	0,006404	0,008345	0,00535	0,006263	0,005295	0,005777	0,005181	0,005855	0,005974	0,006073
0,004405	0,003075	0,002202	0,003037	0,004058	0,006103	0,010478	0,007243	0,00883	0,006447	0,004621	0,005867	0,004509	0,005575	0,006381	0,00744	0,006993	0,00787	0,00764	0,006626
0,009272	0,008154	0,005829	0,005285	0,004947	0,007895	0,009713	0,011064	0,02423	0,007058	0,006051	0,008258	0,005937	0,006263	0,006605	0,007465	0,008424	0,008102	0,006809	0,007401
0,005872	0,003804	0,002572	0,00316	0,003355	0,007632	0,008383	0,007607	0,013081	0,007083	0,006238	0,008334	0,006366	0,005816	0,006224	0,006575	0,007271	0,00702	0,006222	0,007469
0,015799	0,010593	0,00679	0,007243	0,005374	0,008776	0,011223	0,010093	0,021412	0,011128	0,008373	0,00852	0,006965	0,00823	0,008207	0,009728	0,009007	0,007823	0,006979	0,008034
0,004517	0,003989	0,001766	0,002367	0,002993	0,00843	0,007332	0,008512	0,007825	0,016406	0,004801	0,005239	0,003761	0,004382	0,005058	0,005835	0,005153	0,006415	0,004808	0,005498
0,006938	0,00214	0,001971	0,003405	0,005146	0,006507	0,008528	0,006515	0,006971	0,006373	0,004313	0,007653	0,006411	0,006296	0,006597	0,006863	0,009284	0,010212	0,00828	0,007603
0,004798	0,002742	0,001964	0,00311	0,003323	0,005786	0,008107	0,007764	0,006622	0,005402	0,004304	0,005815	0,004812	0,006528	0,006388	0,007703	0,009065	0,00907	0,007226	0,006334
0,005477	0,003871	0,002916	0,003594	0,003592	0,005279	0,007598	0,008209	0,010298	0,005904	0,005618	0,007035	0,005181	0,005497	0,00588	0,006346	0,006103	0,006088	0,005916	0,007392
0,003998	0,002858	0,002258	0,002879	0,005087	0,011866	0,008097	0,005861	0,005378	0,016048	0,004852	0,004526	0,003622	0,00406	0,004337	0,00493	0,00475	0,004811	0,004559	0,005295
0,004462	0,003028	0,002309	0,003477	0,01799	0,005235	0,006207	0,006252	0,00922	0,006167	0,004364	0,006966	0,004282	0,004568	0,00518	0,006087	0,005352	0,006182	0,006408	0,00561

1,95	2	2,05	2,1	2,15	2,2	2,25	2,3	2,35	2,4	2,45	2,5	2,55	2,6	2,65	2,7	2,75	2,8	2,85	2,9
0,009332	0,007764	0,011664	0,013108	0,01008	0,007634	0,007251	0,018723	0,011996	0,006027	0,007059	0,007814	0,013784	0,01795	0,003261	0,019152	0,014849	0,005044	0,003989	0,002664
0,009748	0,007556	0,011676	0,013187	0,009276	0,007696	0,006807	0,012765	0,011073	0,006426	0,006248	0,007197	0,005947	0,004499	0,003935	0,00387	0,00964	0,004813	0,004652	0,005616
0,007533	0,007173	0,011399	0,012042	0,00916	0,008628	0,006932	0,011206	0,011479	0,007133	0,006858	0,008804	0,010879	0,011055	0,004489	0,011398	0,012117	0,004832	0,00486	0,004031
0,00924	0,011386	0,009869	0,012415	0,010948	0,009945	0,008161	0,012968	0,010606	0,007425	0,007699	0,009466	0,016912	0,019649	0,004479	0,01916	0,017783	0,004098	0,004458	0,004889
0,008492	0,008353	0,011046	0,012057	0,009688	0,009016	0,006702	0,01621	0,012782	0,006181	0,005311	0,007106	0,010552	0,011225	0,004472	0,012816	0,012328	0,004985	0,003957	0,003324
0,007434	0,007902	0,012536	0,015338	0,008183	0,008203	0,007955	0,008653	0,009038	0,00839	0,007948	0,009692	0,010174	0,011373	0,004437	0,010552	0,012401	0,006567	0,005454	0,004319
0,014832	0,010703	0,014348	0,014135	0,010419	0,008501	0,007488	0,014267	0,011436	0,007979	0,007802	0,007491	0,006844	0,006123	0,004212	0,00626	0,008966	0,005366	0,005212	0,004798
0,007524	0,008404	0,01277	0,01464	0,009063	0,010086	0,01261	0,015606	0,013217	0,007434	0,006755	0,007373	0,007765	0,007605	0,003063	0,006944	0,010285	0,003301	0,004264	0,002272
0,011377	0,010429	0,015703	0,017256	0,011582	0,009891	0,010577	0,01656	0,014529	0,011875	0,009113	0,009975	0,009765	0,010667	0,003147	0,009322	0,011535	0,003368	0,003828	0,002476
0,05385	0,013418	0,012107	0,01167	0,009997	0,007559	0,008561	0,017316	0,009465	0,008032	0,008623	0,005381	0,004262	0,002909	0,002632	0,002813	0,007221	0,002874	0,003872	0,013411
0,007767	0,007257	0,010967	0,011176	0,00745	0,007155	0,007142	0,009349	0,007542	0,006909	0,007334	0,008084	0,019196	0,025907	0,004409	0,024834	0,021061	0,005532	0,00536	0,004107
0,009667	0,007816	0,014361	0,013304	0,009598	0,006657	0,00783	0,013346	0,013697	0,005995	0,00754	0,007943	0,005756	0,004662	0,004285	0,004435	0,010645	0,005225	0,00545	0,005123
0,007791	0,009181	0,012582	0,012975	0,009091	0,007995	0,007089	0,009543	0,008979	0,008449	0,006966	0,008959	0,013695	0,016142	0,003888	0,01594	0,014598	0,005458	0,004983	0,004499
0,008408	0,007977	0,013769	0,014917	0,008978	0,008226	0,006296	0,010571	0,010099	0,006042	0,006236	0,007635	0,008918	0,010116	0,003866	0,00955	0,013512	0,005619	0,005071	0,004081
0,006193	0,005687	0,00989	0,010412	0,006783	0,006969	0,007239	0,008188	0,007972	0,006319	0,00717	0,007224	0,009022	0,010057	0,002368	0,009904	0,011848	0,003238	0,002629	0,002877
0,007749	0,007808	0,01099	0,01195	0,007843	0,007416	0,00931	0,010573	0,008902	0,007757	0,006826	0,00826	0,010244	0,011093	0,004243	0,010821	0,012591	0,005267	0,005059	0,005192
0,009044	0,008754	0,016129	0,016968	0,010255	0,00685	0,007164	0,0122	0,011728	0,009059	0,006646	0,008951	0,010025	0,011869	0,002912	0,011819	0,01253	0,003197	0,003017	0,003252
0,01321	0,00727	0,010256	0,01166	0,00668	0,006841	0,005775	0,009298	0,007914	0,005202	0,004481	0,006107	0,00552	0,004031	0,001778	0,00385	0,009032	0,00415	0,003971	0,003052
0,008959	0,006566	0,008213	0,010097	0,009913	0,007274	0,006367	0,014004	0,011382	0,006819	0,005668	0,006976	0,014123	0,019118	0,002898	0,018819	0,01832	0,003576	0,003168	0,003087
0,008802	0,007255	0,008785	0,010157	0,00813	0,008311	0,008178	0,01098	0,00984	0,00684	0,005694	0,007256	0,008754	0,009827	0,003617	0,009419	0,0116	0,004089	0,003817	0,003295
0,010524	0,011207	0,013933	0,014982	0,009217	0,007101	0,006865	0,015351	0,010071	0,007309	0,008136	0,007388	0,008604	0,008577	0,003677	0,007364	0,009976	0,004516	0,006078	0,004373
0,06117	0,00916	0,015449	0,015997	0,009042	0,010679	0,020224	0,013128	0,013036	0,008408	0,007918	0,005731	0,005381	0,004876	0,003706	0,007581	0,009038	0,003806	0,004214	0,00463
0,045917	0,008453	0,010865	0,013101	0,009084	0,008026	0,007583	0,015631	0,010952	0,008364	0,021342	0,0058	0,004254	0,003403	0,003419	0,004028	0,009795	0,004126	0,0044	0,012422
0,038759	0,010521	0,012327	0,012961	0,01105	0,011577	0,02109	0,01652	0,010729	0,006944	0,009611	0,006116	0,006425	0,006568	0,004297	0,007363	0,010536	0,004868	0,004822	0,005925
0,008536	0,007198	0,009133	0,009921	0,00837	0,007149	0,014846	0,011276	0,008397	0,005962	0,005673	0,005334	0,008339	0,011178	0,00335	0,011916	0,011341	0,003811	0,0032	0,004437
0,058842	0,010514	0,020266	0,021956	0,012739	0,00942	0,008902	0,011037	0,012309	0,009957	0,021544	0,007967	0,006994	0,0069	0,001408	0,005841	0,007805	0,001468	0,001693	0,006606
0,007824	0,009418	0,016288	0,016112	0,008987	0,007906	0,007514	0,010874	0,014144	0,00898	0,007233	0,009193	0,011494	0,012503	0,003968	0,012722	0,011756	0,006327	0,005326	0,004061
0,008691	0,008114	0,010826	0,012369	0,009342	0,031387	0,006732	0,011092	0,009968	0,006488	0,005779	0,007004	0,007298	0,007512	0,004732	0,007659	0,01065	0,005032	0,004945	0,004242
0,007353	0,006394	0,008343	0,009492	0,007878	0,010135	0,018291	0,011305	0,008293	0,005791	0,005461	0,007192	0,008653	0,00864	0,003874	0,007765	0,010383	0,003965	0,004046	0,004527
0,00787	0,00796	0,011834	0,009808	0,007191	0,007223	0,006298	0,007296	0,007395	0,006104	0,006728	0,007948	0,011934	0,014419	0,004004	0,014281	0,014902	0,005083	0,004992	0,004663

2,95	3	3,05	3,1	3,15	3,2	3,25	3,3	3,35	3,4	3,45	3,5	3,55	3,6	3,65	3,7	3,75	3,8	3,85	3,9
0,004855	0,00277	0,04174	0,033767	0,008077	0,0115	0,009987	0,029956	0,009346	0,006851	0,008533	0,007892	0,010354	0,015143	0,023112	0,03542	0,025988	0,026191	0,020544	0,015027
0,004693	0,005335	0,038985	0,078833	0,010253	0,012094	0,014262	0,026858	0,012014	0,007316	0,011343	0,009322	0,011963	0,01703	0,023192	0,033405	0,0222	0,028158	0,028531	0,019044
0,003972	0,0039	0,020497	0,063511	0,013583	0,010974	0,012107	0,022175	0,015856	0,009182	0,010191	0,010379	0,017381	0,023904	0,029097	0,030957	0,02251	0,023794	0,021702	0,018424
0,006204	0,005881	0,044265	0,046741	0,010559	0,010659	0,013186	0,028785	0,013794	0,007156	0,011212	0,009295	0,012833	0,021634	0,019834	0,028106	0,022191	0,023349	0,020863	0,017713
0,003474	0,00279	0,051715	0,079875	0,013731	0,009631	0,009755	0,022416	0,015856	0,006466	0,006215	0,006605	0,010836	0,014382	0,020665	0,029009	0,01973	0,021982	0,021412	0,014816
0,005354	0,003359	0,010583	0,097309	0,008106	0,012452	0,014435	0,024237	0,013106	0,007384	0,012527	0,009597	0,012873	0,022205	0,021451	0,029712	0,024338	0,027823	0,031405	0,021541
0,006171	0,006733	0,025812	0,059872	0,013039	0,013252	0,016541	0,021845	0,014279	0,010596	0,009405	0,009214	0,012457	0,020656	0,02114	0,028795	0,021856	0,020711	0,020458	0,014524
0,002685	0,000734	0,017731	0,09047	0,01235	0,010945	0,010141	0,033092	0,018742	0,006507	0,007346	0,010488	0,017916	0,017863	0,019512	0,028147	0,021866	0,022135	0,023513	0,016915
0,002392	0,000944	0,012012	0,084825	0,007055	0,010215	0,012739	0,027115	0,011929	0,006259	0,006642	0,007883	0,011281	0,01611	0,020122	0,032495	0,020779	0,023595	0,020289	0,015296
0,003558	0,002132	0,031933	0,047689	0,008402	0,009766	0,007628	0,019701	0,011979	0,005982	0,009217	0,009169	0,013085	0,025313	0,017624	0,035549	0,018081	0,019699	0,012309	0,012239
0,004538	0,004096	0,058972	0,046963	0,007751	0,01212	0,010498	0,018481	0,00851	0,006524	0,009786	0,010137	0,013559	0,019235	0,022083	0,0302	0,023163	0,028279	0,023911	0,018203
0,005672	0,005304	0,060452	0,056524	0,008711	0,013651	0,01738	0,041165	0,009857	0,006279	0,011917	0,009957	0,013196	0,01845	0,023849	0,033677	0,021736	0,027115	0,023768	0,0184
0,005718	0,00405	0,019409	0,080011	0,008061	0,011566	0,018574	0,022047	0,012462	0,007998	0,010366	0,009991	0,012784	0,018285	0,020242	0,027234	0,022048	0,024614	0,026757	0,017511
0,005177	0,003721	0,014273	0,089952	0,008675	0,012456	0,010618	0,034554	0,013278	0,008321	0,010765	0,009365	0,014214	0,016618	0,020795	0,029831	0,020666	0,024348	0,031904	0,018268
0,00258	0,002386	0,053699	0,041415	0,007956	0,009272	0,010616	0,022006	0,012953	0,00623	0,009761	0,008965	0,014199	0,020628	0,020235	0,029645	0,024321	0,029758	0,040181	0,019827
0,005939	0,005315	0,015148	0,076768	0,010005	0,012269	0,012486	0,022124	0,014331	0,008944	0,010199	0,010756	0,016086	0,020418	0,023976	0,038338	0,032206	0,039128	0,037712	0,027197
0,003121	0,00173	0,025833	0,086831	0,009472	0,011703	0,015141	0,058969	0,016322	0,010491	0,008744	0,006741	0,010661	0,017351	0,019263	0,026529	0,022227	0,023165	0,021857	0,013294
0,002584	0,002328	0,071292	0,056775	0,014085	0,011515	0,0143	0,034428	0,019137	0,010231	0,010918	0,0086	0,016544	0,019657	0,020918	0,031412	0,0414	0,067578	0,023636	0,01604
0,003824	0,002144	0,047565	0,05077	0,008889	0,011756	0,011703	0,02328	0,013581	0,005949	0,006838	0,008714	0,01243	0,018592	0,023052	0,035418	0,021401	0,028657	0,042083	0,020517
0,003727	0,003081	0,040613	0,040532	0,00655	0,01116	0,012972	0,021764	0,008918	0,00562	0,009418	0,00974	0,014349	0,021734	0,021683	0,031464	0,021532	0,027128	0,027741	0,0184
0,003647	0,003667	0,040141	0,031503	0,006698	0,009297	0,009105	0,027961	0,010468	0,006774	0,010257	0,010331	0,014661	0,018923	0,027065	0,037923	0,025346	0,027263	0,025291	0,01885
0,004277	0,004389	0,018022	0,033304	0,008395	0,010904	0,015361	0,019525	0,016611	0,006813	0,007967	0,008092	0,013876	0,01661	0,018307	0,026274	0,023078	0,024427	0,01754	0,017261
0,00496	0,004294	0,069019	0,025235	0,009373	0,010179	0,010044	0,020279	0,00766	0,005466	0,014075	0,009139	0,012078	0,017614	0,023998	0,033651	0,020732	0,024497	0,020784	0,017419
0,008725	0,006147	0,025634	0,033295	0,008343	0,009857	0,010459	0,028664	0,012283	0,006298	0,006979	0,007516	0,012213	0,016843	0,013293	0,02078	0,015107	0,019847	0,017529	0,012696
0,004396	0,002787	0,018169	0,056465	0,008821	0,010814	0,012807	0,033475	0,011518	0,014517	0,016677	0,016539	0,022292	0,031922	0,029606	0,033273	0,021288	0,026019	0,0224	0,017222
0,003165	-0,00023	0,011272	0,066909	0,006311	0,010278	0,011482	0,012125	0,012765	0,008415	0,006236	0,008885	0,011087	0,019738	0,021036	0,026491	0,020831	0,018596	0,017775	0,010873
0,003634	0,004211	0,059226	0,021677	0,012915	0,011891	0,011126	0,029389	0,015771	0,011913	0,010366	0,01106	0,015457	0,02006	0,023906	0,03017	0,02657	0,027227	0,02226	0,018004
0,004717	0,003961	0,013029	0,056221	0,007227	0,010809	0,013184	0,030008	0,008261	0,006076	0,008204	0,009176	0,01251	0,01948	0,032538	0,028054	0,018406	0,023952	0,020914	0,019705
0,003811	0,003721	0,014163	0,088396	0,012707	0,010457	0,011832	0,020122	0,021056	0,013841	0,008845	0,008683	0,01295	0,01756	0,018869	0,026763	0,020646	0,022025	0,024463	0,014978
0,004522	0,005063	0,02293	0,065447	0,010891	0,013286	0,012203	0,024858	0,011258	0,007812	0,008329	0,014052	0,018458	0,028	0,027689	0,032256	0,019386	0,025668	0,025562	0,020008

3,95	4	4,05	4,1	4,15	4,2	4,25	4,3	4,35	4,4	4,45	4,5	6,05	6,1	6,15	6,2	6,25	6,3	6,35	6,4
0,01666	0,031517	0,017152	0,051275	0,009082	0,013867	0,006006	0,009475	0,00102	0,001787	0,003317	0,002828	0,005602	0,003549	0,002193	0,001689	0,001632	0,001762	0,001288	0,000953
0,016005	0,024404	0,018907	0,078383	0,009911	0,010865	0,006315	0,007315	0,006439	0,005983	0,007515	0,009002	0,003933	0,002271	0,00056	0,00015	-1,3E-05	-5,7E-05	-1,5E-05	-1,1E-05
0,017373	0,033453	0,015528	0,062961	0,01227	0,011785	0,008974	0,009231	0,00805	0,009699	0,013164	0,015285	0,010028	0,002464	9,07E-05	-0,00026	-0,00045	-0,00027	-0,00038	-0,00024
0,015383	0,027126	0,014813	0,059138	0,006233	0,008477	0,00428	0,004892	0,004373	0,003954	0,004999	0,005216	0,001389	0,000794	0,000347	0,000129	-6,5E-05	-7,6E-05	-0,00011	-7E-05
0,012195	0,032536	0,012853	0,067247	0,00808	0,009592	0,003543	0,003682	0,003294	0,002297	0,003135	0,002097	0,00458	0,002602	0,001821	0,001431	0,001214	0,001173	0,000992	0,000994
0,016891	0,022189	0,015645	0,073907	0,010456	0,009038	0,005223	0,005527	0,004743	0,003804	0,005508	0,00364	0,001943	0,001511	0,001023	0,000827	0,00064	0,000599	0,000535	0,000639
0,018575	0,015113	0,016826	0,050697	0,014655	0,013797	0,009695	0,008269	0,008488	0,008836	0,012135	0,014579	0,012674	0,010298	0,008245	0,007142	0,006096	0,005348	0,004667	0,004004
0,013173	0,019181	0,01259	0,0592	0,008657	0,007821	0,003814	0,004822	0,004093	0,003876	0,006388	0,008267	0,005688	0,003438	0,002594	0,002235	0,001949	0,00196	0,001674	0,001495
0,012883	0,023249	0,012135	0,066467	0,008441	0,010186	0,00626	0,007308	0,007992	0,009632	0,014915	0,020516	0,007395	0,005816	0,002572	0,00078	0,000528	0,000336	0,000206	0,000166
0,011289	0,015462	0,007785	0,054755	0,008771	0,010253	0,004629	0,0026	0,00289	0,002227	0,004716	0,001763	0,001928	0,00179	0,001919	0,002055	0,002065	0,002593	0,00255	0,002997
0,01704	0,030604	0,017808	0,07256	0,009472	0,009841	0,005694	0,00683	0,005587	0,00579	0,008884	0,005583	-1,7E-05	3,67E-05	0,000675	0,000467	0,000623	0,000968	0,001101	0,001789
0,015686	0,020925	0,016671	0,078271	0,008713	0,010757	0,005648	0,007304	0,005858	0,005213	0,005955	0,006465	-9,7E-05	4,26E-05	0,000258	0,000433	0,001187	0,001547	0,001159	0,001889
0,016431	0,022869	0,016854	0,067429	0,009418	0,011729	0,007487	0,002922	0,006515	0,007153	0,010445	0,013555	0,011786	0,005789	0,001305	0,000752	0,000504	0,000369	0,000201	0,000216
0,015673	0,021207	0,017203	0,070647	0,009804	0,010461	0,00507	0,005319	0,00405	0,003533	0,006464	0,003376	0,001694	0,001334	0,000856	0,000664	0,000526	0,000503	0,000442	0,000443
0,014828	0,038667	0,017383	0,06689	0,01004	0,008186	0,005186	0,004284	0,003711	0,00228	0,002502	0,001923	0,00641	0,004513	0,003382	0,00282	0,002372	0,00231	0,00195	0,001857
0,019696	0,021816	0,018071	0,064842	0,013797	0,01017	0,008186	0,007653	0,009388	0,009191	0,009263	0,010124	0,001907	0,000175	-0,00048	-0,00073	-0,00088	-0,00102	-0,00093	-0,00104
0,011246	0,019808	0,013178	0,075238	0,006765	0,003494	0,00087	-0,00189	0,002395	0,000104	0,000945	-0,00131	0,008626	0,005201	0,003279	0,002409	0,002055	0,001765	0,001655	0,001945
0,014873	0,024658	0,029264	0,084128	0,010241	0,007402	0,003393	0,003553	0,002987	0,000821	0,004748	0,000633	-2,1E-05	-7,5E-05	0,000154	0,000302	0,000114	0,000462	0,000218	0,000919
0,015267	0,025504	0,016984	0,066548	0,007968	0,009755	0,00491	0,004164	0,003178	0,002469	0,005833	0,00547	0,000766	0,000861	0,001228	0,001379	0,00147	0,002096	0,001571	0,002479
0,016911	0,055928	0,015537	0,055588	0,008836	0,009688	0,005163	0,004406	0,004931	0,00362	0,007005	0,003456	9,37E-05	0,000103	0,000361	0,000398	0,000639	0,001083	0,000929	0,001764
0,025922	0,033006	0,013644	0,044056	0,008771	0,012333	0,005559	0,005217	0,004251	0,00584	0,007966	0,004069	0,002187	0,001272	0,000597	0,000254	6,93E-05	3E-06	-4,3E-05	5,06E-06
0,013069	0,014958	0,010445	0,033264	0,012077	0,008423	0,005718	0,006135	0,005897	0,005509	0,007108	0,006207	0,005408	0,003956	0,002311	0,000542	-3E-05	-5,4E-05	-5,2E-05	-9,7E-05
0,018889	0,021148	0,013817	0,060317	0,010213	0,011363	0,005664	0,005342	0,005021	0,004095	0,005163	0,004738	0,001442	0,000922	0,000594	0,00039	0,00025	0,000319	0,000235	0,000218
0,011049	0,013202	0,012773	0,039603	0,012009	0,011641	0,007188	0,007593	0,007403	0,006525	0,007111	0,006636	0,002691	0,001059	0,000564	0,000299	0,000117	7,29E-05	-5,5E-06	3,62E-06
0,014926	0,021651	0,015032	0,051755	0,010522	0,011881	0,006784	0,009429	0,012012	0,009139	0,010372	0,009622	0,029636	0,010356	0,0028	0,001419	-0,00011	0,000461	0,000757	0,000659
0,0144	0,009914	0,011118	0,052505	0,006865	0,007065	0,005961	0,00831	0,010193	0,013833	0,019785	0,029652	0,014747	0,012602	0,010365	0,008116	0,006478	0,002943	0,001503	0,001257
0,017291	0,027074	0,015658	0,056663	0,011965	0,012164	0,00854	0,009572	0,009089	0,009715	0,013437	0,011768	0,004052	0,002463	0,001288	0,000743	0,000465	0,000322	0,000166	0,000107
0,019353	0,021361	0,014433	0,047474	0,009497	0,011035	0,006155	0,006911	0,00559	0,005196	0,008578	0,005651	0,004429	0,003509	0,002632	0,00224	0,001891	0,001684	0,001569	0,001593
0,015178	0,024509	0,015826	0,070338	0,00944	0,010235	0,006511	0,007491	0,01105	0,006462	0,009686	0,008336	0,014668	0,011088	0,007708	0,004381	0,001279	0,000386	0,000278	0,00022
0,017916	0,035197	0,017061	0,059605	0,010694	0,010612	0,007502	0,008701	0,008453	0,008288	0,011484	0,009952	0,002194	0,001363	0,000508	8,55E-05	-0,00011	-0,00024	-0,00028	-0,00032

6,45	6,5	6,55	6,6	6,65	6,7	6,75	6,8	6,85	6,9	6,95	7	7,05	7,1	7,15	7,2	7,25	7,3	7,35	7,4
0,001068	0,001008	0,00102	0,000931	0,001189	0,001284	0,001548	0,003692	0,003098	0,003509	0,002884	0,004014	0,002376	0,001685	0,002071	0,004094	0,006477	0,007589	0,008324	0,017538
2,01E-05	5,22E-05	4,5E-05	8,82E-05	0,000396	0,000683	0,000731	0,001591	0,001113	0,001717	0,001149	0,001306	0,001475	0,001021	0,001562	0,002997	0,005992	0,006756	0,004925	0,009259
-0,00043	-0,00041	-0,00029	-0,0002	6,94E-05	0,000122	0,000336	0,000805	0,000838	0,001668	0,001353	0,001615	0,001141	0,000966	0,001311	0,003477	0,003974	0,00417	0,003944	0,007108
-7E-05	8,44E-06	2,5E-05	7,63E-05	0,000348	0,000468	0,000458	0,001454	0,001864	0,002099	0,001664	0,001852	0,001784	0,00112	0,001555	0,003262	0,004471	0,004588	0,005679	0,009101
0,000823	0,000818	0,000823	0,000761	0,001005	0,001368	0,001076	0,002636	0,002616	0,00265	0,001862	0,001961	0,002338	0,00189	0,002156	0,003566	0,006125	0,006779	0,007581	0,012128
0,000615	0,000692	0,000638	0,000586	0,000887	0,001013	0,00076	0,001254	0,001559	0,002763	0,002503	0,002107	0,001427	0,001242	0,001468	0,003277	0,002989	0,005502	0,004078	0,005413
0,003104	0,000819	-0,00083	-0,00103	-0,00067	-0,00052	-0,00024	0,000901	0,000391	0,000638	0,000702	0,000388	0,000513	0,000256	0,000756	0,001879	0,003795	0,004659	0,005215	0,010751
0,001393	0,001293	0,001249	0,001177	0,001343	0,001563	0,001568	0,002375	0,001869	0,002639	0,001971	0,001724	0,001793	0,001602	0,001336	0,003966	0,004421	0,006274	0,006612	0,010042
0,000115	7,08E-05	6,72E-05	4,46E-05	0,000144	0,000324	0,000752	0,001515	0,000855	0,00162	0,000964	0,001037	0,001389	0,00069	0,000359	0,003175	0,005859	0,006433	0,004126	0,011264
0,002709	0,002977	0,00379	0,00273	0,001889	0,005711	0,007547	0,00762	0,006389	0,019099	0,01363	0,010053	0,008221	0,008605	0,004175	0,002921	0,002007	0,001261	0,008115	0,012452
0,001209	0,001145	0,001133	0,000793	0,001151	0,003423	0,003724	0,003677	0,004209	0,006468	0,004468	0,001648	0,00667	0,008968	0,005872	0,003	0,000948	0,000837	0,013498	0,001337
0,001338	0,001311	0,001782	0,001089	0,001277	0,004884	0,00714	0,007227	0,006692	0,010875	0,008708	0,001913	0,004373	0,004269	0,003174	0,002461	0,000862	0,000584	0,00689	0,000837
0,000346	0,000433	0,0004	0,000448	0,000686	0,000655	0,000396	0,001039	0,001061	0,00189	0,001673	0,001322	0,001197	0,001043	0,001279	0,002444	0,00512	0,003088	0,005029	0,006327
0,000445	0,000541	0,000457	0,000409	0,00093	0,000858	0,000674	0,001691	0,001887	0,002329	0,001848	0,001511	0,001526	0,000963	0,001163	0,004122	0,003674	0,006228	0,005477	0,010503
0,001622	0,001555	0,001446	0,001362	0,001601	0,001525	0,001225	0,001586	0,001623	0,002573	0,002154	0,001769	0,00167	0,001246	0,001834	0,002919	0,00488	0,007388	0,003262	0,005041
-0,00089	-0,0007	-0,00077	-0,00065	-0,00041	-0,00025	-0,00033	0,000158	0,000337	0,001087	0,000897	0,000825	0,00074	0,000512	0,001108	0,001441	0,002586	0,003413	0,002291	0,00454
0,001739	0,001443	0,001332	0,001177	0,001288	0,001878	0,001436	0,002194	0,001872	0,002297	0,001986	0,001575	0,00153	0,001121	0,001972	0,002599	0,006078	0,005327	0,004882	0,007905
0,000372	0,000441	0,001024	0,001093	0,000286	0,003025	0,008749	0,003588	0,002717	0,005888	0,00404	0,001017	0,002613	0,005188	0,002551	0,002085	7,59E-05	-8,9E-05	0,006761	0,001528
0,001834	0,002005	0,00214	0,002143	0,003139	0,004827	0,009184	0,01196	0,005838	0,01219	0,009972	0,003011	0,00456	0,007658	0,005057	0,00277	0,001401	0,001068	0,009482	0,001935
0,001204	0,002074	0,001791	0,000981	0,001645	0,003145	0,006649	0,007023	0,004063	0,009448	0,006917	0,001639	0,010186	0,02735	0,013814	0,004733	0,000756	0,000941	0,032225	0,005876
5,41E-05	0,000195	0,000174	0,000234	0,001419	0,000884	0,00091	0,002743	0,00196	0,002243	0,001801	0,00183	0,001698	0,001408	0,001337	0,005162	0,003751	0,005531	0,007399	0,012563
-7,4E-05	-1,5E-07	7,2E-05	7,95E-05	0,000271	0,000343	0,000369	0,000847	0,001001	0,001333	0,001276	0,001233	0,001299	0,001879	0,001318	0,002376	0,002552	0,002451	0,003463	0,006235
0,00017	0,000211	0,000344	0,000367	0,000743	0,000542	0,000569	0,00189	0,001872	0,002401	0,001908	0,004461	0,001814	0,001838	0,001659	0,005858	0,004303	0,004688	0,007388	0,012271
4,31E-06	2,54E-05	4,77E-05	0,000121	0,000322	0,000422	0,000577	0,001825	0,002286	0,002273	0,001744	0,001481	0,001366	0,001261	0,001966	0,003383	0,004174	0,005356	0,005815	0,010029
0,000655	0,000675	-0,00086	-3,2E-05	-0,00064	-0,00011	-0,00082	0,001218	0,000497	0,000625	0,000454	0,000866	0,00116	0,00078	0,001136	0,000651	0,007672	0,005419	0,003733	0,007735
0,001119	0,000666	0,000956	0,000848	0,000961	0,001302	0,000925	0,0012	0,001056	0,002549	0,001896	0,001165	0,000784	0,000594	0,000675	0,002687	0,005422	0,001988	0,00291	0,004077
7,38E-05	9,23E-05	-9,2E-06	7,66E-05	0,00015	0,000424	0,000351	0,000679	0,000661	0,0015	0,001236	0,001091	0,000874	0,001186	0,000595	0,003289	0,003898	0,00387	0,00335	0,005384
0,001486	0,001342	0,001324	0,001333	0,001673	0,001829	0,001707	0,002705	0,002704	0,00335	0,003938	0,005313	0,002823	0,002173	0,006841	0,00855	0,006689	0,007139	0,011474	0,016843
0,000156	0,000208	8,45E-05	2,38E-06	0,000277	0,000711	0,000469	0,001507	0,000989	0,001634	0,001395	0,001204	0,001151	0,000589	0,000623	0,003314	0,008939	0,009269	0,006482	0,008169
-0,00038	-0,00019	-0,00032	-0,00034	-0,00025	6,31E-06	-0,00023	0,000308	0,000219	0,001149	0,000867	0,000674	0,000915	0,000267	0,000764	0,002063	0,004364	0,003647	0,003363	0,004874

7,45	7,5	7,55	7,6	7,65	7,7	7,75	7,8	7,85	7,9	7,95	8	8,05	8,1	8,15	8,2	8,25	8,3	8,35	8,4
0,0134	0,004867	0,008301	0,011445	0,006958	0,003743	0,00176	0,002166	0,015999	0,001682	0,000786	0,001529	0,006642	0,002207	0,001137	0,000723	0,0015	0,000725	0,000629	0,000688
0,006913	0,00213	0,003345	0,006463	0,003611	0,002648	0,00073	0,000858	0,007406	0,001636	0,000957	0,003631	0,002077	0,001143	0,000721	0,000833	0,002482	0,000638	0,000857	0,001206
0,00514	0,001395	0,004744	0,013319	0,006446	0,00291	0,000623	0,000833	0,014436	0,003224	0,000773	0,002327	0,000926	0,000877	0,00068	0,001277	0,000413	0,000114	0,000462	0,000147
0,00647	0,002435	0,005189	0,008757	0,005149	0,002138	0,000517	0,001047	0,011861	0,001933	0,000423	0,000753	0,002582	0,00215	0,000563	0,000424	0,000476	0,001153	0,000426	0,000275
0,010217	0,003835	0,007947	0,013994	0,008389	0,003439	0,000904	0,001051	0,020671	0,002067	0,001058	0,001728	0,004856	0,002641	0,001078	0,000997	0,000991	0,001509	0,000906	0,000495
0,002916	0,001481	0,00311	0,004687	0,003053	0,002636	0,001378	0,001216	0,005101	0,001298	0,000736	0,001815	0,00203	0,002433	0,001474	0,001544	0,00144	0,000794	0,001241	0,002022
0,008509	0,007756	0,005385	0,003095	0,000443	0,001089	0,000437	0,000174	0,001172	0,007668	0,000963	0,002465	0,003154	0,000982	0,000408	0,000544	0,001091	0,000249	0,000434	0,000716
0,010675	0,004258	0,004321	0,008717	0,008115	0,003833	0,001325	0,0014	0,009084	0,002757	0,001477	0,003586	0,002073	0,001789	0,00185	0,001124	0,001114	0,000957	0,002292	0,000682
0,007857	0,002387	0,003598	0,007447	0,003429	0,002631	0,000851	0,00043	0,007532	0,002966	0,000752	0,003669	0,001253	0,001437	0,001038	0,000202	0,000589	0,000703	0,000658	9,7E-05
0,00377	0,005	0,002194	0,002522	0,00165	0,001795	0,000812	0,000641	0,001141	0,000708	0,00072	0,003207	0,00099	0,000499	0,000125	0,000163	0,000143	0,000757	0,001522	0,000642
0,000842	0,002269	0,00161	0,002481	0,000634	0,000457	0,000696	0,000946	0,000598	0,000353	0,000579	0,001569	0,003489	0,000509	6,43E-05	3,69E-05	-1,6E-05	0,000726	0,001765	0,000363
0,001542	0,003886	0,001299	0,001355	0,000761	0,001107	0,001076	0,002584	0,000652	0,000336	0,000327	0,001239	0,001902	0,00023	-4,9E-05	3,19E-05	-2,3E-05	-5,3E-05	9,09E-05	5,94E-06
0,004068	0,001926	0,002659	0,00475	0,002395	0,002222	0,000675	0,000671	0,006851	0,002595	0,001223	0,001238	0,002569	0,002439	0,001056	0,00048	0,000933	0,002164	0,000773	0,000558
0,0061	0,002519	0,003481	0,004666	0,003334	0,002615	0,001017	0,00099	0,005966	0,000975	0,000704	0,001629	0,003346	0,003399	0,001517	0,001656	0,00121	0,000878	0,000987	0,002005
0,004473	0,002429	0,010202	0,016382	0,012035	0,00469	0,001472	0,001057	0,023164	0,002398	0,000996	0,002051	0,002746	0,001804	0,001287	0,001178	0,002161	0,00079	0,001165	0,00287
0,00436	0,001485	0,00227	0,004271	0,004807	0,002003	0,000386	0,000489	0,004852	0,001104	0,00044	0,001075	0,002035	0,001349	0,000665	0,000467	0,001381	0,000507	0,000592	0,000741
0,005769	0,002472	0,004424	0,006382	0,004147	0,003528	0,001212	0,000922	0,008828	0,001667	0,000927	0,002519	0,00329	0,001583	0,001094	0,00307	0,00202	0,000734	0,000832	0,00227
0,00088	0,001784	0,000379	0,001248	0,000702	-0,00018	-0,00026	0,005517	0,000546	-5,8E-05	0,000676	0,00049	0,000866	-0,0004	-0,00062	-0,00063	-0,00068	-0,0006	0,0015	2,76E-05
0,001406	0,00449	0,002183	0,001653	0,000833	0,001139	0,001564	0,000662	0,000777	0,005283	0,000909	0,00213	0,002387	0,000448	0,000206	0,000157	9,44E-05	9,41E-05	0,0013	0,00044
0,0008	0,003098	0,001043	0,001548	0,000562	0,001495	0,000276	0,000154	0,000238	0,001962	0,000471	0,002334	0,006087	0,000687	-4,6E-05	-0,00015	-0,0002	3,64E-05	0,001511	0,000251
0,009536	0,004205	0,01113	0,009572	0,007908	0,003756	0,001096	0,001019	0,021434	0,002089	0,001148	0,002034	0,0058	0,003083	0,001095	0,000703	0,000738	0,00043	0,001386	0,000388
0,014728	0,004234	0,004409	0,00768	0,017427	0,00255	0,000724	0,000682	0,002574	0,001057	0,000737	0,001162	0,002112	0,001853	0,001459	0,001018	0,001216	0,001353	0,001714	0,000879
0,009276	0,003218	0,004146	0,003705	0,002914	0,002516	0,001997	0,00242	0,006865	0,001187	0,001312	0,001579	0,004827	0,001829	0,002559	0,000622	0,000608	0,001151	0,000741	0,001101
0,013235	0,004874	0,003472	0,003797	0,009938	0,002885	0,00087	0,000943	0,002033	0,002858	0,000741	0,001757	0,003793	0,001714	0,001229	0,001553	0,001058	0,001005	0,002706	0,001454
0,005607	0,001653	0,002176	0,004461	0,002471	0,001195	-0,00015	-0,00059	0,004091	-6,7E-05	-0,00047	0,000846	0,002699	0,000633	-0,00024	-0,00056	0,001219	-0,00021	-0,00034	1,42E-05
0,002912	0,001048	0,001113	0,001004	0,000291	0,001065	0,000408	0,000368	0,00055	0,000883	0,00071	0,0019	0,000736	0,001159	6,12E-05	4,19E-05	0,000304	0,003315	0,000593	3,98E-06
0,003792	0,001085	0,004107	0,007177	0,004245	0,002087	0,000555	0,00065	0,01412	0,002603	0,001658	0,002357	0,00112	0,001774	0,000503	0,000446	0,000826	0,00049	0,000634	0,000145
0,009483	0,005592	0,00354	0,004901	0,00299	0,002494	0,001457	0,002685	0,005258	0,00147	0,00114	0,002072	0,003732	0,00268	0,001182	0,000795	0,001157	0,00141	0,001021	0,001195
0,005585	0,002538	0,004224	0,008133	0,00412	0,00252	0,000907	0,000522	0,009336	0,001954	0,000472	0,002234	0,002697	0,001604	0,001221	0,000532	0,000625	0,001312	0,001317	0,000252
0,00283	0,001888	0,005599	0,012768	0,006599	0,002849	0,000823	0,000584	0,016174	0,002042	0,000499	0,001982	0,001718	0,001469	0,000447	0,000635	0,001534	0,000303	0,000256	0,000631

8,45	8,5	8,55	8,6	8,65	8,7	8,75	8,8	8,85	8,9	8,95	9
0,001105	0,00114	0,001143	0,004212	0,000664	0,000185	-4E-05	9,07E-05	0,00102	0,000338	5,17E-05	7,92E-05
0,001486	0,000979	0,002003	0,000465	5,42E-05	8,31E-05	1,62E-05	7,44E-05	0,00039	0,00018	8,61E-05	0,000123
0,000175	0,001067	0,002802	0,000564	-3,7E-05	-0,00012	-0,00016	1,79E-05	0,000722	3,22E-05	-4,4E-05	-0,00013
0,000808	0,001134	0,000775	0,003315	0,000308	-4E-05	-9,3E-05	-4,8E-05	0,000221	7,39E-06	-4,2E-05	-4E-05
0,001603	0,000981	0,001194	0,005263	0,000959	0,000213	0,000136	0,000172	0,00067	0,000405	0,000157	0,000154
0,000653	0,001209	0,002891	0,002349	0,000549	0,000307	0,000147	0,000282	0,000769	0,000506	0,000128	0,000131
0,000124	0,000416	0,000269	5,29E-05	-0,00013	-0,00013	-7,7E-05	2,24E-06	0,000206	3,31E-05	-0,0001	1,82E-05
0,000447	0,002867	0,002738	0,001387	0,000322	0,000242	0,000169	0,000152	0,000621	0,000346	0,000111	0,000166
1,67E-05	0,001093	0,001886	0,000594	-0,00032	-0,00033	-0,00039	-0,00014	0,000672	4,51E-06	-0,00029	-0,0003
0,000145	0,000254	0,000109	4,15E-05	0,0009	5,8E-05	-1,3E-05	-9,4E-05	2,03E-05	4,07E-05	-7,5E-05	-4,4E-05
-7,3E-05	-2,6E-05	-2,7E-05	-5,5E-05	0,000898	-8,7E-05	-6,4E-05	-4,6E-05	-9E-05	-9,2E-05	-3,2E-05	-6,5E-05
3,51E-05	1E-04	-2,7E-05	-6,8E-05	-3,1E-05	-7E-05	-5,3E-05	-1,1E-05	-0,00012	-7,1E-05	2,07E-06	-6,9E-05
0,00167	0,001373	0,00079	0,001304	0,000267	8,1E-05	-3,3E-05	0,00012	0,000957	0,00057	-0,00023	-0,00022
0,000496	0,001065	0,00433	0,002419	0,000434	0,000173	9,58E-05	0,000395	0,001387	0,000682	5,72E-05	6,67E-05
0,002146	0,002084	0,001641	0,006133	0,001159	0,000449	0,000246	0,000227	0,000514	0,000257	0,000142	0,000129
0,000892	0,000848	0,000509	0,001198	6,78E-05	-1,9E-05	-7,4E-05	1,36E-05	0,000552	0,000381	-7,2E-05	-5,7E-05
0,000577	0,000945	0,000908	0,002122	0,000379	0,000164	0,000108	3,4E-05	0,000293	0,000213	6,96E-05	0,000194
-0,00065	-0,00061	-0,00062	-0,00068	0,000719	-0,00058	-0,00064	-0,00059	-0,00061	-0,00057	-0,00059	-0,0006
0,000108	7,53E-05	3,03E-05	1,34E-06	0,000785	1,95E-05	-2,5E-05	5,17E-05	1,53E-05	8,42E-05	-1,3E-05	-1,1E-05
-0,00019	-0,0002	-0,00019	-0,00025	0,000813	-0,00027	-0,00031	-0,0002	-0,00026	-0,00017	-0,00021	-0,00026
0,000313	0,001436	0,00314	0,005322	0,000329	-1,4E-05	-4E-05	0,001873	0,001523	0,000274	-0,00019	-0,00013
0,001019	0,011828	0,000652	0,000836	0,000432	0,000292	0,000232	0,000421	0,00054	0,000308	0,00015	0,000159
0,000591	0,000558	0,000751	0,001165	0,000126	4,99E-05	-2,3E-05	0,000377	0,00049	0,000126	-3,8E-05	2,38E-05
0,00095	0,001177	0,000619	0,000705	0,000261	0,000178	0,000116	0,000113	0,000275	0,000199	5,67E-05	4,13E-05
-0,00017	-0,00025	0,000119	0,000633	-0,00061	-0,00062	-0,00096	-0,00083	-0,00067	-0,0006	-0,00093	-0,00075
0,000112	0,000424	-5,3E-05	-0,00027	-0,00025	-0,00048	-0,00047	-0,00039	-0,00027	-0,00032	-0,00048	-0,00038
-1,7E-05	0,000795	0,001418	2,2E-05	-0,00022	-0,00025	-0,00019	-0,00012	0,001137	0,000188	-0,00019	-0,0002
0,000997	0,001252	0,001476	0,001425	0,000276	0,000255	0,000169	0,000715	0,001185	0,00058	0,000305	0,00019
0,000141	0,002718	0,001602	0,00287	0,000111	3,15E-05	-6,3E-05	-1,9E-05	0,001163	0,000625	2,82E-05	8,7E-05
6,92E-05	0,000611	0,001732	0,003225	2,36E-05	-0,00016	-0,00011	-5E-05	0,001042	0,000295	-0,00023	-9,8E-05

APÊNDICE IV

Planilha com os dados espectrais de RMN de ^1H a partir de amostras de azeite extra virgem, usando o pré-processamento Normalização pela soma, utilizadas no presente trabalho

Amostra	Classe	0,04	0,08	0,12	0,16	0,2	0,24	0,28	0,32	0,36	0,4	0,44	0,48	0,52	0,56	0,6	0,64	0,68	0,72
C1	C	1,76E-05	2,31E-05	5,44E-05	4,46E-05	4,25E-05	9,28E-05	4,47E-05	-1,1E-05	-3,3E-06	1,11E-05	3,43E-05	5,88E-05	0,000135	0,000145	-3,5E-05	-8,9E-05	4,13E-05	0,000275
C2	C	2,86E-05	3,41E-05	5,95E-05	5,85E-05	5,37E-05	9,4E-05	6,72E-05	1,8E-05	3,16E-05	4,82E-05	7,18E-05	0,000102	0,00016	0,000169	2,32E-05	-3,2E-05	9,01E-05	0,000317
C3	C	0,000204	0,00022	0,000238	0,00025	0,000261	0,000286	0,000275	0,000264	0,000282	0,000304	0,00034	0,000381	0,000435	0,00046	0,000399	0,000395	0,000521	0,000761
C4	C	2,16E-05	3,39E-05	4,49E-05	4,71E-05	3,9E-05	7,23E-05	4,37E-05	-8,3E-06	-1,9E-06	1,17E-05	3,09E-05	5,98E-05	0,000123	0,000137	-4,2E-06	-7,6E-05	3,7E-05	0,000272
C5	C	1,65E-05	2,47E-05	3,49E-05	3,87E-05	3,94E-05	4,99E-05	3,05E-05	3,47E-07	1,14E-06	1,1E-05	3,35E-05	6,11E-05	9,15E-05	8,6E-05	1,39E-05	-9,1E-06	0,000113	0,000321
C6	C	1,87E-05	2,55E-05	4,8E-05	4,64E-05	3,68E-05	8,1E-05	4,38E-05	-1,2E-05	-2,2E-06	1,06E-05	2,72E-05	5,24E-05	0,000123	0,000134	-2,8E-05	-9,2E-05	2,65E-05	0,000254
C7	C	2,17E-05	3,21E-05	5,47E-05	5,27E-05	4,05E-05	9,53E-05	5,58E-05	-4,3E-06	6,01E-06	2,25E-05	4,3E-05	6,97E-05	0,000149	0,00017	-3,7E-06	-6,5E-05	7,54E-05	0,000324
C8	C	1,49E-05	2,19E-05	5,06E-05	4,72E-05	3,85E-05	8,76E-05	4,69E-05	-8,7E-06	3,97E-07	2,12E-05	4,29E-05	7,45E-05	0,000148	0,000154	-2E-05	-6,8E-05	7,25E-05	0,000333
C9	C	2,26E-05	2,18E-05	5,92E-05	4,51E-05	2,74E-05	0,000102	5,34E-05	-1E-05	-4,5E-06	1,07E-05	3,17E-05	4,89E-05	0,000143	0,000172	-4,2E-05	-0,0001	3,8E-05	0,000301
C10	C	0,000166	0,000226	0,000215	0,000215	0,000212	0,000278	0,000244	0,000197	0,000221	0,00025	0,000286	0,000327	0,000422	0,000451	0,000283	0,000247	0,000414	0,000697
C11	C	1,55E-05	2,54E-05	3,93E-05	4,37E-05	4,54E-05	5,32E-05	3,51E-05	4,4E-06	5,14E-06	1,42E-05	3,75E-05	6,82E-05	9,72E-05	9,15E-05	1,7E-05	-6,6E-06	0,000108	0,000303
C12	C	2,39E-05	3,49E-05	5,07E-05	5,74E-05	4,12E-05	8,73E-05	5,55E-05	1,84E-06	1E-05	2,36E-05	4,83E-05	7,38E-05	0,000144	0,000168	9,65E-06	-5,8E-05	5,98E-05	0,000294
C13	C	1,88E-05	2,47E-05	4,7E-05	4,8E-05	3,44E-05	8,66E-05	4,67E-05	-1,1E-05	1,01E-06	1,17E-05	2,58E-05	5,2E-05	0,00013	0,000151	-2,5E-05	-9,2E-05	2,99E-05	0,000266
C14	C	1,94E-05	2,6E-05	4,84E-05	4,7E-05	3,25E-05	8,44E-05	4,98E-05	-9,6E-06	3,58E-07	1,2E-05	2,9E-05	5,63E-05	0,00013	0,000148	-1,9E-05	-8,8E-05	2,82E-05	0,000261
C15	C	2,16E-05	2,61E-05	5,52E-05	5,32E-05	3,86E-05	9,29E-05	5,32E-05	-3,5E-06	1,22E-05	1,62E-05	3,66E-05	6,23E-05	0,000143	0,000171	-1,2E-05	-8,3E-05	4,53E-05	0,000286
C16	C	1,48E-05	1,82E-05	5,64E-05	3,83E-05	2,85E-05	0,000101	4,34E-05	-2,1E-05	-1E-05	9,52E-06	3,38E-05	5,75E-05	0,00015	0,000171	-5E-05	-0,0001	4,93E-05	0,000317
C17	C	9,38E-05	3,16E-05	6,41E-05	6,12E-05	4,02E-05	0,000117	6,14E-05	-7,2E-06	1,4E-05	3,28E-05	5,34E-05	6,75E-05	0,00016	0,000198	-1,8E-05	-7,9E-05	6,8E-05	0,000331
C18	C	7,81E-05	2,61E-05	5,62E-05	5,41E-05	2,74E-05	0,000108	6,39E-05	-5,6E-06	4,32E-06	2,31E-05	4,45E-05	6,92E-05	0,00016	0,000186	-2,3E-05	-7,4E-05	8,35E-05	0,000341
C19	C	0,000115	2,97E-05	5,99E-05	6,28E-05	3,89E-05	0,000107	6,6E-05	6,75E-07	9,38E-06	2,57E-05	4,88E-05	6,74E-05	0,000151	0,000172	-2E-05	-8,2E-05	5,22E-05	0,000299
C20	C	0,00021	2,46E-05	4,96E-05	5,57E-05	3,07E-05	8,79E-05	5,53E-05	-8,2E-06	-1,2E-06	2,18E-05	4,45E-05	7,16E-05	0,00014	0,000159	2,04E-06	-5,3E-05	5,78E-05	0,000294
C21	C	0,000352	3,16E-05	4,99E-05	6,12E-05	4,26E-05	9,46E-05	6,57E-05	8,85E-06	1,55E-05	3,31E-05	5,18E-05	7,47E-05	0,000146	0,000166	1,23E-05	-4,5E-05	5,29E-05	0,000292
C22	C	7,84E-05	3,11E-05	6,71E-05	5,75E-05	3,74E-05	0,000118	6,02E-05	-6,6E-06	8,5E-06	2,73E-05	4,8E-05	6,55E-05	0,000156	0,000179	-3,6E-05	-8,7E-05	5,53E-05	0,000312
C23	C	0,000135	3,95E-05	7,21E-05	7,72E-05	5,72E-05	0,00012	7,88E-05	1,39E-05	3,2E-05	4,37E-05	6,35E-05	9,59E-05	0,000174	0,000208	2,64E-05	-4,3E-05	9,7E-05	0,000341
C24	C	2,03E-05	2,55E-05	4,71E-05	4,45E-05	3,45E-05	8,44E-05	4,57E-05	-1E-05	-1,2E-06	1,5E-05	3,12E-05	5,87E-05	0,00013	0,000137	-3E-05	-9E-05	2,79E-05	0,000269
O1	O	2,28E-05	2,96E-05	4,74E-05	5,33E-05	4,24E-05	7,79E-05	5,43E-05	3,11E-06	7,87E-06	2,23E-05	4,44E-05	7,38E-05	0,000131	0,000145	1,6E-05	-4,7E-05	3,97E-05	0,000245
O2	O	1,79E-05	2,26E-05	4,69E-05	3,65E-05	3,6E-05	7,47E-05	3,85E-05	-9E-06	5,43E-06	1,94E-05	4,01E-05	6,79E-05	0,000125	0,000125	-1,8E-05	-6,2E-05	8,38E-05	0,00031
O3	O	2,37E-05	2,96E-05	5,17E-05	5,18E-05	3,13E-05	6,75E-05	4E-05	5,98E-07	1,37E-05	2,21E-05	3,67E-05	5,51E-05	0,000114	0,00015	-1E-05	-8,3E-05	1,96E-05	0,000282
O4	O	2,85E-05	3,77E-05	5,31E-05	5,53E-05	5,81E-05	7,76E-05	5,34E-05	1,75E-05	1,75E-05	3,44E-05	5,68E-05	8,77E-05	0,000131	0,000123	2,21E-05	-8,6E-06	0,000115	0,000322
O5	O	1,31E-05	1,15E-05	3,47E-05	4,22E-05	2,86E-05	6,57E-05	4E-05	-7,1E-06	6,41E-06	1,74E-05	3,09E-05	6,87E-05	0,000125	0,000155	-3,5E-06	-7E-05	4,4E-05	0,000279
O6	O	0,000185	0,000203	0,000235	0,000252	0,000257	0,000305	0,000303	0,000285	0,000319	0,000369	0,000424	0,000468	0,000534	0,000576	0,000484	0,000468	0,000608	0,000883
O7	O	1,76E-05	2,66E-05	4,46E-05	4,71E-05	3,99E-05	7,14E-05	5,12E-05	7,08E-06	1,87E-05	2,98E-05	5,45E-05	8,14E-05	0,000131	0,00014	1,01E-05	-5,4E-05	4,16E-05	0,000244
O8	O	2,14E-05	2,54E-05	5,63E-05	5,11E-05	3,54E-05	0,0001	5,68E-05	-1,1E-05	-1,6E-06	1,09E-05	3,38E-05	5,91E-05	0,000138	0,000165	-2,8E-05	-1E-04	3,56E-05	0,000289
O9	O	1,86E-05	2,4E-05	5,21E-05	4,69E-05	3,02E-05	9,28E-05	5,38E-05	-1,1E-05	-4,4E-06	9,72E-06	3,08E-05	5,98E-05	0,000137	0,000156	-3,2E-05	-0,0001	3,25E-05	0,000268
O10	O	1,3E-05	2,6E-05	3,85E-05	4E-05	3,39E-05	5,2E-05	4,14E-05	6,55E-06	2,43E-05	3,04E-05	5,35E-05	7,9E-05	0,000115	0,000124	2,63E-05	-3,7E-05	5,36E-05	0,000235
O11	O	2,72E-05	2,82E-05	5,37E-05	5E-05	3,57E-05	8,98E-05	5,18E-05	-8,3E-06	2,95E-06	2,14E-05	4,64E-05	5,85E-05	0,000128	0,00014	-1,4E-05	-6,6E-05	6,02E-05	0,000306
O12	O	1,46E-05	2,56E-05	4,62E-05	4,57E-05	4,38E-05	7,76E-05	4,74E-05	7,5E-07	8,03E-06	2,43E-05	4,51E-05	7,89E-05	0,000139	0,000139	6,23E-06	-3,8E-05	8,73E-05	0,000306
O13	O	3,39E-05	4,14E-05	6,2E-05	6,63E-05	5,89E-05	9,25E-05	7,63E-05	3,42E-05	4,38E-05	6,89E-05	0,000102	0,000127	0,000169	0,00017	4,85E-05	-1E-05	8,79E-05	0,000279
O14	O	1,53E-05	1,74E-05	5,1E-05	4,28E-05	2,18E-05	8,85E-05	4,12E-05	-2,5E-05	-1,3E-05	7,84E-06	3,09E-05	4,85E-05	0,000133	0,00017	-5E-05	-0,00011	2,83E-05	0,0003
O15	O	2,11E-05	2,49E-05	5,57E-05	4,88E-05	2,39E-05	8,93E-05	4,54E-05	-1,7E-05	-2,5E-06	1,36E-05	3,69E-05	5,53E-05	0,000135	0,000173	-4,8E-05	-0,00011	3,17E-05	0,000301
O16	O	2,07E-05	2,42E-05	5,61E-05	3,79E-05	3,45E-05	0,000102	4,72E-05	-1,6E-05	-5,5E-06	7,67E-06	3,08E-05	5,97E-05	0,000153	0,000167	-4,4E-05	-0,0001	2,82E-05	0,000303

0,76	0,8	0,84	0,88	0,92	0,96	1	1,04	1,08	1,12	1,16	1,2	1,24	1,28	1,32	1,36	1,4	1,44	1,48	1,52
0,00019	0,000245	0,001746	0,049965	0,024041	0,002205	0,001157	0,000924	0,00076	0,001547	0,001756	0,002756	0,020431	0,254385	0,218312	0,055851	0,010287	0,005414	0,003888	0,002684
0,000287	0,000259	0,001334	0,048995	0,029422	0,001251	0,000724	0,000642	0,000582	0,001464	0,001836	0,002137	0,014339	0,259631	0,233652	0,059217	0,006506	0,00236	0,001796	0,001034
0,000798	0,000898	0,002241	0,042745	0,02521	0,004029	0,002679	0,002304	0,002137	0,002899	0,003328	0,004382	0,020898	0,224418	0,201245	0,061283	0,01682	0,010037	0,007501	0,005705
0,000284	0,000176	0,001239	0,047072	0,030548	0,001447	0,000735	0,000538	0,000497	0,001488	0,001823	0,001858	0,013307	0,255017	0,236087	0,062535	0,007133	0,002571	0,001875	0,001113
0,000608	0,001171	0,008848	0,036102	0,026073	0,006528	0,002319	0,001079	0,00104	0,002204	0,004253	0,012195	0,045444	0,217172	0,197295	0,072762	0,020591	0,007446	0,003434	0,002314
0,000191	0,000179	0,0015	0,048884	0,026617	0,00195	0,000924	0,000742	0,000606	0,001398	0,001672	0,002258	0,016067	0,25493	0,228184	0,059016	0,008813	0,004178	0,003034	0,001988
0,000261	0,000259	0,001464	0,050656	0,027516	0,001288	0,0007	0,000619	0,000573	0,001479	0,001843	0,002332	0,015562	0,262542	0,232925	0,057454	0,006218	0,002492	0,00183	0,001038
0,000241	0,000265	0,001697	0,050257	0,026942	0,001612	0,000813	0,000685	0,00065	0,001594	0,001785	0,002429	0,017851	0,260068	0,228161	0,056986	0,007647	0,003214	0,002198	0,001328
0,000211	0,000285	0,001863	0,053376	0,023441	0,001315	0,000736	0,000649	0,000573	0,001488	0,001827	0,002819	0,020721	0,263559	0,226295	0,052472	0,006503	0,003104	0,002222	0,001332
0,000655	0,000749	0,00225	0,052409	0,025031	0,00181	0,001241	0,001224	0,001219	0,002225	0,002692	0,003628	0,019575	0,261252	0,228084	0,05341	0,006273	0,002808	0,002007	0,001177
0,000555	0,001014	0,007762	0,036088	0,028471	0,006266	0,002286	0,001037	0,000971	0,002026	0,003727	0,009784	0,040129	0,214534	0,200814	0,074454	0,020727	0,007398	0,003362	0,002179
0,000271	0,000229	0,001333	0,048798	0,028967	0,001399	0,000703	0,000636	0,000552	0,001395	0,00179	0,002095	0,013939	0,257394	0,23593	0,060683	0,006654	0,002627	0,001963	0,001111
0,000211	0,000175	0,001255	0,050214	0,027747	0,001226	0,000638	0,000574	0,000474	0,001328	0,00164	0,001902	0,014321	0,260853	0,235063	0,058211	0,006312	0,002619	0,001931	0,00109
0,000272	0,000199	0,001325	0,04885	0,02875	0,001316	0,000659	0,000539	0,000477	0,001359	0,001874	0,002131	0,014381	0,25799	0,234944	0,060188	0,006607	0,002471	0,001954	0,001159
0,000237	0,000213	0,001337	0,050183	0,027851	0,001303	0,000723	0,00065	0,00052	0,001376	0,001723	0,00205	0,014605	0,258843	0,234811	0,058566	0,006561	0,002666	0,001981	0,001129
0,000237	0,000266	0,001247	0,053826	0,02489	0,000764	0,000684	0,000568	0,000531	0,001486	0,001807	0,002097	0,017711	0,269442	0,231153	0,05107	0,0051	0,002337	0,001732	0,000897
0,000274	0,00026	0,001182	0,051866	0,026992	0,000788	0,000639	0,000645	0,000547	0,001486	0,001829	0,001968	0,015347	0,267544	0,234472	0,055835	0,005545	0,002351	0,001751	0,000899
0,000274	0,000252	0,001106	0,0524	0,027184	0,000728	0,000603	0,000596	0,000561	0,001477	0,001807	0,001873	0,01477	0,265709	0,235354	0,055817	0,005513	0,002158	0,001628	0,000808
0,000261	0,000205	0,000988	0,050207	0,028491	0,000756	0,000602	0,000544	0,000501	0,001394	0,001749	0,001789	0,013445	0,265454	0,235574	0,05753	0,005624	0,002236	0,001714	0,000882
0,000324	0,00025	0,000996	0,046973	0,032401	0,000828	0,000575	0,000557	0,000553	0,001419	0,001862	0,001902	0,01233	0,257107	0,239465	0,062019	0,006336	0,002175	0,001712	0,000915
0,000337	0,00024	0,000893	0,045739	0,033212	0,000828	0,000625	0,000544	0,000546	0,001429	0,001843	0,001829	0,011862	0,262954	0,238803	0,061132	0,005714	0,002129	0,001666	0,000855
0,000245	0,000217	0,001048	0,052247	0,026937	0,000864	0,000617	0,000578	0,000542	0,001436	0,001725	0,001753	0,014821	0,266446	0,232993	0,055982	0,00619	0,002546	0,001869	0,000974
0,000339	0,000305	0,001136	0,04787	0,030951	0,00109	0,001162	0,000696	0,000607	0,001464	0,001891	0,001971	0,012942	0,2506	0,235363	0,060945	0,007147	0,002238	0,001731	0,000951
0,000221	0,000189	0,001242	0,049906	0,02864	0,001249	0,000587	0,000539	0,000486	0,001331	0,001658	0,00193	0,014198	0,260078	0,234135	0,058761	0,006676	0,002556	0,001915	0,001089
0,000318	0,000218	0,001549	0,039123	0,036937	0,002023	0,000981	0,000761	0,000658	0,001406	0,001808	0,002168	0,014391	0,242124	0,233145	0,068297	0,010138	0,00388	0,002828	0,001783
0,000275	0,000243	0,001494	0,048993	0,029782	0,001457	0,000718	0,000679	0,000593	0,001496	0,00179	0,002249	0,015871	0,263459	0,22766	0,058408	0,007734	0,002711	0,001942	0,00114
0,000303	0,00025	0,00152	0,047821	0,029976	0,001418	0,000693	0,000568	0,000537	0,001372	0,001843	0,002302	0,015048	0,244955	0,239192	0,062791	0,007319	0,00275	0,00207	0,001223
0,00046	0,001103	0,008136	0,040456	0,023691	0,005426	0,00222	0,001071	0,000926	0,001864	0,003464	0,011997	0,042627	0,224946	0,198916	0,067291	0,018566	0,007422	0,003819	0,002666
0,000285	0,00021	0,001377	0,048252	0,030139	0,001293	0,000625	0,000591	0,000516	0,001351	0,001815	0,002112	0,013743	0,246547	0,243086	0,063293	0,006634	0,002282	0,001754	0,00097
0,000964	0,001105	0,002427	0,043025	0,027223	0,004154	0,002774	0,002442	0,002316	0,003142	0,003794	0,004875	0,019301	0,217551	0,215023	0,066253	0,01672	0,00938	0,006793	0,00495
0,000289	0,000178	0,001188	0,045154	0,03308	0,001466	0,000768	0,000611	0,000528	0,001316	0,001697	0,001845	0,01233	0,251194	0,236804	0,06471	0,008019	0,002686	0,002016	0,001192
0,000232	0,00016	0,000941	0,0505	0,028205	0,000955	0,00075	0,000578	0,000478	0,001426	0,001732	0,001609	0,012929	0,25559	0,234632	0,057353	0,006526	0,0025	0,001865	0,001051
0,000209	0,000162	0,000927	0,050346	0,028343	0,000981	0,000744	0,000569	0,000468	0,001302	0,001613	0,001602	0,013104	0,255078	0,234471	0,057604	0,006601	0,00262	0,001977	0,001103
0,000345	0,000254	0,001377	0,041936	0,035628	0,001621	0,000921	0,000707	0,000585	0,001308	0,00185	0,002173	0,012929	0,237087	0,235936	0,067535	0,009239	0,002815	0,002176	0,001354
0,000241	0,000294	0,001586	0,046718	0,030382	0,001598	0,000955	0,000885	0,000706	0,001425	0,001653	0,002431	0,016478	0,255839	0,232692	0,061218	0,007887	0,00359	0,002535	0,001488
0,000287	0,000272	0,001562	0,047286	0,028654	0,002082	0,001089	0,000829	0,00073	0,001552	0,001906	0,002547	0,015847	0,25718	0,226228	0,060601	0,009215	0,003902	0,002823	0,00183
0,000356	0,000212	0,001121	0,046276	0,032691	0,001311	0,000683	0,000624	0,00057	0,001375	0,001755	0,001686	0,011364	0,257039	0,238873	0,06406	0,006862	0,002264	0,001726	0,000937
0,000224	0,000248	0,001239	0,053124	0,025565	0,00078	0,000558	0,000555	0,000508	0,001429	0,0018	0,002093	0,017179	0,259548	0,236967	0,053708	0,005451	0,002485	0,001856	0,000981
0,000237	0,00021	0,001032	0,051815	0,027171	0,00077	0,000557	0,000549	0,000478	0,001405	0,001763	0,001817	0,014284	0,257462	0,239976	0,056625	0,005653	0,002415	0,001829	0,000958
0,000232	0,000234	0,001099	0,052811	0,026136	0,000756	0,000658	0,000543	0,000498	0,001438	0,001737	0,001948	0,016387	0,27187	0,230415	0,052388	0,005339	0,002359	0,001754	0,000924

1,56	1,6	1,64	1,68	1,72	1,76	1,8	1,84	1,88	1,92	1,96	2	2,04	2,08	2,12	2,16	2,2	2,24	2,28	2,32
0,003535	0,026303	0,029575	0,005724	0,003118	0,002774	0,001867	0,001235	0,000937	0,000678	0,002394	0,038344	0,045529	0,007762	0,001697	0,001296	0,000857	0,000822	0,005643	0,041087
0,001686	0,023016	0,033273	0,004959	0,001347	0,000988	0,000793	0,000684	0,00072	0,000511	0,001702	0,03427	0,052799	0,007578	0,000799	0,00072	0,000523	0,000422	0,001874	0,042447
0,005871	0,024442	0,029371	0,007694	0,004197	0,003647	0,003329	0,003092	0,002977	0,00276	0,003968	0,033163	0,04388	0,009744	0,003484	0,002682	0,002098	0,001869	0,00525	0,036297
0,001707	0,022104	0,03457	0,006751	0,001427	0,000647	0,000559	0,000561	0,000696	0,000449	0,001653	0,032874	0,05542	0,006955	0,00097	0,000788	0,000542	0,000429	0,001637	0,041545
0,005768	0,019528	0,026588	0,007086	0,002275	0,001153	0,000899	0,000857	0,00109	0,001698	0,007767	0,027878	0,041545	0,012507	0,003543	0,001581	0,001092	0,002431	0,006686	0,032095
0,002683	0,024514	0,03192	0,005975	0,001619	0,001045	0,00091	0,00086	0,000879	0,000696	0,002225	0,036967	0,050126	0,007137	0,001358	0,001073	0,000742	0,000676	0,003166	0,042248
0,001804	0,024146	0,032149	0,004526	0,001386	0,000991	0,000715	0,000622	0,000672	0,000522	0,001895	0,036962	0,051624	0,006581	0,000845	0,000757	0,000504	0,000461	0,002395	0,043571
0,002236	0,024694	0,031735	0,005525	0,0014	0,000767	0,000636	0,000662	0,000712	0,00055	0,002106	0,036923	0,049544	0,007567	0,001077	0,000915	0,000561	0,00056	0,003479	0,043028
0,002443	0,026737	0,029283	0,003862	0,000868	0,00095	0,001057	0,001095	0,000992	0,000759	0,002551	0,041765	0,047256	0,006383	0,001052	0,000939	0,000606	0,000645	0,006804	0,042497
0,002183	0,025925	0,030056	0,003963	0,000794	0,000683	0,00066	0,000694	0,000754	0,000644	0,002381	0,040337	0,048645	0,006489	0,000881	0,000774	0,000483	0,000468	0,004393	0,04317
0,005117	0,019008	0,027603	0,006812	0,002116	0,00109	0,000889	0,000859	0,00107	0,00151	0,00641	0,025871	0,04268	0,014133	0,003635	0,001601	0,001058	0,002125	0,005975	0,032994
0,001716	0,023055	0,033782	0,006733	0,001492	0,000652	0,000539	0,000529	0,00063	0,000436	0,00174	0,035098	0,05432	0,00647	0,000891	0,00074	0,000528	0,000424	0,001765	0,042161
0,001784	0,024054	0,032841	0,004993	0,001422	0,000699	0,000603	0,000571	0,000649	0,000492	0,001774	0,037075	0,052642	0,006274	0,000871	0,000776	0,000523	0,000432	0,002293	0,043609
0,001754	0,023121	0,033242	0,005332	0,001399	0,000701	0,0006	0,000574	0,0007	0,000504	0,001777	0,035076	0,053654	0,006887	0,000909	0,000742	0,000595	0,000476	0,001924	0,042471
0,00178	0,0238	0,032337	0,004553	0,001057	0,000855	0,000746	0,000668	0,000706	0,00051	0,001827	0,036908	0,052473	0,006798	0,000907	0,000792	0,000546	0,000465	0,002504	0,043292
0,001724	0,02704	0,030648	0,003603	0,000415	0,000335	0,000335	0,00042	0,000496	0,00033	0,001699	0,041103	0,049248	0,006752	0,000781	0,000739	0,000439	0,000343	0,004418	0,044985
0,001564	0,02434	0,031785	0,003522	0,000347	0,000364	0,000469	0,000544	0,000652	0,00047	0,001573	0,038104	0,051548	0,00609	0,000726	0,000752	0,000483	0,00036	0,004373	0,044001
0,001476	0,024411	0,031863	0,003288	0,000355	0,000412	0,000515	0,000554	0,000618	0,0004	0,001426	0,037745	0,051366	0,006872	0,000599	0,00068	0,000424	0,000289	0,004145	0,04467
0,001415	0,024122	0,03284	0,003989	0,000501	0,000521	0,000615	0,000618	0,000677	0,000445	0,001437	0,036083	0,053178	0,006689	0,000755	0,000699	0,000472	0,000311	0,002815	0,044213
0,00139	0,021894	0,034273	0,004436	0,000729	0,000446	0,000479	0,000455	0,000595	0,000412	0,001254	0,032406	0,055799	0,007296	0,000609	0,000636	0,000467	0,000299	0,001835	0,043586
0,00131	0,022288	0,034771	0,00488	0,000835	0,000508	0,000511	0,000468	0,000588	0,000405	0,001264	0,032499	0,056633	0,006107	0,000714	0,00064	0,000452	0,000267	0,001657	0,043146
0,001605	0,024444	0,031551	0,003466	0,000413	0,000404	0,000488	0,000547	0,000649	0,000445	0,00144	0,037497	0,050324	0,007087	0,000771	0,000789	0,000511	0,000351	0,004619	0,044214
0,001459	0,022855	0,033081	0,00373	0,000363	0,000359	0,000488	0,000565	0,000727	0,000571	0,001507	0,032612	0,052654	0,010525	0,000892	0,000731	0,000525	0,000375	0,002702	0,044044
0,001749	0,023347	0,033483	0,005321	0,001128	0,000585	0,000516	0,000521	0,000607	0,00042	0,001637	0,035408	0,052097	0,007239	0,000779	0,000749	0,000522	0,000434	0,00219	0,043448
0,002267	0,020757	0,034748	0,006888	0,001933	0,001037	0,000938	0,000873	0,000948	0,000714	0,001936	0,028367	0,056003	0,009235	0,001418	0,000945	0,000706	0,000567	0,002011	0,040286
0,001906	0,02359	0,032102	0,004035	0,000699	0,000627	0,000702	0,000726	0,000814	0,000646	0,001801	0,032688	0,049225	0,009647	0,000964	0,000798	0,000571	0,00051	0,00283	0,043511
0,001938	0,022209	0,033066	0,004651	0,000982	0,000747	0,000717	0,000636	0,000744	0,00063	0,002014	0,035154	0,055299	0,007296	0,000929	0,000806	0,000613	0,000523	0,002221	0,042026
0,005832	0,021358	0,026273	0,006276	0,002132	0,001217	0,001009	0,000979	0,001121	0,001604	0,007647	0,031498	0,040986	0,010954	0,003196	0,0016	0,001107	0,002319	0,00689	0,034283
0,001625	0,021977	0,033761	0,004809	0,000932	0,000581	0,000571	0,000527	0,00064	0,000484	0,001776	0,03523	0,056766	0,006873	0,000698	0,000656	0,000496	0,000406	0,001758	0,042275
0,005045	0,023189	0,030116	0,0072	0,003384	0,002675	0,002362	0,002191	0,002177	0,002043	0,003412	0,034322	0,048146	0,009402	0,00311	0,002343	0,00179	0,001571	0,004825	0,037053
0,001728	0,02124	0,034643	0,005225	0,000999	0,000595	0,000609	0,00056	0,000683	0,000516	0,001506	0,030247	0,055129	0,008749	0,000916	0,000744	0,000567	0,000433	0,001538	0,041899
0,001585	0,024909	0,032297	0,004663	0,001965	0,001139	0,000696	0,000629	0,000698	0,000467	0,001505	0,036829	0,052025	0,008296	0,000946	0,000802	0,00054	0,00039	0,0024	0,044295
0,001641	0,024958	0,033211	0,00555	0,001304	0,000581	0,00053	0,000544	0,000623	0,000438	0,001488	0,036488	0,052217	0,008383	0,000945	0,000804	0,00054	0,000392	0,002711	0,044051
0,001883	0,021432	0,035335	0,005774	0,001146	0,000635	0,000658	0,000627	0,000738	0,000635	0,001676	0,028306	0,055904	0,011764	0,001242	0,000782	0,000652	0,000538	0,001688	0,041327
0,002097	0,022252	0,032336	0,00462	0,0009	0,000763	0,000797	0,000788	0,000841	0,000736	0,002152	0,034606	0,053082	0,006411	0,001115	0,00101	0,000691	0,000637	0,002968	0,041735
0,002458	0,023519	0,032135	0,005301	0,001784	0,001518	0,001258	0,001027	0,000952	0,000732	0,002015	0,033231	0,049769	0,008751	0,001358	0,000979	0,000701	0,000621	0,00254	0,04162
0,00141	0,021234	0,03518	0,005147	0,000878	0,000472	0,000515	0,00048	0,000602	0,000428	0,001378	0,030366	0,057071	0,007431	0,000763	0,000624	0,000466	0,000314	0,001128	0,042126
0,001761	0,025341	0,031148	0,003488	0,000448	0,000342	0,000356	0,000448	0,000535	0,000362	0,001683	0,041608	0,051259	0,006102	0,000711	0,000771	0,000492	0,000378	0,004034	0,044644
0,001531	0,024048	0,032481	0,003713	0,000447	0,000327	0,000348	0,000425	0,000537	0,000321	0,00144	0,039278	0,053373	0,006207	0,000688	0,00075	0,000487	0,000331	0,002591	0,044401
0,001641	0,026101	0,031406	0,003742	0,000453	0,000366	0,00036	0,000422	0,000503	0,000324	0,001546	0,038927	0,049698	0,006881	0,000773	0,000728	0,000457	0,000333	0,003139	0,045051

2,36	2,4	2,44	2,48	2,52	2,56	2,6	2,64	2,68	2,72	2,76	2,8	2,84	2,88	2,92	2,96	3	3,04	3,08	3,12
0,008596	0,001223	0,000818	0,000822	0,000445	0,00029	0,000241	0,000209	0,000201	0,000281	0,00174	0,002289	0,000494	0,000119	9,57E-05	7,68E-05	6,85E-05	6,34E-05	3,16E-05	4,98E-05
0,012599	0,000443	0,000121	0,000289	0,000106	4,87E-05	5,67E-05	5,68E-05	5,16E-05	0,000101	0,001297	0,003075	0,000498	3,83E-05	3,54E-05	3,24E-05	2,69E-05	2,65E-05	-4,6E-07	9,9E-06
0,010991	0,002355	0,001362	0,001122	0,000784	0,00063	0,000563	0,000506	0,00044	0,000413	0,001507	0,0023	0,000662	0,000272	0,000223	0,000186	0,000145	0,000108	6,39E-05	3,86E-05
0,013436	0,000581	0,000186	0,000309	0,000151	8,6E-05	9,23E-05	8,43E-05	7,63E-05	0,00011	0,000841	0,002221	0,000553	7,35E-05	5,55E-05	5,63E-05	5,47E-05	5,13E-05	2,14E-05	3,16E-05
0,013029	0,002558	0,001129	0,000469	0,000204	0,000124	0,000108	0,000117	0,000148	0,000557	0,001426	0,00284	0,000783	0,000228	0,000112	7,01E-05	5,46E-05	4,91E-05	3,42E-05	3,3E-05
0,01066	0,00091	0,000454	0,000527	0,000296	0,000219	0,000203	0,000184	0,00017	0,000205	0,001077	0,002084	0,000518	0,000121	9,96E-05	9,32E-05	8,79E-05	8,18E-05	4,77E-05	5,44E-05
0,010947	0,000402	0,000145	0,000302	0,000109	5,76E-05	6,56E-05	5,74E-05	5,37E-05	9,88E-05	0,001045	0,002293	0,000459	4,39E-05	3,83E-05	3,42E-05	3,08E-05	3,09E-05	2,71E-07	1,75E-05
0,010135	0,000599	0,000263	0,000356	0,000146	9,13E-05	9,74E-05	8,34E-05	7,43E-05	0,000133	0,001528	0,002768	0,000441	5,77E-05	4,78E-05	4,06E-05	3,68E-05	3,41E-05	8,17E-07	1,32E-05
0,007224	0,000558	0,000305	0,000416	0,000195	0,000142	0,000147	0,000128	0,000127	0,000176	0,001525	0,001957	0,000419	0,000101	9,63E-05	8,69E-05	8,07E-05	7,38E-05	3,82E-05	6,08E-05
0,0082	0,00028	3,98E-05	0,000173	-3E-05	-7,5E-05	-6,1E-05	-6,7E-05	-6,6E-05	-7E-06	0,001222	0,002077	0,000287	-6E-05	-6,5E-05	-7,3E-05	-7,7E-05	-7,6E-05	-0,0001	-7,9E-05
0,013662	0,002572	0,001107	0,000472	0,00022	0,000139	0,000127	0,000145	0,000179	0,000731	0,002084	0,004451	0,001047	0,000287	0,000143	9,17E-05	6,74E-05	5,86E-05	4,29E-05	4,17E-05
0,012648	0,00046	0,000135	0,000296	0,000108	4,6E-05	5,49E-05	4,7E-05	4,04E-05	7,57E-05	0,000754	0,001957	0,000457	3,74E-05	2,58E-05	2,01E-05	2,12E-05	2,27E-05	-1,1E-05	1,96E-06
0,010959	0,000437	0,000173	0,000335	0,000138	8,17E-05	8,76E-05	8,22E-05	7,79E-05	0,000114	0,000928	0,002042	0,000462	6,58E-05	5,99E-05	5,25E-05	5,04E-05	4,99E-05	1,73E-05	3,48E-05
0,01251	0,000491	0,000162	0,000324	0,000157	8,81E-05	8,89E-05	8,41E-05	7,99E-05	0,000116	0,000969	0,002365	0,000515	6,57E-05	5,58E-05	5,41E-05	5,18E-05	5,11E-05	1,86E-05	3,36E-05
0,011016	0,000484	0,000192	0,000341	0,000146	8,29E-05	8,75E-05	7,6E-05	7,22E-05	0,000113	0,001115	0,002372	0,000463	5,76E-05	5,42E-05	4,5E-05	4,12E-05	4,32E-05	1,23E-05	2,95E-05
0,007937	0,000235	0,000155	0,000323	0,000108	4,48E-05	5,58E-05	4,94E-05	4,27E-05	8,57E-05	0,001744	0,002671	0,000433	3,42E-05	3,06E-05	3,26E-05	2,18E-05	2,06E-05	-1,3E-05	1,17E-05
0,009037	0,000273	0,000154	0,000312	0,000106	5,37E-05	6,21E-05	4,73E-05	4,02E-05	6,94E-05	0,001313	0,002249	0,000381	3,38E-05	2,94E-05	2,27E-05	1,59E-05	1,78E-05	-1,6E-05	1,23E-05
0,008946	0,000193	0,000105	0,000276	6,7E-05	1,54E-05	2,93E-05	1,74E-05	1,27E-05	5,51E-05	0,001749	0,002903	0,000357	1,48E-05	1,84E-05	1,06E-05	4,74E-06	8,53E-06	-2,8E-05	-4,9E-06
0,010443	0,000254	0,000126	0,000303	0,000103	5,01E-05	5,92E-05	4,93E-05	4,7E-05	7,65E-05	0,001224	0,002547	0,000458	3,35E-05	3,53E-05	3,06E-05	2,41E-05	2,66E-05	-6,2E-06	1,52E-05
0,012178	0,000246	8,89E-05	0,000271	8,8E-05	2,81E-05	3,68E-05	3,26E-05	2,18E-05	5,7E-05	0,001246	0,002985	0,000406	1,32E-05	1,39E-05	1,06E-05	7,91E-06	1,29E-05	-2,1E-05	-2,5E-06
0,01248	0,000273	7,8E-05	0,000259	7,83E-05	1,35E-05	2,01E-05	2,3E-05	2,22E-05	3,68E-05	0,000722	0,001934	0,000474	1,28E-05	3,04E-06	6,71E-06	6,52E-06	7,34E-06	-2,6E-05	-8,2E-06
0,008789	0,000345	0,000204	0,00035	0,000139	8,49E-05	9,38E-05	7,67E-05	6,39E-05	0,000102	0,001863	0,002874	0,000392	5,57E-05	5,39E-05	4,41E-05	3,48E-05	3,56E-05	1,09E-06	2,94E-05
0,011006	0,000275	0,000112	0,000287	0,000101	4,49E-05	6,02E-05	6,12E-05	5,15E-05	0,000187	0,002611	0,00525	0,000796	4,12E-05	5,95E-05	3,83E-05	1,21E-05	9,44E-06	-2,3E-05	-5,3E-06
0,011496	0,000442	0,000171	0,000333	0,000139	8,03E-05	9,25E-05	8,64E-05	7,85E-05	0,000127	0,00136	0,002897	0,000424	5,64E-05	5,56E-05	5,19E-05	4,85E-05	5,3E-05	2,05E-05	3,75E-05
0,013772	0,000897	0,000338	0,000429	0,000238	0,000154	0,000146	0,000129	0,000107	0,000146	0,001137	0,002914	0,000623	9,03E-05	5,82E-05	5,48E-05	4,04E-05	3,48E-05	7,08E-06	6,98E-06
0,011043	0,000522	0,00018	0,00032	0,000121	6,85E-05	7,75E-05	7,25E-05	5,91E-05	0,000144	0,002288	0,004321	0,000467	4,7E-05	4,98E-05	3,69E-05	2,7E-05	2,57E-05	-4E-06	7,52E-06
0,012439	0,000559	0,00019	0,000345	0,000159	9,42E-05	9,92E-05	9,75E-05	9,25E-05	0,000137	0,001111	0,002586	0,000516	7,02E-05	6,16E-05	6,04E-05	5,34E-05	4,92E-05	2,02E-05	3,21E-05
0,011231	0,002289	0,001067	0,000568	0,000277	0,000187	0,000163	0,000151	0,00016	0,000476	0,001427	0,002466	0,000692	0,000216	0,00012	8,32E-05	6,75E-05	5,75E-05	3,79E-05	4,04E-05
0,012988	0,000422	5,42E-05	0,000241	7,1E-05	1,83E-05	2,26E-05	1,81E-05	7,81E-06	4,93E-05	0,000939	0,00241	0,000415	1,35E-05	1,06E-05	1,29E-05	9,22E-06	8,1E-06	-2E-05	-3,6E-06
0,011096	0,001969	0,001002	0,000781	0,000452	0,000293	0,000223	0,000172	0,000133	0,000131	0,001079	0,001865	0,000375	2,12E-05	-1,8E-05	-4,7E-05	-6,8E-05	-9E-05	-0,00012	-0,00014
0,01366	0,000624	0,000176	0,000329	0,00015	7,72E-05	8,37E-05	8,69E-05	7,56E-05	0,000123	0,001372	0,003545	0,000595	6,6E-05	5,43E-05	5,28E-05	4,21E-05	3,97E-05	1,3E-05	2,21E-05
0,010391	0,000351	0,000194	0,000331	0,000144	9,34E-05	0,000106	0,000105	9,13E-05	0,00014	0,001819	0,003561	0,000534	7,85E-05	7,68E-05	6,72E-05	6,05E-05	5,84E-05	2,2E-05	4,04E-05
0,010327	0,000346	0,000197	0,000352	0,000145	9,09E-05	0,000102	9,25E-05	8,51E-05	0,000134	0,001845	0,003569	0,000563	7,57E-05	7,32E-05	6,36E-05	5,71E-05	5,58E-05	2,3E-05	3,92E-05
0,013836	0,000663	0,000175	0,00034	0,000165	8,6E-05	8,75E-05	9,5E-05	7,7E-05	0,000149	0,001926	0,005008	0,000758	6,83E-05	5,42E-05	5,76E-05	3,52E-05	3,35E-05	1,3E-05	1,31E-05
0,011928	0,000741	0,000337	0,000448	0,000215	0,000134	0,000117	0,000115	0,000107	0,000134	0,000835	0,001806	0,000502	7,83E-05	6,83E-05	6,64E-05	5,95E-05	5,13E-05	1,82E-05	3,3E-05
0,012076	0,000867	0,000348	0,000447	0,000234	0,00015	0,00013	0,000118	9,65E-05	0,000145	0,001469	0,003227	0,000647	7,7E-05	4,88E-05	4,28E-05	2,87E-05	1,95E-05	-7,9E-06	4,28E-07
0,013833	0,000443	5,11E-05	0,000231	6,82E-05	3,54E-06	1,24E-05	2E-05	1,77E-05	4,9E-05	0,000925	0,002633	0,000502	7,59E-06	7,3E-07	6,63E-06	6,46E-07	3,55E-06	-2,3E-05	-1,7E-05
0,008655	0,00031	0,00019	0,000363	0,000145	7,71E-05	8,1E-05	6,74E-05	6,06E-05	9,86E-05	0,0015	0,002335	0,00034	5,45E-05	4,75E-05	4,77E-05	3,62E-05	3,64E-05	1,79E-06	2,69E-05
0,010398	0,000308	0,000174	0,000354	0,000148	7,21E-05	7,49E-05	6,84E-05	6,13E-05	9,02E-05	0,00128	0,002445	0,000356	5,31E-05	4,39E-05	4,81E-05	3,65E-05	3,7E-05	2,99E-06	2,31E-05
0,009338	0,000284	0,000172	0,000357	0,000146	7,06E-05	7,2E-05	6E-05	4,98E-05	9,16E-05	0,001616	0,002821	0,000454	4,92E-05	3,95E-05	3,91E-05	2,77E-05	2,9E-05	-2E-06	1,76E-05

3,16	3,2	3,24	3,28	3,32	3,36	3,4	3,44	3,48	3,52	3,56	3,6	3,64	3,68	3,72	3,76	3,8	3,84	3,88	3,92
4,72E-05	4,81E-05	5,17E-05	4,71E-05	4,08E-05	3,29E-05	4,09E-05	4,59E-05	4,3E-05	6,26E-05	5,36E-05	3,95E-05	4,01E-05	4,23E-05	0,000116	0,000108	3,87E-05	3,86E-05	4,22E-05	7,95E-05
1,39E-05	9,01E-06	1,74E-05	2,09E-05	1,75E-05	1,7E-05	2,52E-05	3,18E-05	3,12E-05	5,3E-05	4,88E-05	3,2E-05	3,46E-05	3,41E-05	9,93E-05	0,000134	2,79E-05	2,92E-05	2,96E-05	4,06E-05
4,44E-06	-1,3E-05	-1,7E-05	-1,5E-05	-1,3E-05	-1,5E-05	-7,4E-06	-1,4E-05	-2,3E-05	-1E-05	-1,2E-05	-2,1E-05	-2,2E-05	-1,8E-05	4,68E-05	6,87E-05	-6,4E-06	-1,3E-06	7,39E-06	2,21E-05
3,39E-05	2,87E-05	3,43E-05	4E-05	3,68E-05	3,58E-05	4,23E-05	5,22E-05	4,96E-05	7,15E-05	6,72E-05	4,86E-05	4,82E-05	4,55E-05	0,000115	0,000186	3,98E-05	4,09E-05	3,92E-05	4,59E-05
3,2E-05	3,46E-05	3,97E-05	4,41E-05	3,92E-05	3,88E-05	4,2E-05	4,5E-05	4,05E-05	4,83E-05	4,92E-05	4,46E-05	4,58E-05	6,7E-05	0,000104	0,000127	5,87E-05	4,68E-05	4,85E-05	6,78E-05
5,05E-05	4,77E-05	5,21E-05	5,15E-05	4,81E-05	4,4E-05	5,21E-05	5,75E-05	5,58E-05	7,61E-05	6,75E-05	5,28E-05	5,24E-05	4,99E-05	0,000162	0,000194	4,92E-05	4,62E-05	4,51E-05	5,33E-05
1,5E-05	1E-05	1,67E-05	1,95E-05	1,64E-05	1,55E-05	2,42E-05	3,25E-05	2,8E-05	5,06E-05	4,25E-05	2,82E-05	2,97E-05	2,69E-05	0,000106	0,000119	2,34E-05	2,53E-05	2,74E-05	4E-05
8,82E-06	4,8E-06	1,08E-05	1,34E-05	1,41E-05	1,26E-05	1,73E-05	2,43E-05	2,13E-05	4,28E-05	3,67E-05	2,21E-05	2,65E-05	2,47E-05	0,000113	0,000127	1,78E-05	1,67E-05	2,08E-05	3,71E-05
4,86E-05	4,85E-05	5,62E-05	5,83E-05	5,2E-05	4,54E-05	5,48E-05	5,35E-05	4,69E-05	6,68E-05	6,22E-05	5,13E-05	5,28E-05	5,17E-05	0,00016	0,000125	3,93E-05	4,35E-05	4,58E-05	5,95E-05
-7,8E-05	-7,5E-05	-6,9E-05	-6,6E-05	-6,3E-05	-6,3E-05	-4,7E-05	-3,7E-05	-3,5E-05	-1E-05	-1,4E-05	-2,5E-05	-1,9E-05	-1,6E-05	9,41E-05	9,84E-05	-7,1E-06	-1,7E-06	6,21E-06	2,2E-05
4,22E-05	4,08E-05	4,5E-05	5,03E-05	4,99E-05	4,57E-05	4,76E-05	5,08E-05	4,54E-05	5,74E-05	5,67E-05	4,91E-05	5,31E-05	7,07E-05	0,000117	0,000154	6,53E-05	5,33E-05	5,6E-05	6,78E-05
7,01E-06	3,2E-06	5,58E-06	9,77E-06	1,18E-05	7,14E-06	1,21E-05	2,4E-05	2,3E-05	4,35E-05	3,9E-05	2,58E-05	2,51E-05	1,94E-05	0,000122	0,00018	2,1E-05	1,97E-05	2,37E-05	3,22E-05
3,37E-05	2,79E-05	3,18E-05	3,54E-05	3,47E-05	2,89E-05	3,86E-05	4,87E-05	4,63E-05	6,5E-05	5,81E-05	4,2E-05	4,27E-05	3,85E-05	0,000148	0,000184	3,54E-05	3,36E-05	3,63E-05	4,77E-05
3,39E-05	2,93E-05	3,58E-05	3,52E-05	3,36E-05	3,1E-05	3,69E-05	4,47E-05	4,7E-05	6,74E-05	6,05E-05	4,38E-05	4,26E-05	3,86E-05	0,000137	0,000184	3,84E-05	3,56E-05	3,5E-05	4,61E-05
2,71E-05	2,53E-05	3,12E-05	3,05E-05	2,96E-05	2,64E-05	3,14E-05	3,8E-05	3,48E-05	5,7E-05	4,99E-05	3,45E-05	3,62E-05	3,62E-05	0,000115	0,000132	3,06E-05	3,16E-05	3,19E-05	4,15E-05
3,67E-06	-3,1E-07	4,85E-06	8,9E-06	8,5E-06	3,23E-06	1,37E-05	2,93E-05	3,31E-05	5,47E-05	3,5E-05	1,41E-05	1,75E-05	1,1E-05	0,000125	0,000121	4,63E-06	4,75E-06	1,43E-06	1,15E-05
4,95E-06	1,54E-06	9,71E-06	1,65E-05	1,24E-05	7,95E-06	2,37E-05	3,6E-05	3,75E-05	5,56E-05	3,93E-05	2,3E-05	2,01E-05	1,6E-05	0,000138	0,000142	4,09E-06	7,15E-06	4,49E-06	1,78E-05
-1E-05	-8,6E-06	-1,3E-06	-1,2E-06	-4,6E-06	-4,2E-06	9,53E-06	2,62E-05	2,82E-05	4,85E-05	3,03E-05	8,57E-06	6,46E-06	3,23E-06	0,000103	9,95E-05	-6,1E-06	-4,5E-06	-2,7E-06	1,46E-05
1,16E-05	6,99E-06	1,29E-05	1,45E-05	1,02E-05	1,24E-05	2,64E-05	4,27E-05	4,53E-05	6,61E-05	4,91E-05	2,47E-05	2,17E-05	1,86E-05	8,93E-05	0,000102	8,51E-06	1,41E-05	1,15E-05	2,14E-05
-2,5E-07	-2,7E-06	4,07E-06	6,88E-06	6,67E-06	1,05E-05	2,07E-05	4,7E-05	6,33E-05	9,18E-05	6,88E-05	3,72E-05	2,8E-05	1,59E-05	0,000123	0,000211	9,36E-06	7,53E-06	7,13E-06	1,84E-05
-6,8E-06	-6,8E-06	-3E-06	-1,2E-06	1,02E-06	5,72E-06	2,04E-05	3,97E-05	5,29E-05	7,84E-05	6,43E-05	3,13E-05	2,18E-05	1,29E-05	9,86E-05	0,000205	7,8E-06	5,26E-06	6,17E-06	1,64E-05
1,98E-05	1,43E-05	1,93E-05	2,21E-05	2,12E-05	2,14E-05	3,27E-05	4,6E-05	4,72E-05	6,42E-05	4,74E-05	2,88E-05	3,03E-05	2,24E-05	0,000125	0,00012	1,19E-05	1,51E-05	1,09E-05	2,53E-05
-2,7E-06	-6,8E-06	1,88E-07	7,86E-06	5,1E-06	5,82E-06	2,12E-05	4,3E-05	5,3E-05	7,87E-05	5,66E-05	3,16E-05	2,63E-05	2,19E-05	0,000117	0,000144	4,47E-06	7,88E-06	3,46E-06	1,58E-05
3,17E-05	2,93E-05	3,48E-05	3,31E-05	3,16E-05	2,98E-05	3,49E-05	4,53E-05	4,51E-05	6,87E-05	6,18E-05	4,35E-05	4,43E-05	3,88E-05	0,000149	0,000184	3,24E-05	3,12E-05	3,31E-05	4,76E-05
7,26E-06	3,82E-06	9,9E-06	1,71E-05	1,59E-05	1,4E-05	2,22E-05	3,03E-05	3,04E-05	5,47E-05	4,73E-05	2,84E-05	2,82E-05	2,94E-05	9,26E-05	0,000208	2,68E-05	2,41E-05	2,29E-05	3,17E-05
8,73E-06	6,28E-06	9,78E-06	1,6E-05	1,5E-05	1,23E-05	1,87E-05	2,96E-05	3,22E-05	5,37E-05	4,84E-05	2,82E-05	2,91E-05	2,79E-05	0,000118	0,000143	1,94E-05	2,22E-05	2E-05	2,95E-05
3,22E-05	2,59E-05	3,23E-05	3,89E-05	3,88E-05	3,33E-05	4,08E-05	4,93E-05	4,76E-05	6,66E-05	6,5E-05	5,09E-05	4,67E-05	4,26E-05	0,000106	0,000135	4,02E-05	4,09E-05	3,61E-05	5,12E-05
3,87E-05	3,64E-05	4,06E-05	4,17E-05	3,76E-05	3,53E-05	3,6E-05	3,81E-05	3,49E-05	4,68E-05	4,55E-05	3,86E-05	4,11E-05	5,86E-05	0,000112	0,000119	5,06E-05	4,34E-05	4,26E-05	5,76E-05
-4,1E-06	-1E-05	-9,3E-06	-7E-07	5,85E-06	2,71E-06	3,67E-06	7,61E-06	1,08E-05	4,13E-05	4,05E-05	2,15E-05	1,61E-05	1,66E-05	0,000101	0,000162	1,3E-05	1,75E-05	2,52E-05	3,49E-05
-0,00017	-0,00018	-0,00018	-0,00017	-0,00017	-0,00017	-0,00016	-0,00017	-0,00017	-0,00015	-0,00015	-0,00016	-0,00015	-0,00014	-4,7E-05	-9,8E-06	-0,00012	-0,00011	-0,0001	-8,2E-05
2,43E-05	2,08E-05	2,4E-05	2,99E-05	3,23E-05	2,86E-05	3,98E-05	4,64E-05	4,81E-05	7,14E-05	6,6E-05	4,56E-05	4,31E-05	4,35E-05	9,84E-05	0,000174	3,49E-05	3,52E-05	3,6E-05	4,33E-05
3,78E-05	3,39E-05	4,02E-05	4,32E-05	4,05E-05	3,53E-05	4,27E-05	5,08E-05	4,65E-05	6,75E-05	5,82E-05	4,54E-05	4,68E-05	4,14E-05	0,000121	0,000129	3,56E-05	3,78E-05	3,81E-05	4,82E-05
3,79E-05	3,21E-05	3,64E-05	3,89E-05	3,58E-05	3,22E-05	4,05E-05	4,91E-05	4,81E-05	6,74E-05	5,68E-05	4E-05	4,03E-05	3,71E-05	0,00014	0,00017	3,96E-05	4,24E-05	3,8E-05	4,5E-05
1,81E-05	1,47E-05	2,13E-05	3,16E-05	2,57E-05	2,22E-05	3,13E-05	4,58E-05	5,18E-05	7,62E-05	7,18E-05	4,71E-05	4,2E-05	3,44E-05	7,09E-05	0,000141	2,69E-05	2,58E-05	2,74E-05	3,52E-05
2,99E-05	2,67E-05	3,37E-05	3,73E-05	3,32E-05	2,89E-05	3,38E-05	4,28E-05	3,88E-05	5,97E-05	5,6E-05	4,2E-05	4,26E-05	4,12E-05	0,000123	0,000153	3,2E-05	3,3E-05	3,48E-05	4,78E-05
8,06E-07	-2,1E-06	1,27E-06	7,05E-06	6,25E-06	5,7E-06	1,17E-05	2,02E-05	2,2E-05	4,37E-05	3,8E-05	2,06E-05	1,89E-05	1,97E-05	8,77E-05	0,00012	1,65E-05	1,56E-05	1,32E-05	2,65E-05
-1,2E-05	-1,3E-05	-8,4E-06	-1,5E-06	-1,7E-06	1,32E-06	1,05E-05	2,33E-05	2,53E-05	4,99E-05	4,85E-05	2,7E-05	2,37E-05	2,05E-05	6,63E-05	0,000139	1,44E-05	1,93E-05	1,94E-05	2,73E-05
1,82E-05	1,55E-05	2,16E-05	2,3E-05	2,04E-05	1,83E-05	2,89E-05	3,86E-05	4,15E-05	6,18E-05	4,73E-05	2,4E-05	2,23E-05	2,18E-05	0,000164	0,000168	1,34E-05	1,31E-05	9,25E-06	2,29E-05
1,93E-05	1,77E-05	2,33E-05	2,8E-05	2,58E-05	2,2E-05	3,13E-05	4,23E-05	4,65E-05	7,33E-05	5,72E-05	2,99E-05	2,69E-05	2,37E-05	0,000155	0,000188	1,64E-05	1,69E-05	1,21E-05	2,36E-05
1,03E-05	8,05E-06	1,36E-05	1,69E-05	1,73E-05	1,25E-05	1,99E-05	3E-05	3,3E-05	5,8E-05	4,46E-05	2,12E-05	1,57E-05	1,43E-05	0,000124	0,000134	1,1E-05	1,13E-05	6,54E-06	1,55E-05

	3,96	4	4,04	4,08	4,12	4,16	4,2	4,24	4,28	4,32	4,36	4,4	4,44	4,48	4,52	4,56	4,6	4,64	4,68	4,72
0,000106	8,62E-05	0,000113	0,000318	0,003891	0,012915	0,00183	0,000581	0,0094	0,00825	0,000724	0,000269	0,000177	0,000193	0,000151	0,000123	0,000147	9,34E-05	7,35E-05	7,84E-05	
9,94E-05	8,7E-05	0,00012	0,000277	0,003804	0,011615	0,004073	0,000345	0,008353	0,010024	0,000363	6,04E-05	2,82E-05	7,28E-05	5,39E-05	1,8E-05	3,89E-05	1,12E-05	1,15E-05	1,44E-05	
7,44E-05	8,51E-05	0,00018	0,000327	0,00333	0,01071	0,003052	0,000839	0,00779	0,008262	0,001091	0,000513	0,000349	0,000311	0,000237	0,000183	0,000169	0,000136	0,000127	0,000127	
0,000101	0,000103	0,000131	0,00023	0,003525	0,010761	0,004897	0,000386	0,007235	0,0111	0,000465	9,4E-05	4,67E-05	8,13E-05	6,89E-05	2,99E-05	4,31E-05	1,95E-05	2E-05	2,06E-05	
0,000119	0,00017	0,000419	0,001097	0,004306	0,008954	0,004538	0,002434	0,007023	0,008407	0,001537	0,000565	0,000209	0,000116	6,86E-05	3,45E-05	4,29E-05	2,63E-05	2,26E-05	1,95E-05	
0,000106	9,28E-05	0,000151	0,000244	0,003703	0,012182	0,002744	0,000531	0,008913	0,009173	0,000659	0,000194	0,000122	0,00015	0,000114	6,86E-05	8,14E-05	5,23E-05	4,59E-05	4,22E-05	
9,78E-05	8,52E-05	0,000206	0,000275	0,003879	0,012501	0,002924	0,000352	0,008904	0,009547	0,000394	6,18E-05	3,14E-05	7,67E-05	5,52E-05	1,71E-05	3,99E-05	1,4E-05	1,1E-05	1,12E-05	
9,4E-05	7,97E-05	9,66E-05	0,000261	0,003903	0,012635	0,002563	0,00045	0,009223	0,009074	0,000477	0,000107	5,72E-05	9,16E-05	6,4E-05	2,84E-05	5,42E-05	1,62E-05	9,8E-06	1,32E-05	
0,000117	0,000104	0,000172	0,000299	0,004071	0,013447	0,001464	0,000439	0,009613	0,008686	0,000466	0,000116	7,35E-05	0,000114	8E-05	4,47E-05	7,04E-05	3,66E-05	3,38E-05	3,03E-05	
8,67E-05	8,04E-05	0,000162	0,000283	0,004016	0,01319	0,001684	0,000419	0,00971	0,008527	0,000373	5,73E-05	2,08E-05	6,59E-05	3,69E-05	4,52E-06	2,41E-05	3,08E-06	7,51E-06	1,25E-05	
0,000121	0,00017	0,000397	0,000955	0,004209	0,008924	0,00497	0,002256	0,006745	0,009006	0,001501	0,000566	0,00021	0,000114	7,54E-05	4,18E-05	5,05E-05	2,89E-05	2,47E-05	2,52E-05	
8,47E-05	7,54E-05	0,000104	0,000196	0,003642	0,011135	0,004192	0,000377	0,00784	0,010568	0,000452	7,27E-05	3,25E-05	7,81E-05	5,53E-05	1,31E-05	3,16E-05	1,22E-05	7,74E-06	1,19E-05	
0,000102	8,85E-05	0,000212	0,000232	0,003731	0,012403	0,002919	0,00036	0,008792	0,009737	0,000427	8,13E-05	4,45E-05	8,8E-05	6,57E-05	2,81E-05	4,42E-05	2,01E-05	2,21E-05	2,47E-05	
0,0001	9,15E-05	0,000154	0,000226	0,003713	0,011345	0,00407	0,000384	0,008016	0,010466	0,000452	9,05E-05	3,86E-05	8,84E-05	6,94E-05	2,72E-05	4,46E-05	2,24E-05	2,11E-05	1,95E-05	
0,000102	8,71E-05	0,000139	0,000269	0,00383	0,012454	0,00303	0,000355	0,008653	0,009713	0,000418	7,91E-05	4,08E-05	8,8E-05	6,69E-05	2,59E-05	4,42E-05	2,06E-05	2,69E-05	2,86E-05	
7,22E-05	4,92E-05	3,08E-05	0,000158	0,00397	0,013876	0,00137	0,000229	0,009915	0,008851	0,000294	5,41E-05	2,85E-05	7,8E-05	4,82E-05	4,87E-06	3,07E-05	1,42E-06	-1,3E-06	-5,1E-06	
7,31E-05	6,02E-05	0,000105	0,000191	0,003814	0,013081	0,002472	0,000237	0,008737	0,009945	0,000345	6,01E-05	3,28E-05	7,68E-05	5,16E-05	6,17E-06	3,3E-05	2,42E-06	1,21E-05	1,09E-05	
7,06E-05	5,44E-05	0,000109	0,000194	0,003907	0,013282	0,002392	0,000193	0,009031	0,009824	0,000294	4,36E-05	2,07E-05	6,72E-05	4,09E-05	-9,6E-07	4,03E-05	-3,6E-06	-4,4E-06	-5,5E-06	
7,82E-05	6,49E-05	0,000126	0,000192	0,003718	0,012614	0,003178	0,000196	0,00846	0,010308	0,000322	6,03E-05	3,56E-05	7,95E-05	5,59E-05	9,81E-06	3,1E-05	5,22E-06	3,34E-06	1,85E-06	
7,28E-05	6,45E-05	0,000163	0,000165	0,003343	0,011737	0,004179	0,000236	0,007788	0,011097	0,000353	4,41E-05	2,25E-05	6,67E-05	4,73E-05	4,74E-06	3,71E-05	-6,6E-07	-5,4E-06	-5,8E-06	
6,99E-05	6,26E-05	0,000158	0,000191	0,003158	0,011871	0,004373	0,000227	0,007586	0,011132	0,000367	4,32E-05	2,22E-05	6,77E-05	4,62E-05	3,82E-06	1,88E-05	-2,2E-06	-5,5E-06	-5,5E-06	
7,97E-05	6,55E-05	0,000112	0,000229	0,003894	0,013458	0,002272	0,000224	0,008957	0,009697	0,000377	8,14E-05	4,57E-05	8,72E-05	5,79E-05	1,21E-05	5,44E-05	5,67E-06	3,76E-06	5,24E-07	
7,54E-05	6,42E-05	0,000123	0,000213	0,003689	0,012542	0,003376	0,000234	0,008311	0,010414	0,000337	4,51E-05	2,33E-05	6,87E-05	4,54E-05	5,19E-06	2,48E-05	6,4E-07	8,16E-06	8,53E-06	
0,000104	8,98E-05	0,000114	0,000219	0,003782	0,012122	0,003269	0,000363	0,008831	0,009745	0,000422	7,81E-05	4,21E-05	8,99E-05	6,6E-05	2,75E-05	5,61E-05	1,82E-05	1,05E-05	1,28E-05	
8,13E-05	8,28E-05	0,000143	0,000229	0,002661	0,011123	0,005001	0,000518	0,006581	0,011458	0,000688	0,000168	8,97E-05	0,000113	8,67E-05	4,15E-05	4,98E-05	3,03E-05	2,68E-05	2,7E-05	
9,16E-05	8,45E-05	0,000186	0,000306	0,003835	0,012629	0,003074	0,000381	0,008819	0,009622	0,000429	7,89E-05	3,38E-05	7,87E-05	5,29E-05	1,58E-05	3,51E-05	8,66E-06	1,11E-05	1,42E-05	
0,000109	0,000102	0,000209	0,0003	0,003667	0,011564	0,00408	0,000421	0,007828	0,010498	0,000462	0,000101	5,4E-05	9,23E-05	6,93E-05	2,97E-05	4,35E-05	2,24E-05	1,7E-05	1,9E-05	
0,000106	0,000131	0,000331	0,000987	0,004361	0,009928	0,003242	0,002163	0,00805	0,007844	0,00137	0,000507	0,000225	0,000141	9,05E-05	5,55E-05	5,97E-05	3,53E-05	2,65E-05	2,41E-05	
8,49E-05	7,64E-05	0,000205	0,000271	0,003679	0,011238	0,004439	0,000368	0,007735	0,010765	0,000399	5,1E-05	1,46E-05	5,95E-05	3,77E-05	-1,1E-06	2,27E-05	9,31E-06	7,99E-06	4,83E-06	
-2,3E-05	-4,6E-06	9,93E-05	0,00023	0,003178	0,010814	0,00316	0,000755	0,0075	0,008854	0,001023	0,000385	0,000211	0,000175	0,000108	5,55E-05	4,55E-05	1,81E-05	1,16E-05	1,05E-05	
9,72E-05	9,47E-05	0,00021	0,000271	0,003376	0,011087	0,005011	0,000378	0,007178	0,011299	0,000474	9,02E-05	4,32E-05	8,79E-05	6,66E-05	2,7E-05	4,33E-05	1,87E-05	1,6E-05	1,97E-05	
0,000107	9,97E-05	0,00015	0,000211	0,003824	0,012887	0,002603	0,000242	0,009096	0,009537	0,000341	8,22E-05	4,43E-05	9,09E-05	7,07E-05	2,96E-05	5,28E-05	2,56E-05	2,56E-05	2,74E-05	
0,000102	8,69E-05	0,000145	0,000173	0,003753	0,012561	0,002763	0,000254	0,008902	0,009825	0,000352	7,64E-05	4,92E-05	9,5E-05	7,02E-05	3,12E-05	5,1E-05	2,5E-05	2,18E-05	2,29E-05	
8,91E-05	8,93E-05	0,000219	0,000281	0,003104	0,010981	0,005259	0,000392	0,006767	0,011595	0,000493	0,000103	4,89E-05	9,09E-05	6,74E-05	2,64E-05	4,22E-05	1,66E-05	2,54E-05	2,61E-05	
0,000105	9,29E-05	0,000173	0,000331	0,003484	0,012066	0,003733	0,000471	0,007806	0,010263	0,000557	0,000127	8,26E-05	0,00011	8,08E-05	3,38E-05	4,72E-05	2,54E-05	2,6E-05	2,95E-05	
8,22E-05	7,26E-05	0,000154	0,000286	0,003703	0,01175	0,003631	0,000495	0,00845	0,009542	0,000606	0,000151	8,01E-05	0,000111	7,76E-05	3,84E-05	4,73E-05	2,4E-05	1,77E-05	1,85E-05	
8,14E-05	8,37E-05	0,000203	0,000235	0,00337	0,010668	0,0054	0,000301	0,006647	0,011969	0,000364	5,12E-05	1,51E-05	6,22E-05	4,46E-05	7,47E-06	3,25E-05	1,87E-06	-1,4E-06	2,81E-06	
7,91E-05	5,8E-05	4,1E-05	0,000172	0,00392	0,013525	0,001766	0,000278	0,009585	0,009146	0,000356	7,37E-05	4,19E-05	8,69E-05	5,66E-05	1,52E-05	4,13E-05	5,63E-06	3,51E-06	3,55E-06	
8,06E-05	6,05E-05	4,01E-05	0,000151	0,003791	0,012879	0,00256	0,000255	0,0088	0,00996	0,00036	7,28E-05	4,07E-05	8,17E-05	5,94E-05	1,44E-05	4,19E-05	6,69E-06	8,21E-06	9,02E-06	
7,33E-05	5,34E-05	3,95E-05	0,000216	0,003962	0,013717	0,001898	0,000237	0,009588	0,009063	0,00031	5,89E-05	3,12E-05	7,92E-05	5,51E-05	1,33E-05	3,45E-05	1,31E-06	9,43E-07	1,96E-06	

4,76	4,8	4,84	4,88	4,92	4,96	5	5,04	5,08	5,12	5,16	5,2	5,24	5,28	5,32	5,36	5,4	5,44	5,48	5,52
6,65E-05	4,37E-05	3,54E-05	3,53E-05	4,2E-05	3,74E-05	2,8E-05	3,89E-05	0,000179	0,000486	0,000472	0,000227	0,001409	0,007429	0,008775	0,033982	0,004708	0,000792	0,000369	0,000354
1,01E-05	1,48E-05	2,18E-05	2,73E-05	3,47E-05	3,63E-05	2,88E-05	3,85E-05	0,000168	0,000446	0,000459	0,000236	0,000951	0,008037	0,006358	0,038759	0,004825	0,000342	3,64E-05	0,000109
0,000116	0,000113	0,000115	0,000113	0,000118	0,000116	0,000111	0,000113	0,000235	0,000497	0,000524	0,000354	0,001379	0,006692	0,007024	0,031034	0,005536	0,001469	0,000806	0,000647
1,36E-05	1,78E-05	2,79E-05	2,92E-05	3,71E-05	4,15E-05	3,44E-05	4,27E-05	0,000173	0,000515	0,000511	0,00026	0,000868	0,007987	0,005337	0,03896	0,00456	0,000374	6,99E-05	9,81E-05
1,37E-05	2,02E-05	2,57E-05	2,73E-05	3,49E-05	4,32E-05	4,63E-05	7,52E-05	0,000192	0,000403	0,000492	0,000772	0,001949	0,007985	0,009258	0,029249	0,007375	0,001932	0,000623	0,000279
3,46E-05	3,68E-05	4,19E-05	4,35E-05	4,96E-05	4,88E-05	3,77E-05	4,71E-05	0,000205	0,0005	0,000482	0,000229	0,001078	0,007746	0,007204	0,036284	0,004672	0,000598	0,000232	0,000253
9,75E-06	1,49E-05	2,09E-05	2,52E-05	3,69E-05	3,93E-05	3,08E-05	4,37E-05	0,000183	0,000524	0,000514	0,000234	0,001013	0,008073	0,00721	0,037576	0,00431	0,000291	4,38E-05	0,00012
1,34E-05	1,93E-05	2,61E-05	2,65E-05	3,39E-05	3,37E-05	2,5E-05	3,59E-05	0,000178	0,000452	0,000451	0,00024	0,001171	0,007905	0,007955	0,036752	0,004823	0,000481	0,000134	0,000153
2,41E-05	2,55E-05	3,67E-05	4,34E-05	5,45E-05	4,88E-05	3,98E-05	5,07E-05	0,000218	0,00056	0,000522	0,000233	0,001545	0,007806	0,009787	0,035478	0,003711	0,000357	0,000125	0,000187
8,42E-06	1,59E-05	2,76E-05	3,58E-05	5,08E-05	5,29E-05	5,32E-05	6,94E-05	0,000251	0,000613	0,000587	0,000299	0,001361	0,007958	0,008738	0,036353	0,004114	0,000316	6,27E-05	0,000129
2,04E-05	2,31E-05	2,94E-05	3,39E-05	4,23E-05	4,64E-05	4,64E-05	6,92E-05	0,000177	0,000328	0,000414	0,000686	0,001781	0,007919	0,00924	0,031146	0,00825	0,002137	0,000687	0,000297
8,52E-06	9,42E-06	1,65E-05	2,5E-05	3,5E-05	3,03E-05	2,68E-05	3,88E-05	0,000194	0,000547	0,000535	0,000235	0,000905	0,008027	0,005836	0,038723	0,004283	0,000318	5,79E-05	0,000118
1,24E-05	1,88E-05	2,7E-05	3E-05	3,94E-05	4,04E-05	3,4E-05	3,97E-05	0,0002	0,000526	0,000505	0,000215	0,000961	0,008032	0,006989	0,037867	0,004168	0,000297	6,25E-05	0,000134
1,48E-05	1,87E-05	2,58E-05	2,89E-05	4,24E-05	4,08E-05	3,37E-05	4,05E-05	0,000193	0,000525	0,000512	0,000244	0,000943	0,008051	0,006131	0,038556	0,004456	0,000339	4,75E-05	0,00013
1,43E-05	1,99E-05	2,58E-05	2,8E-05	4,11E-05	4,19E-05	3,23E-05	4,16E-05	0,000183	0,000506	0,000497	0,000222	0,000998	0,007984	0,00721	0,038064	0,00443	0,000338	6,76E-05	0,000136
-7,8E-06	-3,2E-06	4,12E-06	1,65E-06	8,17E-06	9,32E-06	-2,4E-06	5,34E-06	0,000184	0,000574	0,000517	0,000147	0,0011	0,008006	0,009098	0,037389	0,004191	0,000316	8,55E-05	0,00016
-2,7E-06	-1,9E-06	4,81E-06	5,8E-06	1,49E-05	1,41E-05	-1,7E-06	9,56E-06	0,000154	0,000414	0,000399	0,000143	0,001154	0,007866	0,007992	0,037522	0,003954	0,000289	8,45E-05	0,000156
-5,8E-06	-5,3E-06	1,35E-06	7,55E-07	9,93E-06	1,02E-05	-3E-06	8,07E-06	0,000133	0,000352	0,000361	0,000138	0,001154	0,007961	0,008226	0,03819	0,004362	0,000297	6,47E-05	0,000146
-1E-06	2,72E-06	6,19E-06	1,02E-05	1,91E-05	1,73E-05	5,09E-06	1,48E-05	0,000144	0,000523	0,000505	0,000158	0,000975	0,007991	0,006907	0,038173	0,004287	0,0003	7,82E-05	0,000149
-5,8E-06	-3E-06	3,61E-06	6,89E-06	1,2E-05	1,48E-05	4,78E-06	1,19E-05	0,000154	0,000357	0,000364	0,000164	0,000873	0,008079	0,005892	0,039549	0,004829	0,000344	6,07E-05	0,00013
-6,4E-06	-4,4E-07	3,48E-06	3,66E-06	1,58E-05	2,18E-05	9,82E-06	1,36E-05	0,000165	0,000536	0,000509	0,000181	0,000825	0,008003	0,005301	0,038644	0,004264	0,000268	5,38E-05	0,000119
1,38E-06	1,15E-06	7,35E-06	6,98E-06	1,29E-05	1,3E-05	-3,9E-06	7,22E-06	0,000131	0,000344	0,000347	0,000128	0,001174	0,007811	0,008431	0,037407	0,004407	0,000375	0,000113	0,000177
-4,8E-06	-4E-07	6,32E-06	8,65E-06	1,88E-05	1,79E-05	7,97E-06	1,62E-05	0,00014	0,00036	0,000373	0,000172	0,000985	0,008027	0,007697	0,039611	0,006529	0,000634	0,000114	0,000173
1,21E-05	1,64E-05	2,59E-05	2,98E-05	3,93E-05	3,87E-05	2,93E-05	3,68E-05	0,000181	0,000366	0,000379	0,000204	0,000978	0,008055	0,006911	0,038419	0,004762	0,000362	5,8E-05	0,00013
1,96E-05	2,13E-05	2,69E-05	3,05E-05	4,06E-05	4,13E-05	3,17E-05	3,75E-05	0,000167	0,000523	0,00052	0,000256	0,000874	0,007792	0,005654	0,037537	0,005726	0,000716	0,000192	0,000193
5,54E-06	9,61E-06	1,82E-05	2,08E-05	3E-05	3,09E-05	2,4E-05	3,5E-05	0,000164	0,00038	0,000395	0,000226	0,001054	0,008004	0,007787	0,037025	0,005714	0,000506	7,4E-05	0,000137
1,95E-05	2,73E-05	3,12E-05	3,12E-05	3,9E-05	4,26E-05	3,71E-05	4,67E-05	0,000154	0,000403	0,000441	0,000251	0,000992	0,008044	0,006637	0,039614	0,004804	0,000403	8,37E-05	0,000154
2,34E-05	2,49E-05	3,04E-05	3,4E-05	4,08E-05	4,3E-05	4,15E-05	6,84E-05	0,00019	0,000381	0,000435	0,000665	0,001874	0,008204	0,009562	0,029692	0,006676	0,001655	0,000611	0,000324
-3E-06	5,98E-06	1,73E-05	1,82E-05	2,55E-05	2,8E-05	2,07E-05	2,88E-05	0,000161	0,000397	0,000428	0,000237	0,000919	0,008102	0,005984	0,040626	0,004614	0,000303	1,65E-05	9,82E-05
1,52E-06	7,67E-06	1,32E-05	1,86E-05	2,75E-05	3,32E-05	3,64E-05	5,21E-05	0,000193	0,000415	0,000461	0,000337	0,001323	0,006972	0,007417	0,033456	0,005605	0,001366	0,000693	0,00053
1,19E-05	1,86E-05	2,59E-05	2,62E-05	3,83E-05	3,78E-05	3,57E-05	3,8E-05	0,000147	0,000346	0,000379	0,000223	0,000851	0,008043	0,005576	0,039319	0,005494	0,000507	6,72E-05	0,000123
1,73E-05	2,11E-05	2,8E-05	3,19E-05	4,51E-05	4,52E-05	3,6E-05	4,32E-05	0,000189	0,000593	0,000564	0,000228	0,000991	0,008054	0,007837	0,038704	0,005008	0,000362	6,69E-05	0,000134
1,7E-05	2,09E-05	2,91E-05	3,18E-05	4,4E-05	4,15E-05	3,38E-05	4,25E-05	0,000205	0,000598	0,00056	0,000208	0,001039	0,008061	0,007702	0,038899	0,005018	0,000379	6,91E-05	0,000145
1,45E-05	1,72E-05	2,37E-05	3,06E-05	4,54E-05	4,89E-05	4,21E-05	4,45E-05	0,000161	0,000553	0,000571	0,000279	0,000904	0,00805	0,005944	0,039933	0,00668	0,000734	8,08E-05	0,000144
2,3E-05	2,58E-05	2,98E-05	3,11E-05	3,37E-05	3,49E-05	3,13E-05	4,43E-05	0,000177	0,000393	0,000407	0,000216	0,001031	0,007816	0,006709	0,037093	0,004321	0,000429	0,000162	0,000191
1,09E-05	1,71E-05	1,88E-05	2,05E-05	2,69E-05	2,98E-05	2,07E-05	2,9E-05	0,00016	0,000456	0,000464	0,000239	0,001022	0,007798	0,006756	0,036483	0,005457	0,000671	0,000193	0,000213
-1E-06	6,15E-06	1,42E-05	2,07E-05	3,27E-05	3,43E-05	3,23E-05	3,49E-05	0,000152	0,000469	0,000489	0,000229	0,000793	0,008148	0,004789	0,039755	0,004669	0,000331	1,29E-05	8,41E-05
-9,8E-07	1,55E-06	7,88E-06	7,17E-06	1,39E-05	7,46E-06	-2E-06	7,77E-06	0,000165	0,000368	0,000365	0,000144	0,001101	0,007961	0,008855	0,038495	0,004208	0,000331	0,000107	0,000176
2,61E-06	3,33E-06	1,03E-05	6,27E-06	1,26E-05	1,01E-05	-4,6E-06	7,6E-06	0,000156	0,000361	0,000361	0,000146	0,00089	0,008031	0,007751	0,039342	0,00434	0,000323	9,96E-05	0,000162
-2,1E-06	8,79E-07	6,87E-06	4,63E-06	8,33E-06	8,46E-06	-4,7E-06	9,23E-06	0,000174	0,000535	0,000488	0,000144	0,000962	0,007992	0,008311	0,037244	0,004413	0,00033	8,42E-05	0,000157

5,56	5,6	5,64	5,68	5,72	5,76	5,8	5,84	5,88	5,92	5,96	6	6,04	6,08	6,12	6,16	6,2	6,24	6,28	6,32
0,000295	0,000162	0,000134	0,000119	0,000136	0,000137	0,000152	6,95E-05	2,27E-05	2,65E-06	2,49E-06	6,46E-06	8,38E-06	-1,4E-06	-1,8E-05	-7,7E-06	-5,7E-06	-1,5E-06	-2,3E-08	-2,6E-06
0,00013	1,92E-05	-4,5E-06	-1,1E-05	-7,9E-06	-1,3E-05	-2E-05	-1,6E-05	-1,8E-05	-1,1E-05	-8,4E-06	6,07E-06	9,66E-06	-3,4E-06	-1,9E-05	-1,2E-05	-7,4E-06	-6,5E-06	-5,1E-06	-5,4E-06
0,000529	0,000356	0,000279	0,000231	0,0002	0,000171	0,000146	0,000139	0,000137	0,00013	0,000127	0,000127	0,0001	6,59E-05	4,37E-05	3,41E-05	2,75E-05	2,38E-05	2,04E-05	1,48E-05
0,000139	2,3E-05	5,53E-06	-4,2E-06	7,33E-07	-7,6E-06	-1,6E-05	-1,1E-05	-1,2E-05	-9,5E-06	-4,5E-06	1,82E-06	4,32E-06	-2E-07	-1,7E-05	-1E-05	-1,1E-05	-3,4E-06	-3,7E-06	-5,4E-06
0,00016	4,77E-05	1,37E-05	7,28E-06	1,92E-06	-7,6E-06	-1,5E-05	-1,5E-05	-8,4E-06	-9,7E-06	-4,9E-06	4,35E-06	4,44E-06	-4,9E-06	-1,6E-05	-1,1E-05	-6,5E-06	-5,4E-06	-5,2E-06	-7,3E-06
0,000229	0,000102	7,44E-05	5,54E-05	5,45E-05	3,97E-05	2,09E-05	1,92E-05	1,41E-05	1,49E-05	1,58E-05	2,05E-05	2,58E-05	1,47E-05	-1,1E-05	-3,5E-06	-4,2E-06	-2E-06	-1,1E-06	2,55E-08
0,000127	1,15E-05	4,28E-07	-7,1E-06	-6,5E-07	-1,1E-05	-2E-05	-1,5E-05	-1,5E-05	-1E-05	-5,1E-06	1,08E-06	5,53E-06	2,97E-07	-1,9E-05	-8E-06	-7E-06	-6,8E-06	-5,4E-06	-5,4E-06
0,00015	3,65E-05	1,86E-05	8,12E-06	1E-05	2,44E-07	-1,3E-05	-1,2E-05	-7,5E-06	-4,2E-06	2,87E-06	9,01E-06	9,39E-06	2,59E-07	-1,9E-05	-1E-05	-9E-06	-2,9E-06	-2,6E-06	-3,8E-06
0,00016	4,36E-05	3,3E-05	1,09E-05	2,03E-05	9,88E-06	2,79E-06	6,13E-06	6,62E-06	1,13E-05	1,11E-05	1,07E-05	1,29E-05	8,96E-06	-1,2E-05	2,01E-06	2,72E-06	6,24E-06	4,01E-06	-9,8E-07
0,000114	-6E-07	-1,5E-05	-2,4E-05	-1,5E-05	-2E-05	-2,8E-05	-2,2E-05	-2,1E-05	-2E-05	-1,5E-05	-5,2E-06	-1,9E-06	-1,2E-05	-3E-05	-1,9E-05	-1,7E-05	-1,5E-05	-1,6E-05	-2E-05
0,000182	6,52E-05	2,02E-05	1,33E-05	5,85E-06	-6,3E-07	-1E-05	-1,1E-05	-8,4E-06	-4,3E-06	5,29E-07	1,17E-05	1,26E-05	1,16E-06	-1,1E-05	-9,7E-06	-6E-06	-9E-07	-9,9E-07	-2E-06
0,000131	1,95E-05	-6E-07	-1,4E-05	-3,3E-06	-4,4E-06	-2E-05	-1,8E-05	-1,3E-05	-1,1E-05	-1,2E-05	-5,1E-06	6,15E-06	-4,5E-06	-2,3E-05	-1,3E-05	-1,1E-05	-1,3E-05	-9,2E-06	-5,5E-06
0,00014	2,2E-05	9,15E-06	-1,4E-06	4,38E-06	-1,4E-06	-1,4E-05	-1E-05	-1,1E-05	-4,9E-06	-3E-06	2,49E-06	8,55E-06	3,66E-06	-1,7E-05	-7,4E-06	-5,6E-06	-3,4E-06	-3,3E-06	-6,2E-06
0,00015	3,05E-05	7,12E-06	-9,5E-07	4,75E-06	1,02E-07	-1,1E-05	-9,4E-06	-1,1E-05	-6,9E-06	-2,8E-06	7,96E-06	1,33E-05	3,1E-06	-1,8E-05	-8,4E-06	-7,3E-06	-5E-06	-3,5E-06	-2E-06
0,000143	2,35E-05	9,12E-06	-3,6E-06	5,85E-06	-1,1E-06	-1,3E-05	-8,9E-06	-8,7E-06	-5,6E-06	-5,6E-07	4,47E-06	8,9E-06	2,94E-06	-1,8E-05	-6,9E-06	-5,8E-06	-4E-06	-2,2E-06	-3,4E-06
0,000146	2,21E-05	1,45E-05	-3E-06	7,51E-06	-5,7E-06	-1,3E-05	-5,8E-06	-9,6E-06	-9,8E-06	-4,3E-06	2,67E-06	5,46E-06	-3,8E-06	-2,1E-05	-5,1E-06	-6,8E-06	-7,3E-06	-7E-06	-5,5E-06
0,00015	2,56E-05	1,46E-05	-2,4E-06	8,75E-06	-3,4E-06	-1,1E-05	-6,7E-06	-7E-06	-5,5E-06	-2E-06	1,81E-06	2,41E-06	9,97E-07	-2,1E-05	-3,3E-06	-6,7E-06	-2,3E-06	-2,9E-06	-5,1E-06
0,000146	2,16E-05	9,46E-06	-9,2E-06	4,82E-06	-6E-06	-1,3E-05	-7,4E-06	-1,1E-05	-7,3E-06	-3,7E-06	8,11E-07	2,49E-06	-3,1E-06	-2,2E-05	-6,2E-06	-7,1E-06	-4,4E-06	-3E-06	-5,3E-06
0,000155	3,27E-05	1,68E-05	4,06E-07	1,04E-05	-4,2E-07	-8,1E-06	-2,5E-06	-6,2E-06	-3,3E-06	6,01E-07	6,06E-06	7,94E-06	3,61E-06	-1,7E-05	-3,1E-06	-5,3E-06	-4,1E-06	-2,4E-06	-5,8E-06
0,000155	2,65E-05	8,47E-06	-4E-07	2,46E-06	-6,6E-06	-1,8E-05	-1,1E-05	-1,2E-05	-9,6E-06	-6,4E-06	-1,1E-09	1,08E-06	-2,5E-06	-2,1E-05	-1E-05	-7,9E-06	-6,5E-06	-4,4E-06	-4,7E-06
0,000144	1,85E-05	6,67E-06	-9,9E-07	6,06E-07	-8,7E-06	-1,7E-05	-1,3E-05	-1,2E-05	-1E-05	-5,1E-06	-1,4E-06	1,71E-06	-2,7E-06	-2,1E-05	-1,1E-05	-8,4E-06	-6,3E-06	-7,3E-06	-7,1E-06
0,000168	4,05E-05	2,3E-05	2,63E-06	1,49E-05	1,73E-06	-5,1E-06	-8,8E-07	-3,1E-06	-8,2E-07	1,67E-06	6,84E-06	7,61E-06	2,99E-06	-1,7E-05	-2E-06	-5,6E-06	-2,8E-06	-1,1E-06	-4E-06
0,000175	3,99E-05	1,68E-05	8,41E-07	4,66E-06	-4,3E-06	-1,8E-05	-1,2E-05	-1,2E-05	-8,2E-06	-9,9E-07	5,28E-06	4,25E-06	-1,8E-07	-1,7E-05	-8,1E-06	-7,7E-06	-3,6E-06	-1E-06	-1,3E-06
0,000141	2,11E-05	1,49E-06	-9,1E-06	-1,1E-07	-6,5E-06	-1,5E-05	-9,1E-06	-9E-06	-5,8E-06	-2,4E-06	1,88E-06	4,52E-06	-3,3E-06	-2,1E-05	-1,2E-05	-9,8E-06	-4,4E-06	-2,2E-06	-1,4E-06
0,000203	6,89E-05	3,82E-05	2,69E-05	2,31E-05	1,45E-05	6,82E-06	6,94E-06	9,29E-06	8,75E-06	5,68E-06	3,46E-06	6,32E-06	-1,3E-06	-1,9E-05	-1,7E-05	-1,6E-05	-1,4E-05	-1,3E-05	-1,3E-05
0,000147	3,19E-05	2,8E-06	-9,4E-06	-4,9E-06	-1,1E-05	-2E-05	-1,9E-05	-1,7E-05	-1,2E-05	-7E-06	8,2E-06	8,12E-06	-6,5E-06	-2,2E-05	-1,5E-05	-1E-05	-8,4E-06	-6,9E-06	-6,2E-06
0,000167	4,16E-05	1,76E-05	3,78E-06	5,8E-06	4,64E-06	-5,9E-06	-9E-06	-7,3E-06	-6,3E-06	3,53E-06	1,7E-05	1,83E-05	2,11E-06	-1,6E-05	-4,4E-06	-3,9E-06	-7E-06	-3,2E-06	-6,1E-06
0,000209	8,64E-05	5,03E-05	3,43E-05	2,38E-05	1,16E-05	7,26E-07	3,4E-07	-5,8E-07	4,77E-07	3,45E-06	8,7E-06	8,59E-06	-2,5E-07	-1,1E-05	-8,6E-06	-6,2E-06	-4,4E-06	-2,8E-06	-3,1E-06
0,000129	1,08E-05	-1,1E-05	-2,1E-05	-1,6E-05	-1,8E-05	-3,1E-05	-3,1E-05	-2,9E-05	-1,8E-05	-1,2E-05	-7,2E-06	-9,6E-06	-1,9E-05	-3E-05	-1,3E-05	-1E-05	-1,4E-05	-1,3E-05	-9,1E-06
0,000409	0,000227	0,000155	0,000111	8,98E-05	6,95E-05	4,48E-05	3,07E-05	2,59E-05	2,24E-05	2,14E-05	2,11E-05	1,54E-05	-6,5E-06	-2,8E-05	-2,7E-05	-2,9E-05	-3,1E-05	-3,2E-05	-3,5E-05
0,000152	2,94E-05	3,01E-06	9,95E-07	-2,6E-07	-7,1E-06	-1,7E-05	-1,8E-05	-1,4E-05	-9,5E-06	-2,9E-06	4,16E-06	7,03E-06	-3,4E-06	-1,6E-05	-1,3E-05	-8E-06	-6,2E-06	-6E-06	-5E-06
0,00015	3,01E-05	9,06E-06	-1,1E-06	7,15E-06	-1E-06	-1,2E-05	-7,3E-06	-8,6E-06	-4,9E-06	-4E-08	9,73E-06	1,27E-05	1,62E-06	-1,7E-05	-5,4E-06	-5,5E-06	-3,7E-06	-5,3E-06	-4,5E-06
0,000152	2,84E-05	1,15E-05	-1,3E-06	7,08E-06	-3,4E-06	-1,5E-05	-7,8E-06	-8,9E-06	-5,2E-06	-1,3E-06	5,5E-06	7,54E-06	2,28E-06	-1,7E-05	-7,1E-06	-5,8E-06	-4,3E-06	-4,8E-06	-3,6E-06
0,000177	4E-05	9,85E-06	2,25E-06	-2,9E-06	-6,4E-06	-1,7E-05	-2E-05	-1,5E-05	-1,1E-05	-6,8E-06	2,78E-06	8,38E-06	-5,8E-06	-1,9E-05	-1,8E-05	-9,9E-06	-8,2E-06	-9,1E-06	-5,3E-06
0,00017	4,62E-05	2,06E-05	1,53E-05	1,9E-05	8,97E-06	-1,5E-06	1,4E-06	8,87E-08	1,02E-06	8,11E-06	8,73E-06	9,34E-06	3,45E-06	-1,4E-05	-2,9E-06	-3E-06	6,14E-07	8,08E-07	-2,5E-06
0,0002	7,41E-05	4,13E-05	2,72E-05	2,48E-05	1,49E-05	5,59E-06	3,89E-06	1,06E-06	-2,1E-06	-3E-06	3,61E-06	1,45E-06	-1,3E-05	-2,7E-05	-2,1E-05	-1,7E-05	-1,6E-05	-1,4E-05	-1,3E-05
0,000124	2,83E-06	-1,5E-05	-1,6E-05	-1,6E-05	-2,1E-05	-2,9E-05	-2,8E-05	-2,2E-05	-1,9E-05	-1,4E-05	-6,5E-06	-2,8E-06	-1,2E-05	-2,6E-05	-1,8E-05	-1,4E-05	-1,3E-05	-1,3E-05	-1,3E-05
0,000164	3,62E-05	1,92E-05	1,04E-06	1,37E-05	1,55E-06	-8,8E-06	-3E-06	-4,4E-06	-2,7E-06	7,57E-07	7,01E-06	1,01E-05	1,05E-07	-1,9E-05	-2,8E-06	-5,2E-06	-3,5E-06	-1,7E-06	-4,1E-06
0,000163	3,7E-05	1,96E-05	1,99E-06	1,26E-05	9,4E-07	-7,2E-06	-2E-06	-4,9E-06	-2,4E-06	-2,2E-07	5,22E-06	9,14E-06	1,66E-06	-1,9E-05	-3,1E-06	-4,7E-06	-2,1E-06	-1,9E-06	-4,9E-06
0,000152	2,96E-05	1,26E-05	-4,1E-06	8,1E-06	2,79E-07	-8,5E-06	-4,1E-06	-9,1E-06	-9,2E-06	-3,6E-06	3,85E-06	7,02E-06	2,89E-06	-2E-05	-9,2E-06	-1,1E-05	-4,7E-06	-1,7E-06	-2,9E-06

6,36	6,4	6,44	6,48	6,52	6,56	6,6	6,64	6,68	6,72	6,76	6,8
-3,7E-06	-1,3E-05	-1,1E-05	-4,7E-06	-3,8E-06	1,64E-06	2,74E-07	-5,6E-06	-8,2E-06	-8,1E-06	-2,3E-08	3,08E-06
-3,8E-06	-1,1E-05	-1,4E-05	-6,4E-06	-6,9E-06	9,16E-07	5,08E-06	6,89E-08	-4,5E-06	-5,4E-06	9,68E-07	6,11E-06
9,02E-06	2,44E-06	-4,8E-06	-1,6E-05	-2,7E-05	-2,1E-05	-1,8E-05	-2,4E-05	-2,1E-05	-1,9E-05	-1,4E-05	-1,1E-05
-4,3E-06	-8,9E-06	-1,5E-05	-6,7E-06	-7,4E-06	-2,2E-06	-2,5E-06	-1,4E-06	-4,8E-06	-6,9E-06	-2,3E-06	7,5E-06
-8,3E-06	-8,1E-06	-1,1E-05	-9,3E-06	-7,7E-06	-2E-06	-1,3E-06	-5,3E-06	-8,7E-06	-6,9E-06	-1,4E-06	9,53E-07
-5,4E-08	-8,1E-06	-1E-05	-9,9E-07	-5,3E-06	1,35E-06	3,92E-06	1,71E-06	-2,3E-06	-5,1E-06	2,62E-06	5,1E-06
-4E-06	-1,2E-05	-1,3E-05	-3,7E-06	-7,4E-06	-3,2E-06	-8,7E-07	-2,7E-06	-5,9E-06	-6,6E-06	-4,4E-07	3,55E-06
-5,3E-06	-1,6E-05	-1,8E-05	-1E-05	-9,3E-06	-2,9E-06	-8,7E-07	-3,3E-06	-9,4E-06	-9,1E-06	-4,2E-06	1,49E-07
2,74E-06	-1,1E-05	-9,8E-06	-2,4E-07	1,98E-07	6,23E-06	4,67E-06	1,57E-06	-3,4E-06	-8E-06	3,13E-07	4,63E-06
-1,8E-05	-2,6E-05	-2,3E-05	-1,3E-05	-1,5E-05	-5,3E-06	-3,9E-06	-9,1E-06	-1,1E-05	-9,8E-06	-4,6E-06	-1,3E-06
-2,5E-06	-7,4E-06	-1,1E-05	-5,5E-06	-3,8E-06	2,71E-06	4,86E-06	1,37E-07	-4,4E-06	-5,4E-06	-4,4E-07	-3,8E-07
-6,6E-06	-1,8E-05	-1,7E-05	-4,6E-06	-1,3E-05	-5,9E-06	1,22E-06	-8,5E-07	-1,1E-05	-7,2E-06	2,04E-06	5,74E-06
-2,3E-06	-9,4E-06	-1,2E-05	-5E-06	-6,7E-06	-1,8E-06	1,28E-06	-1,5E-06	-3,2E-06	-3,9E-06	1,13E-06	5,51E-06
-8,4E-07	-9E-06	-1,2E-05	-2,7E-06	-6E-06	4,42E-06	5,31E-06	2,43E-06	-5,5E-06	-6,2E-06	1,38E-06	7,31E-06
-9,9E-07	-9,3E-06	-1,3E-05	-2,2E-06	-5E-06	-1,5E-06	-1,4E-06	-4,6E-06	-5,3E-06	-6,8E-06	-9,5E-07	-4,6E-07
-1,2E-06	-1,5E-05	-1,4E-05	-4,3E-06	-6,7E-06	-2,9E-06	-2,7E-06	-1,7E-06	-3,6E-06	-6,9E-06	-1,3E-06	2,42E-06
-3,2E-06	-1,1E-05	-1,2E-05	-3,5E-06	-7,6E-06	-1,2E-06	3,72E-07	-1E-06	-4,6E-06	-7,3E-06	-2,1E-07	3,7E-06
-3,7E-06	-1,4E-05	-1,1E-05	-3E-06	-5,4E-06	3,68E-07	9,32E-07	-3E-06	-6,3E-06	-6,9E-06	-3E-06	-2,4E-06
-2,3E-06	-9,8E-06	-1,4E-05	-2,7E-06	-3,9E-06	1,54E-06	2,39E-06	4,06E-07	-5,4E-06	-6E-06	3,86E-06	3,54E-06
-4,2E-06	-1E-05	-1,5E-05	-4E-06	-7,4E-06	-2,5E-06	-1,2E-06	-5,2E-07	-4,1E-06	-4,9E-06	-2,2E-06	1,73E-06
-6,1E-06	-1,2E-05	-1,3E-05	-4,1E-06	-7,7E-06	-5,2E-06	-2,3E-06	1,93E-06	-5,1E-06	-4,2E-06	2,92E-06	8,29E-06
-3,4E-07	-1,2E-05	-1,1E-05	-2,2E-06	-6,2E-06	5,02E-06	6E-06	-2,9E-07	-4,5E-06	-6,7E-06	3,07E-06	4,49E-06
1,2E-06	-7,7E-06	-1,4E-05	-3,1E-06	-8E-06	-2,8E-06	-1,7E-06	-3,4E-06	-9,3E-06	-9,3E-06	-7,7E-07	5,18E-06
3,73E-08	-9,9E-06	-1,5E-05	-6,4E-06	-1,1E-05	-3,3E-06	-6,4E-07	-4,2E-06	-2,7E-06	-3,7E-06	-3,4E-07	1,52E-08
-1,3E-05	-1,8E-05	-2,1E-05	-1,4E-05	-1,4E-05	-1,1E-05	-8E-06	-2,4E-06	-9,3E-06	-1,2E-05	-4,1E-08	6,64E-06
-5,5E-06	-1,3E-05	-1,7E-05	-6,3E-06	-8,9E-06	1,87E-06	4,61E-06	-2,5E-06	-7,4E-06	-7,3E-06	-1,1E-06	2,52E-06
-5E-06	-1,1E-05	-1,4E-05	-3E-06	-4E-06	4,16E-06	9,76E-06	7,05E-06	-3E-06	-4E-06	1,13E-05	1,72E-05
-5,3E-06	-8,3E-06	-9,6E-06	-4,1E-06	-6,6E-06	-2,5E-06	-6,8E-07	-3,4E-06	-6,2E-06	-7,7E-06	-2,9E-06	-2,1E-06
-6,8E-06	-1,5E-05	-1,5E-05	-4,7E-06	-7,3E-06	-6,1E-06	-8,4E-06	-1E-05	-8,2E-06	-7,1E-06	-7,7E-06	-1E-05
-3,5E-05	-4,9E-05	-5,3E-05	-6,6E-05	-7E-05	-6,5E-05	-6E-05	-5,9E-05	-6,2E-05	-5,9E-05	-5E-05	-4,8E-05
-3,9E-06	-1,1E-05	-1,2E-05	-8,1E-06	-6,9E-06	-3,4E-06	1,77E-06	2,1E-06	-6,7E-06	-6,3E-06	3,26E-06	1,04E-05
-1,3E-06	-1,1E-05	-1,3E-05	-3,5E-06	-6,2E-06	4,36E-06	7,15E-06	8,24E-07	-4,7E-06	-5,4E-06	5,33E-06	8,15E-06
-4,1E-07	-1,1E-05	-8,6E-06	-3,7E-06	-5,8E-06	2,53E-07	3,67E-07	-4,9E-07	-4,5E-06	-4,1E-06	5,04E-06	9,7E-06
-7,7E-06	-1,4E-05	-1,9E-05	-5,5E-06	-7E-06	-5,6E-06	-2E-06	-3,2E-06	-7,9E-06	-9,4E-06	-7,8E-07	2,8E-06
-2,8E-06	-1E-05	-1,1E-05	-2E-06	-6E-06	-2,5E-06	9,35E-07	-2,2E-07	-4,9E-06	-4,4E-06	-1,4E-06	1,56E-06
-1,3E-05	-2E-05	-2,3E-05	-1,5E-05	-1,3E-05	-9E-06	-3,1E-06	-7,8E-06	-1,3E-05	-1,5E-05	-5E-06	-5,6E-07
-8,4E-06	-1,3E-05	-1,6E-05	-9E-06	-9,9E-06	-6,2E-06	-2,4E-07	4,18E-07	-5,3E-06	-5,4E-06	3,48E-06	1,09E-05
-2,7E-06	-1,3E-05	-1,2E-05	-3,1E-06	-6,4E-06	1,13E-06	6,11E-07	-3E-06	-5,9E-06	-7,5E-06	1,47E-06	1,58E-06
-1,6E-06	-1,1E-05	-1,1E-05	-1,7E-06	-5,7E-06	1,42E-06	1,65E-06	-2,5E-06	-4,8E-06	-5,8E-06	7,4E-08	6,27E-07
-2,3E-06	-1,3E-05	-1,6E-05	-5,3E-06	-5,3E-06	2,69E-07	9,17E-07	-3,9E-06	-9,5E-06	-9,9E-06	3,73E-07	6,33E-06