

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

ESTUDO DE CURVA DE GANHO DE PESO COMO
PARÂMETRO DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO DE
RATAS EXPOSTAS AO FUNGICIDA FENARIMOL

COPMA - EMBRAPA

Lia Hanna Martins MORITA
Carlos Alberto Ribeiro DINIZ
Vera Lúcia S.S. CASTRO

Um realceado estudo sobre o efeito do fenarimol
sobre rata exposta a dose № 34 de fungicida, durante
120 dias. As técnicas utilizadas para avaliar os efeitos

RELATÓRIO TÉCNICO
DO
DEPARTAMENTO DE ESTATÍSTICA

D E s

Série B: APLICAÇÕES

ESTUDO DE CURVA DE GANHO DE PESO COMO
PARÂMETRO DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO DE
RATAS EXPOSTAS AO FUNGICIDA FENARIMOL

Lia Hanna Martins MORITA
Carlos Alberto Ribeiro DINIZ
Vera Lúcia S.S. CASTRO

Nº 34

O Relatório Técnico do Departamento de Estatística é uma publicação sob a responsabilidade do Conselho do Departamento de Estatística - UFSCar.

JUNHO/2004

**Estudo de Curva de Ganho de Peso como Parâmetro do
Desenvolvimento Físico de Ratas Expostas ao Fungicida
Fenarimol**

Lia Hanna Martins MORITA
Carlos Alberto Ribeiro DINIZ
DEs – UFSCar

Vera Lucia S. S. CASTRO
CNPMA - EMBRAPA

RESUMO: Foram realizados estudos sobre o efeito do fenarimol no ganho de peso de ratas Wistar expostas a doses distintas do fungicida, durante períodos distintos de prenhez. As técnicas utilizadas para avaliar os efeitos dos fatores (fase de prenhez e dose do fungicida) e de suas interações na resposta foram Modelo de Medidas Repetidas, LSD (Least Squares Difference) e técnicas de comparações múltiplas.

Palavras-Chave: Fenarimol, Experimento com Medidas Repetidas, LSD.

1 – Introdução

A contaminação ambiental por agroquímicos causa efeitos negativos aos recursos naturais, à saúde humana, além de trazer problemas para a exploração agrícola; fato que leva a preocupação quanto a seu impacto na saúde humana e na qualidade ambiental. Esta avaliação é realizada quanto à saúde ambiental, identificando órgãos ou sistemas afetados que podem levar a enfermidades e desequilíbrios e estabelecendo as condições de exposição e dose ao agroquímico que levam ao dano ou enfermidade. A exposição humana aos agroquímicos, seja através de exposição ambiental ou ocupacional, pode ocasionar patologias decorrentes de exposições freqüentes, inclusive em pequenas doses.

Muitos agroquímicos afetam o sistema reprodutivo e os testes sobre vários aspectos deste, incluindo gestação, parto, lactação, desmame, crescimento e desenvolvimento da prole, confirmam informações a respeito de seus efeitos (Claudio et al., 1999). Existem também evidências de que a excreção pelo leite pode alterar o desenvolvimento pós-natal, de forma tal que algumas destas alterações possam perdurar até a idade adulta (Vogel e Hagler, 1996). As avaliações cuidadosas sobre o desenvolvimento animal freqüentemente incluem, além das observações quanto ao aparecimento de sinais físicos, os aspectos referentes ao desenvolvimento neurocomportamental (Alder, 1983). Para ajudar a determinar os riscos através da exposição a substâncias químicas em humanos a USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) vem requerendo freqüentemente tipos específicos de testes toxicológicos, usualmente em ratos e camundongos. O conhecimento obtido a partir dos resultados desses testes poderá levar a melhores escolhas na prevenção do risco à saúde humana e ambiental devido ao uso destes produtos.

Entre as classes de agroquímicos que mais produziriam efeitos em longo prazo, incluindo o câncer, estão os fungicidas. Esses produtos apresentam aproximadamente 60% de risco estimado de oncogenese (NRC, 1987). O fungicida fenarimol é muito utilizado em várias culturas apesar de pouco se conhecer a respeito de seus efeitos no ambiente e na saúde animal.

Sabe-se que, de modo geral, os agroquímicos podem ocasionar prejuízos ao desenvolvimento embriofetal, provocando aborto ou deficiências na formação do feto (Nelson, 1991; Nurminen, 1995); alterações fisiológicas como alterações na modulação do sistema endócrino de animais silvestres e do ser humano além de comportamentais; uma vez que ao nascer os animais não possuem todos os sistemas fisiológicos maduros (Pohl et al., 1998). Em alguns estudos foi observado que o transporte placentário de fenarimol ocorre ao redor de 0,1% da dose administrada, embora a partir do 18º dia da prenhez sua taxa de concentração seja 1.0. A sua concentração no leite materno alcança concentrações 3 a 5 vezes daquelas encontradas no plasma materno. Após a administração de [¹⁴C] fenarimol a ratas no quinto dia de lactação aparecem altas concentrações de radioatividade no hipotalamo dos neonatos que aumentam rapidamente e decrescem mais lentamente. Essas altas concentrações do fungicida coincidem com a época do desenvolvimento do comportamento sexual, o que inibiria o aumento de receptores estrogênicos nucleares no cérebro, o que normalmente ocorre no início do período pós-natal (Hirsch et al., 1987; Vinggaard et al., 2000). Tais observações em relação ao desenvolvimento ou expressão do sistema reprodutor masculino enfatizam a importância do estudo prospectivo dos efeitos desse fungicida.

A obtenção de dados de alvos biológicos significativos poderá contribuir para o aprimoramento dos instrumentos através dos quais os riscos ao ser humano, devido aos agroquímicos, possam ser minimizados. Os testes, além de sua aplicação na identificação de efeitos prejudiciais à saúde, poderão também ter aplicação no monitoramento de populações humanas expostas a agroquímicos.

Os animais envolvidos neste experimento foram ratas fêmeas prenas, expostas durante o início da prenhez, durante o final da prenhez ou no período de lactação ao fungicida fenarimol por via subcutânea nas doses de 150 mg/kg ou 300 mg/kg respectivamente. Após a administração das doses, as ratas foram avaliadas quanto ao seu ganho de peso, durante 21 dias consecutivos. Procuramos avaliar as consequências da exposição ao fenarimol no seu ganho de peso. O ganho de peso é uma medida bastante utilizada, mesmo que grosseira, para avaliar a toxicidade dos xenobióticos.

2 – Objetivos

2.1 - Objetivos Gerais

Estudar os possíveis efeitos do fungicida fenarimol no ganho de peso de ratas expostas a doses distintas do fungicida, em períodos distintos de prenhez. As medidas de peso foram realizadas durante a prenhez das ratas.

2.2 - Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do fator fase, caracterizado pela administração de doses do fungicida nos períodos: 1-início da prenhez, 2-final da prenhez e 3-lactação, no ganho de peso.

Avaliar o efeito do fator dose, caracterizado pelos níveis: 1- salina (0,9% NaCl), 2- solução de fenarimol 150mg e 3-solução de fenarimol 300mg, no ganho de peso.

Avaliar o efeito da interação entre os fatores fase, dose e tempo no ganho de peso.

3 - Descrição do experimento

Os animais utilizados foram ratos Wistar, mantidos em condições padronizadas de luz, umidade e temperatura no biotério do CNPMA, sendo as matrizes fornecidas pelo Biotério Central da UNICAMP (Universidade de Campinas). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha autoclavada, com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de luz claro - escuro 12h/12 horas. Para o acasalamento, cada macho foi colocado em gaiolas que continham duas fêmeas cada. Essas fêmeas foram previamente examinadas e selecionadas para que estivessem nas fases de proestro/estro e tivessem ciclo estral regular. A presença de espermatozoides no lavado vaginal das ratas foi considerada como indicativa do 1º dia de

prenhez e no 15º dia de prenhez as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais.

As fêmeas foram expostas durante os primeiros 6 dias da prenhez, durante os últimos 6 dias da prenhez ou os seis primeiros dias da lactação ao Fenarimol por via subcutânea nas doses de 150 mg/kg ou 300 mg/kg respectivamente.

Os grupos testados foram:

- ConPri: grupo controle de ratas Wistar prenhes tratadas com salina (0,9% NaCl) durante os 6 primeiros dias de prenhez;
- FenPri 150: grupo teste de ratas Wistar prenhes tratadas com solução de fenarimol 150mg fracionadamente durante os 6 primeiros dias de prenhez;
- FenPri 300: grupo teste de ratas Wistar prenhes tratadas com solução de fenarimol 300mg fracionadamente durante os 6 primeiros dias de prenhez;
- ConPrf: grupo controle de ratas Wistar prenhes tratadas com salina (0,9% NaCl) durante os 6 dias finais de prenhez;
- FenPrf 150: grupo teste de ratas Wistar prenhes tratadas com solução de fenarimol 150mg fracionadamente durante os 6 dias finais de prenhez;
- FenPrf 300: grupo teste de ratas Wistar prenhes tratadas com solução de fenarimol 300mg fracionadamente durante os 6 dias finais de prenhez;
- ConLac: grupo controle de ratas Wistar prenhes tratadas com salina (0,9% NaCl) durante os 6 primeiros dias de lactação;
- FenLac 150: grupo teste de ratas Wistar prenhes tratadas com solução de fenarimol 150mg fracionadamente durante os 6 primeiros dias de lactação;
- FenLac 300: grupo teste de ratas Wistar prenhes tratadas com solução de fenarimol 300mg fracionadamente durante os 6 primeiros dias de lactação.

Foram usadas 10 fêmeas para cada grupo experimental.

4 - Metodologia Estatística

Foi utilizado o modelo de medidas repetidas no tempo, levando em conta dois fatores, caracterizados por fase e dose.

O fator fase caracteriza-se pelos períodos: 1-início da prenhez, 2- final da prenhez e 3- lactação. O fator dose caracteriza-se pelos níveis: 1- tratamento com salina (0,9% NaCl), 2- tratamento com solução de fenarimol 150 mg e 3- tratamento com solução de fenarimol 300 mg. Foram levantadas 21 medidas em 21 dias consecutivos.

4.1 - Experimentos com medidas repetidas

Experimentos com medidas repetidas envolvem um tratamento ou vários tratamentos, avaliado em diversos pontos no tempo; os efeitos dos fatores são fixados e os indivíduos constituem uma amostra aleatória. A Tabela 1 apresenta a descrição do experimento com medidas repetidas para este estudo.

Tabela 1: Experimento com Medidas Repetidas

Fase	Dose	Indivíduo	Dia 1	...	Dia 21
1	1	1	Y_{1111}	Y_{1111}	Y_{11121}
1	1	...	Y_{i111}	Y_{i111}	Y_{i1121}
1	1	10	Y_{10111}	Y_{10111}	Y_{101121}
1	2	1	Y_{1121}	Y_{1121}	Y_{11221}
1	2	...	Y_{i121}	Y_{i121}	Y_{i1221}
1	2	10	Y_{10121}	Y_{10121}	Y_{101221}
1	3	1	Y_{1131}	Y_{1131}	Y_{11321}
1	3	...	Y_{i131}	Y_{i131}	Y_{i1321}
1	3	10	Y_{10131}	Y_{10131}	Y_{101321}
2	1	1	Y_{1211}	Y_{1211}	Y_{12121}
2	1	...	Y_{i211}	Y_{i211}	Y_{i2121}
2	1	10	Y_{10211}	Y_{10211}	Y_{102121}
2	2	1	Y_{1221}	Y_{1221}	Y_{12221}
2	2	...	Y_{i221}	Y_{i221}	Y_{i2221}
2	2	10	Y_{10221}	Y_{10221}	Y_{102221}
2	3	1	Y_{1231}	Y_{1231}	Y_{12321}
2	3	...	Y_{i231}	Y_{i231}	Y_{i2321}
2	3	10	Y_{10231}	Y_{10231}	Y_{102321}
3	1	1	Y_{1311}	Y_{1311}	Y_{13121}
3	1	...	Y_{i311}	Y_{i311}	Y_{i3121}
3	1	10	Y_{10311}	Y_{10311}	Y_{103121}
3	2	1	Y_{1321}	Y_{1321}	Y_{13221}
3	2	...	Y_{i321}	Y_{i321}	Y_{i3221}
3	2	10	Y_{10321}	Y_{10321}	Y_{103221}
3	3	1	Y_{1331}	Y_{1331}	Y_{13321}
3	3	...	Y_{i331}	Y_{i331}	Y_{i3321}
3	3	10	Y_{10331}	Y_{10331}	Y_{103321}

4.2 - O Modelo

O modelo de medidas repetidas no tempo, com dois fatores, é dado por:

$$Y_{ijkl} = \mu_{...} + \rho_i + \alpha_j + \beta_k + t_l + (\alpha\beta)_{jk} + (\alpha t)_{jl} + (\beta t)_{kl} + (\alpha\beta t)_{jkl} + \varepsilon_{(ijkl)}$$

onde

$$i = 1, \dots, n; j = 1, \dots, p; k = 1, \dots, q; l = 1, \dots, r;$$

n é o número de indivíduos em estudo;

q é o número de níveis da dose;

p é o número de períodos da fase;

r é o número de medidas repetidas no tempo;

$\mu_{...}$ é a média global;

ρ_i é o efeito do i -ésimo filhote e $\rho_i \sim N(0, \sigma^2)$;

α_j é o efeito da j -ésima fase e $\sum_j \alpha_j = 0$;

β_k é o efeito da k -ésima dose e $\sum_k \beta_k = 0$;

t_l é o efeito do l -ésimo dia e $\sum_l t_l = 0$;

$(\alpha\beta)_{jk}$ é o efeito da interação j -ésima Fase \times k -ésima Dose,

$$\sum_k (\alpha\beta)_{jk} = 0, \forall k \quad \text{e} \quad \sum_j (\alpha\beta)_{jk} = 0, \forall j;$$

$(\alpha t)_{jl}$ é o efeito da interação j -ésima Fase \times l -ésimo Dia,

$$\sum_l (\alpha t)_{jl} = 0, \forall l \quad \text{e} \quad \sum_k (\alpha t)_{jl} = 0, \forall k;$$

$(\beta t)_{kl}$ é o efeito da interação k -ésima Dose \times l -ésimo Dia,

$$\sum_l (\beta t)_{kl} = 0, \forall l \quad \text{e} \quad \sum_k (\beta t)_{kl} = 0, \forall k;$$

$(\alpha\beta t)_{jkl}$ é o efeito da interação k -ésima fase \times j -ésima Dose \times l -ésimo Dia,

$$\sum_l (\alpha\beta t)_{jkl} = 0, \forall l; \quad \sum_k (\alpha\beta t)_{jkl} = 0, \forall k \quad \text{e} \quad \sum_j (\alpha\beta t)_{jkl} = 0, \forall j;$$

$\varepsilon_{(ijkl)}$ são os erros e $\varepsilon_{(ijkl)} \sim N(0, \sigma^2)$, $\varepsilon_{(ijkl)}$ i.i.d.

ρ_i e $\varepsilon_{(ijkl)}$ são independentes.

Assumimos que as observações Y_{ijkl} têm variância constante, quaisquer pares de observações de um mesmo indivíduo têm variância constante, quaisquer pares de observações de um mesmo indivíduo são independentes e as observações têm distribuição normal.

4.3 - Análise de Variância

As Tabelas 2 e 3 apresentam a análise de variância univariada (ANOVA) no experimento com medidas repetidas, com dois fatores e medidas repetidas em ambos.

Tabela 2: Análise de Variância

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio
indivíduo	n-1	SQI	QMI
Fase	p-1	SQF	QMF
Dose	q-1	SQD	QMD
Tempo	r-1	SQT	QMT
Fase × Dose	(p-1).(q-1)	SQFD	QMFD
Fase × Tempo	(p-1).(r-1)	SQFT	QMFT
Dose × Tempo	(q-1).(r-1)	SQDT	QMDT
Fase × Dose × Tempo	(p-1).(q-1).(r-1)	SQFDT	QMFDT
Erro	gl	SQE	QME

onde

$$gl = (n-1) + (p-1) + (q-1) + (r-1) + (p-1)(q-1) + (p-1)(r-1) + (q-1)(r-1) + (p-1)(q-1)(r-1);$$

$$SQI = p \cdot q \cdot r \cdot \sum_i (\bar{Y}_{i..} - \bar{Y}_{...})^2;$$

$$SQF = n \cdot q \cdot r \cdot \sum_j (\bar{Y}_{.j..} - \bar{Y}_{...})^2;$$

$$SQD = n \cdot p \cdot r \cdot \sum_k (\bar{Y}_{.k..} - \bar{Y}_{...})^2;$$

$$SQT = n \cdot p \cdot q \cdot \sum_l (\bar{Y}_{..l} - \bar{Y}_{...})^2 ;$$

$$SQFD = n \cdot r \cdot \sum_j \sum_k (\bar{Y}_{.jk.} - \bar{Y}_{.j..} - \bar{Y}_{..k.} + \bar{Y}_{...})^2 ;$$

$$SQFT = n \cdot q \cdot \sum_j \sum_l (\bar{Y}_{.j.l} - \bar{Y}_{.j..} - \bar{Y}_{..l} + \bar{Y}_{...})^2 ;$$

$$SQDT = n \cdot p \cdot \sum_k \sum_l (\bar{Y}_{..kl} - \bar{Y}_{..k.} - \bar{Y}_{...l} + \bar{Y}_{...})^2 ;$$

$$SQFDT = n \cdot \sum_j \sum_k \sum_l (\bar{Y}_{.jkl} - \bar{Y}_{.j..} - \bar{Y}_{..k.} - \bar{Y}_{...l} + \bar{Y}_{...})^2 ;$$

$$SQE = \sum_i \sum_j \sum_k \sum_l (Y_{ijkl} - \bar{Y}_{i...} - \bar{Y}_{.jkl} - \bar{Y}_{..kl} - \bar{Y}_{.jk.} - \bar{Y}_{.j.l} + \bar{Y}_{...})^2 ;$$

$$QMI = \frac{SQI}{n-1} ; QMF = \frac{SQF}{p-1} ; QMD = \frac{SQD}{q-1} ; QMT = \frac{SQT}{r-1} ; QMFD = \frac{SQFD}{(p-1)(q-1)} ;$$

$$QMFT = \frac{SQFT}{(p-1)(r-1)} ; QMDT = \frac{SQDT}{(q-1)(r-1)} ; QMFDT = \frac{SQFDT}{(p-1)(q-1)(r-1)} ; QME = \frac{SQE}{gl}$$

As hipóteses para testar o efeito da fase são dadas por:

H_0 : todos os α_j são iguais a zero versus H_a : nem todos os α_j são iguais a zero.

Se H_0 é verdadeira, a estatística $F^* = \frac{QMF}{QME}$ segue a distribuição $F[1-\alpha, p-1, gl]$.

Assim, H_0 é rejeitada se $F^* > F[1-\alpha, p-1, gl]$.

As hipóteses para testar o efeito da dose são dadas por:

H_0 : todos os β_k são iguais a zero versus H_a : nem todos os β_j são iguais a zero.

Se H_0 é verdadeira, a estatística $F^* = \frac{QMD}{QME}$ segue a distribuição $F[1-\alpha, q-1, gl]$.

Assim, H_0 é rejeitada se $F^* > F[1-\alpha, q-1, gl]$.

As hipóteses para testar o efeito do tempo são dadas por:

H_0 : todos os t_l são iguais a zero versus H_a : nem todos os t_l são iguais a zero.

Se H_0 é verdadeira, a estatística $F^* = \frac{QMT}{QME}$ segue a distribuição $F[1-\alpha, r-1, gl]$.

Assim, H_0 é rejeitada se $F^* > F[1-\alpha, r-1, gl]$.

As hipóteses para testar o efeito da interação Fase × Dose são dadas por:

H_0 : todos os $(\alpha\beta)_{jk}$ são iguais a zero versus H_a : nem todos os $(\alpha\beta)_{jk}$ são iguais a zero. Se H_0 é verdadeira, a estatística $F^* = \frac{QMF_D}{QME}$ segue a distribuição $F[1-\alpha, (p-1).(q-1), gl]$. Assim, H_0 é rejeitada se $F^* > F[1-\alpha, (p-1).(q-1), gl]$.

As hipóteses para testar o efeito da interação Fase × Tempo são dadas por:

H_0 : todos os $(\alpha t)_{jl}$ são iguais a zero versus H_a : nem todos os $(\alpha t)_{jl}$ são iguais a zero. Se H_0 é verdadeira, a estatística $F^* = \frac{QMF_T}{QME}$ segue a distribuição $F[1-\alpha, (p-1).(r-1), gl]$. Assim, H_0 é rejeitada se $F^* > F[1-\alpha, (p-1).(r-1), gl]$.

As hipóteses para testar o efeito da interação Dose × Tempo são dadas por:

H_0 : todos os $(\beta t)_{kl}$ são iguais a zero versus H_a : nem todos os $(\beta t)_{kl}$ são iguais a zero. Se H_0 é verdadeira, a estatística $F^* = \frac{QMDT}{QME}$ segue a distribuição $F[1-\alpha, (q-1).(r-1), gl]$. Assim, H_0 é rejeitada se $F^* > F[1-\alpha, (q-1).(r-1), gl]$.

As hipóteses para testar o efeito da interação Fase × Dose × Tempo são dadas por:

H_0 : todos os $(\alpha\beta t)_{jkl}$ são iguais a zero versus H_a : nem todos os $(\alpha\beta t)_{jkl}$ são iguais a zero. Se H_0 é verdadeira, a estatística $F^* = \frac{QMFDT}{QME}$ segue a distribuição $F[1-\alpha, (p-1).(q-1).(r-1), gl]$. Assim, H_0 é rejeitada se $F^* > F[1-\alpha, (p-1).(q-1).(r-1), gl]$.

5 - Resultados

Na obtenção de verificações gráficas e formais, foram retirados dois “outliers”:

- uma rata do grupo de ratas tratadas com salina (0.9 % NaCl) no início da prenhez, devido ao decaimento brusco do peso no último dia de observação.
- uma rata do grupo de ratas tratadas com solução de fenarimol 150 mg no início da prenhez, devido ao decaimento e posterior recuperação bruscos do peso em torno do 9º dia de observação.

5.1 - Verificações Gráficas

A Figura 1 mostra as curvas das médias dos pesos, por dose de fenarimol e a Figura 2 mostra as curvas das médias dos pesos, por fase das ratas.

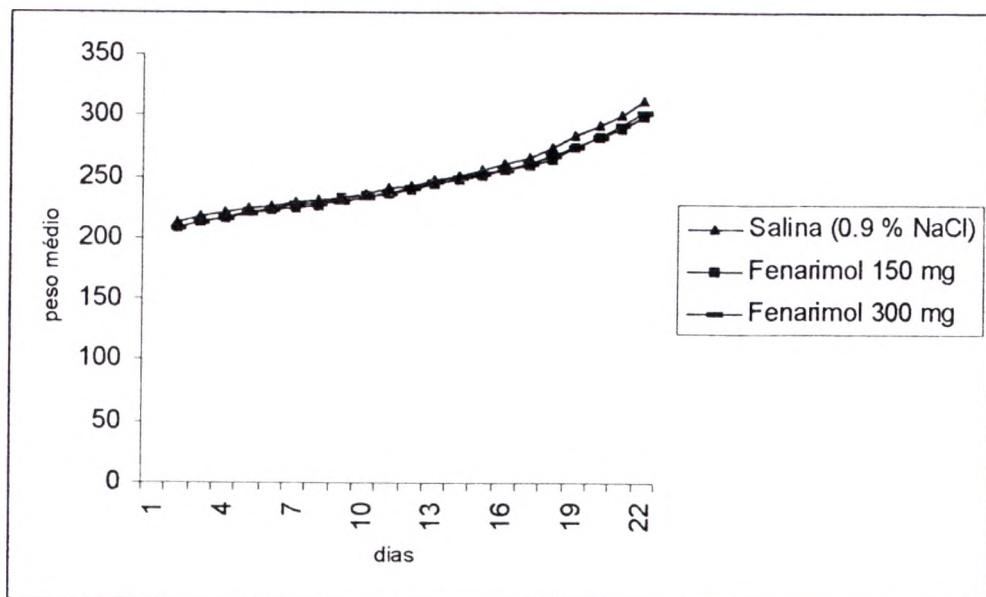


Figura 1: Médias dos Pesos por Dose

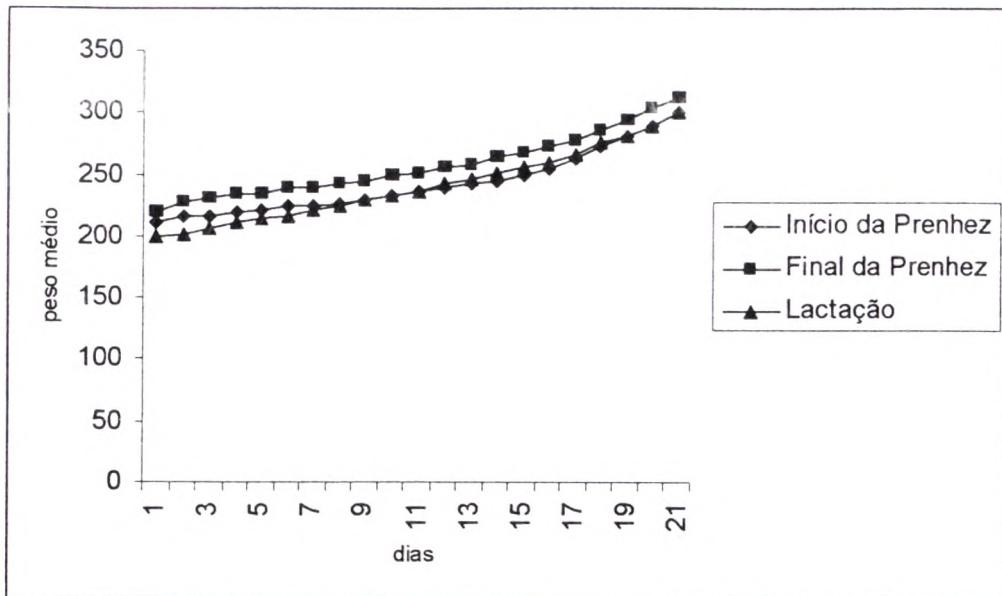


Figura 2: Médias dos Pesos por Fase

Das curvas dos pesos médios, percebemos claramente que o fator tempo influencia no ganho de peso das ratas nos 21 dias de observação.

Observamos na Figura 1 que, aparentemente, o fator dose não interfere no ganho de peso das ratas, pois as curvas não diferem entre si.

Observamos na Figura 2 que o fator fase interfere no ganho de peso das ratas. O maior ganho médio de peso ocorreu no grupo de ratas expostas ao tratamento no final da prenhez. O menor ganho médio de peso ocorreu no grupo de ratas expostas ao tratamento no período de lactação.

5.2 - Verificações Formais

5.2.1 - Análise de Variância

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos no SAS do teste de hipóteses para testar os efeitos do tempo, da interação entre fase e tempo, da interação entre dose e tempo e da interação entre fase, dose e tempo dentro dos grupos de tratamento.

Tabela 3: Teste de hipóteses para testar os efeitos dentro de grupos de tratamento

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	valor-p
Tempo	20	1262354.189	63117.709	581.03	0.0001
Fase × Tempo	40	12126.152	303.154	2.79	0.0001
Dose × Tempo	40	4277.863	106.947	0.98	0.499
Fase × Dose × Tempo	80	9952.380	124.405	1.15	0.184
erro	1580	171636.730	108.631		
Total	1760				

Pela Tabela 3, verificamos que os efeitos da interação Dose × Tempo e da interação Fase × Dose × Tempo não são significantes dentro dos grupos de tratamento ($p=0.499$ e $p=0.184$, respectivamente). Porém os efeitos do Tempo e da interação Fase × Tempo são significantes ($p=0.0001$). Tendo verificado os efeitos destas interações, é inviável, estatisticamente, verificar os efeitos dos fatores independentemente.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos no SAS do teste de hipóteses para testar os efeitos da fase, da dose e da interação entre fase e dose entre grupos de tratamento.

Tabela 4: Teste de hipóteses para testar os efeitos entre grupos de tratamento

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	valor-p
Fase	2	101211.519	50605.76	5.15	0.008
Dose	2	9476.77	4738.385	0.48	0.619
Fase × Dose	4	51902.995	12975.749	1.32	0.269
erro	79	775999.585	9822.78		
Total	87				

Pela Tabela 4, verificamos que o efeito da dose entre grupos de tratamento não é significante ($p=0.619$).

5.2.2 - Comparações múltiplas

Tendo verificado a significância na interação Fase \times Tempo, o próximo passo é tentar detectar quais períodos da fase determinaram a significância desta interação. Para isto, usaremos o método LSD (Least Square Differences).

Sejam μ_{jkl} e $\mu_{j'kl}$, ($j \neq j'$) as médias dos pesos de ratas expostas em fases j e j' , respectivamente, mantendo dose fixado no nível k e tempo fixado no dia l .

O método LSD é determinado por:

$$\mu_{jkl} - \mu_{j'kl} \leq \sqrt{\frac{2E}{p \cdot n}} \cdot t_{(\alpha/2, gl)}$$

onde $j, j' = 1, \dots, p$; $k = 1, \dots, q$; $l = 1, \dots, r$;

E é o erro quadrático médio dos efeitos nos indivíduos;

$t_{(\alpha/2, gl)}$ é o quantil da distribuição t de Student com gl graus de liberdade;

gl é o número de graus de liberdade de E ;

p é o número de períodos da fase;

n é o número de ratas expostas durante os períodos: 1- início da prenhez, 2-final da prenhez ou 3-lactação.

As médias μ_{jkl} e $\mu_{j'kl}$ cuja diferença é menor do que a expressão

$\sqrt{\frac{2E}{p \cdot n}} \cdot t_{(\alpha/2, gl)}$ são consideradas estatisticamente similares e as médias μ_{jkl} e

$\mu_{j'kl}$ cuja diferença é maior do que a expressão $\sqrt{\frac{2E}{p \cdot n}} \cdot t_{(\alpha/2, gl)}$ são consideradas estatisticamente diferentes.

A Tabela 5 apresenta as diferenças de médias dos pesos das ratas expostas em fases distintas de prenhez.

As expressões $F1 - F2$, $F3 - F2$, $F3 - F1$ denotam, respectivamente, as diferenças de médias dos pesos médios:

- de ratas expostas no início da prenhez e ratas expostas no final da prenhez;
- de ratas expostas no final da prenhez e ratas expostas no período de lactação;
- de ratas expostas no início da prenhez e ratas expostas no período de lactação.

Os valores sublinhados são aqueles cujas médias envolvidas são estatisticamente diferentes, ou seja, o valor absoluto da diferença entre as

mesmas é maior do que a expressão $\sqrt{\frac{2.E}{p..n}} \cdot t_{(\alpha/2, g1)} \cong 3.048$.

Tabela 5: Diferenças de Médias

Dia	F2- F1	F3 -F2	F3- F1
1	<u>9 .31</u>	<u>20 .743</u>	<u>11 .434</u>
2	<u>12 .666</u>	<u>26 .34</u>	<u>13 .674</u>
3	<u>14 .474</u>	<u>23 .913</u>	<u>9 .439</u>
4	<u>14 .841</u>	<u>24 .013</u>	<u>9 .172</u>
5	<u>13 .065</u>	<u>21 .033</u>	<u>7 .969</u>
6	<u>13 .799</u>	<u>21 .827</u>	<u>8 .027</u>
7	<u>14 .266</u>	<u>17 .647</u>	<u>3 .381</u>
8	<u>17 .139</u>	<u>17 .763</u>	0 .625
9	<u>14 .778</u>	<u>14 .543</u>	0 .235
10	<u>16 .224</u>	<u>16 .323</u>	0 .1
11	<u>15 .149</u>	<u>14 .763</u>	0 .385
12	<u>15 .71</u>	<u>13 .667</u>	2 .044
13	<u>15 .478</u>	<u>12 .743</u>	2 .735
14	<u>19 .105</u>	<u>13 .503</u>	<u>5 .602</u>
15	<u>16 .984</u>	<u>11 .417</u>	<u>5 .567</u>
16	<u>18 .154</u>	<u>13 .023</u>	<u>5 .131</u>
17	<u>14 .381</u>	<u>10 .513</u>	<u>3 .868</u>
18	<u>12 .98</u>	<u>10 .317</u>	2 .664
19	<u>12 .281</u>	<u>12 .767</u>	0 .486
20	<u>14 .518</u>	<u>14 .097</u>	0 .422
21	<u>12 .173</u>	<u>12 .383</u>	0 .21

Observamos da Tabela 5 que as médias dos pesos das ratas expostas em fases distintas de prenhez são estatisticamente diferentes duas a duas, embora haja diferenças de médias menores que 3.048.

Observamos dos valores sublinhados que há um grande distanciamento entre as médias dos pesos de ratas expostas no final da prenhez e ratas expostas no período de lactação.

6- Conclusão

Verificamos dos resultados obtidos que há efeito do fungicida no ganho de peso das ratas.

Quantidades distintas de fenarimol não interferem no ganho de peso das ratas, ou seja, os pesos das ratas expostas na mesma fase, porém submetidas a doses distintas de fenarimol são estatisticamente similares.

Períodos distintos de exposição interferem na curva dos pesos das ratas, ou seja, o comportamento das curvas dos pesos de ratas tratadas com uma mesma dose, porém em fases distintas são estatisticamente diferentes.

A interferência no peso das ratas que possa ser devida ao fenarimol é a realizada entre os períodos início da prenhez e final da prenhez, uma vez que as ratas expostas durante a lactação não foram tratadas e portanto (ao menos teoricamente) seu peso deveria ser equivalente ao controle durante a prenhez.

7- Recomendações

Na avaliação dos pesos das ratas, foram retirados alguns outliers. Poderíamos verificar também se a variabilidade entre as curvas dos pesos foi causada exclusivamente pela administração de fenarimol, ou se existem outros fatores externos ao tratamento em estudo que interferem nesta variação.

Referências Bibliográficas

- [1] ALDER, S. Behavioral teratology in ZBINDEN, Q.; RACAGNI, G.; CUOMO, V. E WEISS, B. (1983). *Application of Behavioral Pharmacology in Toxicology*, New York, Raven Press, pp. 57-66.
- [2] AMES, R. G.; STEENLAND, K.; JENKINS, B.; CHRISLIP,D.; RUSSO, J. (1995). Chronic neurologic sequelae to cholinesterase inhibition among agricultural pesticide applicators. *Archives of Environmental Health*, 50, pp.440-444.
- [3] CASTRO, V.; SILVEIRA, M.; PEREZ, M. (1999). Application of clinical indicators of exposition in the evaluation of family agriculture health: the Sumaré case – Brazil. *International Journal of Sustainable and Development World Ecology*, 6, pp.172-184.
- [4] CLAUDIO, L.; BEARER, C.F.; WALLINGA, D. (1999). Assessment of the U.S. Environmental Protection Agency methods for identification of hazards to developing organisms, part I: The reproduction and fertility testing guidelines. *American Journal of Industrial Medicine*, 35, pp.543-553.
- [5] DER, G., EVERITT, B.S. (2002). *A Handbook of Statistical Analyses Using SAS*, 2nd ed. Boca Raton, Fla.: Chapman & Hall/CRC.
- [6] FLODSTROM, S.; HEMMING, H.; WARNGARD, L.; AHLBORG, U. (1990). Promotion of altered hepatic foci development in rat liver, cytochrome P450 enzyme induction and inhibition of cell-cell communication by DDT and some structurally related organohalogen pesticides. *Carcinogenesis*, 11, pp.1413 – 1417.
- [7] HIRSCH, K.; WEAVER, D.; BLACK, L.; FALCONE, J.; MACLUSKY, N. (1987). Inhibition of central nervous system aromatase activity: a mechanism

for Fenarimol-induced infertility in the male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 91, pp.235 – 245.

[8] KIMMEL, C. A. & MAKRIS, S.L. (2001). Recent developments in regulatory requirements for developmental toxicology. *Toxicology Letters*, 120, pp.73-82.

[9] MILLIKEN, G.A. & JONHSON, D.E. (1984). *Analysis of messy Data*. Van Nostrand Reinhold International Company Limited (Ed.), USA, 473 p.

[10] NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1987). Regulating pesticides in food. *National Academy of Science Press*, Washington, DC.

[11] NELSON, B. (1991). Evidence for behavioral teratogenicity in humans. *Journal of Applied Toxicology*, 11, pp.33-3.

[12] NETER, J. ; WASSERMAN, W. & KUTTNER, M. H. (1990). *Applied Linear Statistical Models*. R. R. DONNELLEY & SONS COMPANY (Ed.), USA, 3^a ed., 1181 p.

[13] NURMINEN, T. (1995). Maternal pesticide exposure and pregnancy outcome. *Journal of Occupational Medicine*, 37, pp.935-940.

[14] PALUT, D.; LUDWICK, J.; SZLEZAK-KOPEC, J. (1992). The influence of Fenarimol on DNA synthesis and mitotic activity in rat liver. *Journal of Applied Toxicology*, 12, pp.275 – 279.

[15] PAOLINI, M.; MESIRCA, R.; POZZETTI, L.; MAFFEI, F.; VIGAGNI, F.; HRELIA, P.; CANTELLI-FORTI, G. (1996). Genetic and non-genetic biomarkers related to carcinogenesis in evaluating toxicological risk from Fenarimol. *Mutation Research*, 368, pp.27 - 39.

[16] POHL, H.; SMITH-SIMON, C.; HICKS, H. (1998). Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels:

developmental effects. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28, pp.55-60.

[17] SOLCO, L.; DEFAZIO, G.; SCARSELLI, R.; ZEFFERINO, R.; LIVREA, P.; FOÁ, V. (1996). Toxicity of fungicides containing ethylene-bis-dithiocarbamate in serumless dissociated mesencephalic-striatal primary coculture. *Archives of Toxicology*, 70, pp.678 – 682.

[18] US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (May,10,1999). The Office of Pesticide Program's policy on determination of the appropriate FQPA safety factor(s) for use in the tolerance-setting process. <http://www.epa.gov/scipoly/sap/1999/index.htm#may>.

[19] VINGGAARD, A.; HNIDA, C.; BREINHOLT, V.; LARSEN, J. (2000). Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro, *Toxicology in Vitro*, 14, pp.227 – 234.

[20] VOGEL, G.; HAGLER, M. (1996). Effects of neonatally administered inpridole on adult behaviors of rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 55, pp.155 - 161.

[21] WINER, B.J. (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*, McGraw-Hill, Inc. (Ed.), New York, 2^a ed., 907 p.

Apêndice – Análise de Resíduos

Nesta seção foram realizadas análises gráficas dos resíduos sob o modelo de medidas repetidas para este experimento; com o objetivo de verificar se as suposições apresentadas na seção 4.2 para o modelo foram satisfeitas. A Figura 3 ilustra o gráfico probabilístico normal dos resíduos. O gráfico probabilístico normal é um critério de verificação de normalidade que consiste em comparar quantis de valores observados com quantis de uma distribuição normal. Se o gráfico estiver muito próximo de uma reta podemos afirmar que os valores observados provém de uma distribuição normal. Assim observamos que, para este experimento, os resíduos possuem comportamento bem próximo da normalidade.

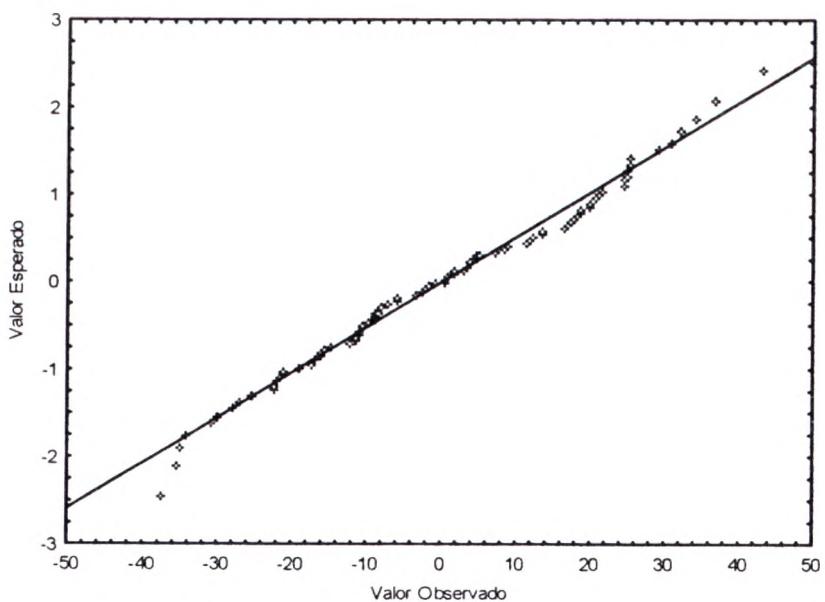


Figura 3: Gráfico Probabilístico Normal dos Resíduos

A Figura 4 ilustra o gráfico Resíduo versus Preditivo. O gráfico Resíduo versus Preditivo consiste em verificar se a esperança dos resíduos observados é zero, se os resíduos possuem estrutura homoscedástica, se existe ausência de outliers e se o modelo é adequado. Se o gráfico caracteriza-se por uma faixa

homogênea de pontos em torno do eixo x, podemos considerar satisfeitas todas as suposições acima.

Considerando a Figura 4 observamos que não existem evidências de transgressões das suposições impostas.

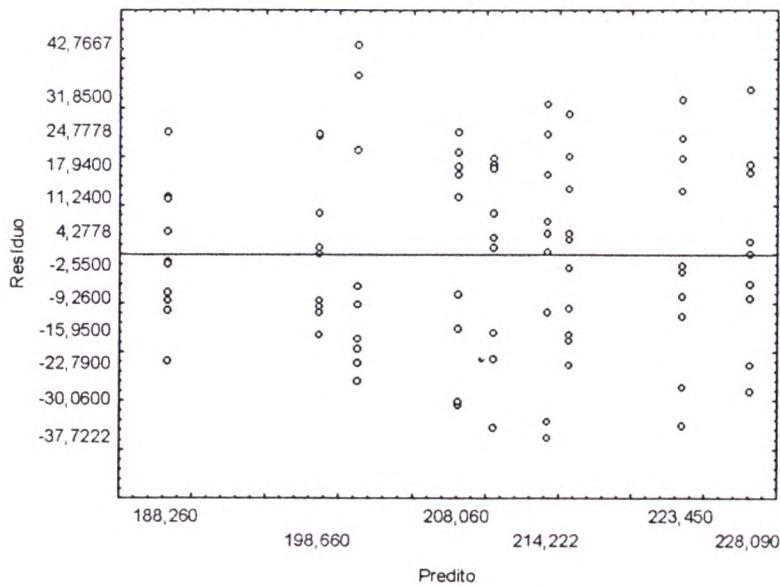


Figura 4: Resíduo versus Predito

PUBLICAÇÕES ANTERIORES

- . FERREIRA FILHO, P.; MENA, M.R.M.; ABRAMO FILHO, J. "A Decomposição da Palha, Palha + Vinhaça da Cana-de-Açúcar Após a Colheita Mecanizada". Fevereiro/95, Nº 1.
- . FERREIRA FILHO, P.; PENTEADO, M.C.; SILVA, E.; CATAI, A.M.; NAKAIE, A.S.S.F.; BELUZZO, S.S. "Estudo Sobre o Comportamento de Indivíduos Hipertensos Submetidos a Treinamento Físico". Fevereiro/95, Nº 2.
- . FERREIRA FILHO, P.; SALVINI, T.F.; MORINI, C.C. "O Efeito da Crioterapia sobre a Lesão no Músculo Soleus Produzida pelo Exercício Físico em Esteira". Junho/95, Nº 3.
- . COSTA, S.R.A.; CAMPOS, J.R.; DINIZ, C.A.R. "Adsorção do Fenol pelo Carvão Ativado Tipo TV 190-G". Julho/95, Nº 4.
- . MOURA, M.S.A.; CATURELLI, A.C.M. "Análise da Evolução da Taxa de Juros de Financiamento de Bens Duráveis - Eletrodomésticos". Março/96, Nº 5.
- . SILVA, V.; DINIZ, C.A.R. "Estudo da Viscosidade do Esmalte TV38/2". Abril/96, Nº 6.
- . TACONELI, J.P.; DINIZ, C.A.R.; SANDE, L.A.P. "Percepção de Apoios, Posições e Movimentos Corporais na Postura Sentada e Seu Registro em Vídeo". Maio/96, Nº 7.
- . MILAN, L.A.; TALAMONI, S.; ALMAS, F.; FREITAS, F. "Comparação do Uso das Distribuições Poisson e Normal na Seleção de Modelos para Explicar Número de Capturas". Junho/96, Nº 8.
- . BARRETO, M.C.; DEL PRETTE, Z.A.P.; DEL PRETTE, A. "Análise de Itens e da Estrutura Fatorial de um Inventário para Avaliação de Repertório de Habilidades Sociais". Agosto/96, Nº 9.
- . FERREIRA FILHO, P.; MORAES, J.C.; COSTA, L.C.; BASSORA, J.S.F. "Engatinhar: Um Estudo da Idade de Seu Aparecimento e Sua Correlação com a Marcha". Setembro/96, Nº 10.
- . DINIZ, C.A.R.; WATANABE, M.Y.; CURI, L.Z. "Verificação da Eficiência de Um Específico Programa de Ensino". Setembro/96, Nº 11.
- . DINIZ, C.A.R.; HIRATA, S.; ROSELLI, K.C. "Biologia de Pequenos Mamíferos em Uma Área de Cerradão". Dezembro/96, Nº 12.
- . DINIZ, C.A.R.; MAZUCHELI, J.; CARON, R.; COSTA, A.C.M. "Ecologia de Um Grupo de Micos-Leões Pretos (*L. Chrysopygus*) em Um Fragmento de Mata". Janeiro/1997, Nº 13.
- . TOMAZELLA, V.L.D.; MACHADO, H.C.; CANOTILHO, M.M. "Estudo do Efeito da Aspirina sobre o Grau de Osteopenia em Ratas Wistar Intactas e Ovariectomizadas". Abril/1997, Nº 14.
- . MILAN, L.A.; REIS, G.C.; COLNAGO, L.A.; BERNARDES FILHO, R. "Aplicação do método stepwise de seleção de variáveis na previsão da concentração de estruturas secundárias α -hélice, β -folha, β -volta e desordenada em proteínas". Julho/1997, Nº 15.
- . TOMAZELLA, V. L. D.; ROCHA, A. S.; OTUKA, E. S.; OLIVEIRA, V. L. "Estudo dos casos de câncer de mama diagnosticados na cidade de São Carlos - SP no período de 1985-1996." Novembro/1997, nº 16.
- . FERREIRA FILHO, P.; BERETA, E. M. P.; ANDRADE, S. F.; CATAI, A. M.; SILVA, E. "Adaptações da Freqüência Cardíaca e Pressão Arterial de Hipertensos Submetidos a Treinamento Físico de Baixa Intensidade e Longa Duração". Março/1998, nº 17.
- . MILAN, L.; SILVA, E.; CORDEIRO, A.; GALLO JR., L. "O Uso da Normalização da Variável Resposta e Modelos Linearizáveis para explicar a Relação entre a Freqüência Cardíaca e Atividade Mioelétrica". Março/1998, nº 18.

- . MILAN, L.; SILVA, E.; CORDEIRO, A.; GALLO JR., L. "Modelagem da Relação entre Freqüência Cardíaca e Atividade Mioelétrica Utilizando Modelos Lineares". Março/1998, nº 19.
- . DINIZ, C.A.R.; YOGUI, G.T.; RODRIGUES, S.A.; MONTEIRO, S.M.C. "Estudo do Desempenho de Pós-Larvas de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criados em redes-berçários flutuantes". Maio/1998, nº 20.
- . DINIZ, C.A.R.; HUNTER, C.F.F.; PULITANO, V.M.S.E.; SUAZO, C.A.T. "Otimização do Efeito de Algumas Variáveis Sobre a Velocidade Específica de Crescimento de Microrganismo Via Metodologia de Superfície de Resposta". Maio/1998, nº 21.
- . TOMAZELLA, V.L.D.; GARDELIM, R.J.B; LOURENÇO, G.C.D.; CARVALHO, R.L. "Estudo Comparativo Referente ao Nível de Bifurcação do Nervo Tibial e sua Possível Correlação com a Síndrome do Túnel de Tarso". Julho/1998, nº 22.
- . TOMAZELLA, V.L.D.; MORI, C.M.; ARAGÃO, F.J.O.S.; ARAGÃO, J.E.O.S. "Diagnóstico Sócio-Econômico, Educacional e Profissional dos Alunos Egressos do Curso de Administração de Empresas da ASSER (1976 a 1990)". Novembro/1998, nº 23.
- . FOGO, J.C.; DINIZ, C.A.R.; TOMAZELLA, V.L.D.; LOUZADA-NETO, F.; GOMES, O.A. "Análise Morfoquantitativa do Plexo Mientérico do Intestino Delgado de Ratos Submetidos à Desnutrição Pré e Pós Natal e a Renutrição Pós Natal". Agosto/1999, nº 24.
- . MOURA, M.S.A.; FRANCO, A.R.; CABRAL, L.F.M. "Estudo da Relação entre Poluição Atmosférica e o Número de Internações por Doenças do Aparelho Respiratório em Hospitais das Cidades da Região Canavieira de Ribeirão Preto, SP, 1998-1997". Janeiro/2000, nº 25.
- . GOMES, P.L.S., DINIZ, C.A.R. "Resolução de um Problema Envolvendo Experimentos com Misturas via Pacotes Estatísticos". Novembro/2000, nº 26.
- . BARRETO, M.C.M.; PIERRE, M.R.S.R.; DEL PRETTE, Z.A.P.; DEL PRETTE, A. "Habilidades Sociais entre Jovens Universitários: Um Estudo Comparativo". Novembro/2001, nº 27.
- . COIMBRA, R.G.; MILAN, L.A.; PINCELLI, M.P.; UBEDA, E.M.L. "Estudo da Relação Poluição Ambiental e Mortalidade no Município de São Carlos, O efeito de curto prazo". Dezembro/2001, nº 28.
- . COIMBRA, R.G.; MILAN, L.A.; PINCELLI, M.P.; UBEDA, E.M.L. "Estudo da Associação entre Mortalidade e Poluição Ambiental: efeito a longo prazo". Dezembro/2001, nº 29.
- . CORDEIRO, A.M.M.; MILAN, L.A.; CATAI, A..M. "Testando o Efeito de Treinamento Físico sobre a Freqüência Cardíaca Através de Métodos Não-Paramétricos". Agosto/2002, nº 30.
- . MORITA, L.H.M.; DINIZ, C.A.R.; CASTRO, V.L.S.S. "Estudo da Curva de Ganho de Peso como Parâmetro do Desenvolvimento Físico de Filhotes Expostos Perinatalmente ao Fungicida Fenarimol". Março/2004, nº 31.
- . SARTORELI, L.F.; RAMOS, R.; FERREIRA FILHO, P. "Índice de Bonificação de Motoristas de uma Grande Usina de Cana-de-Açúcar". Abril/2004, nº 32.
- . MARTINEZ, E.Z.; DERCAIN, S.F.M.; LOUZADA-NETO, F.; SARIAN, L. O. Z.; GONTIJO, R.C.; SYRJÄNEN, K.J. "Bayesian Estimate of Cervical Cytology, Unaided Visual Inspection with Acetic Acid and Hybrid Capture II. Performance in the Detection of Cervical Carcinoma Precursor Lesions". Abril/2004, nº 33.

