

Análise de dados longitudinais em experimentação animal

Longitudinal data analysis in animal experiments

Andressa Amorim Cestari^{1*}; Silvano Cesar da Costa²; Alessandro Pelegrine Minho³

Resumo

A análise de dados longitudinais com medidas repetidas ao longo do tempo pode ser feita de diferentes maneiras: em experimentos usando o delineamento em parcelas subdivididas, tendo o animal como parcela e o tempo como subparcela; através da análise de modelos multivariados; e ainda através do ajuste de modelos mistos, que possibilita a utilização de diferentes estruturas para a matriz de covariâncias. O principal problema envolvido na análise de medidas repetidas ao longo do tempo está relacionado à ausência de aleatorização, pois pares de mensurações feitas no tempo estão correlacionadas, o que pode invalidar os testes envolvendo o fator tempo. Para discutir as diferentes formas de análise, foram utilizados dados provenientes de um experimento em que cordeiros Santa Inês foram infectados com 6.000 L3 de *Haemochus contortus* e tratados com tanino condensado. A fonte do tanino foi o extrato de acácia proveniente da *Acacia mearnsii* (produto comercial). Os dados foram analisados através do software livre R 2.11.1 (2010). Não foi encontrado efeito significativo ($p > 0,05$) da suplementação com extrato de acácia sobre o peso vivo dos animais. As metodologias utilizadas para a análise dos dados apresentaram resultados semelhantes, o que nem sempre ocorre. E, considerando a dependência das observações obtidas ao longo do tempo, recomenda-se o ajuste de modelos mistos, que podem envolver curvas de crescimento ou modelos polinomiais que incluam a matriz de covariâncias que melhor explique o comportamento dos dados.

Palavras-chave: Medidas repetidas, ovinos, taninos

Abstract

Longitudinal data analysis with repeated measures over time can be done in different ways: in experiments using the split plot design, with the animal as plots and time as subplots; through the analysis of multivariate models; and also by adjusting mixed models, which enables the use of different structures for the covariance matrix. The main problem involved in the analysis of repeated measures over time is related to the lack of randomization, because pairs of measurements taken along the time are correlated, which can invalidate the tests involving the time factor. To discuss the different forms of analysis, data were used from an experiment in which Santa Ines lambs were infected with 6,000 L3 *Haemochus contortus* and treated with condensed tannin. The source of tannin was the acacia extract obtained from *Acacia mearnsii* (commercially available). The data were analyzed using the software R 2.11.1 (2010). No significant effect was found ($p > 0.05$) of supplementation with tannin, acting on the body weight of animals. The methods used for data analysis showed similar results, which does not always occur. And considering the dependence of observations taken over time, recommended the setting of mixed models, which may involve growth curves or polynomial models that include the covariance matrix that best explains the data.

Key words: Repeated measures, sheep, tannin

¹ Doutoranda Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: awandressa@yahoo.com.br

² Prof. Dr. do Deptº de Estatística, UEL, Londrina, PR. E-mail: silvano@uel.br

³ Pesquisador Dr. Embrapa Pecuária Sul, CPPSUL, Bagé, RS. E-mail: alessandro.minho@cppsul.embrapa.br

* Autor para correspondência

Introdução

Experimentos com planejamentos longitudinais são bastante comuns na prática, sendo utilizados por pesquisadores de diversas áreas. O termo medidas repetidas, segundo Crowder e Hand (1990), é usado para designar medidas feitas na mesma variável ou mesma unidade experimental em mais de uma ocasião.

Segundo Davidian (2005), as questões de interesse científico geralmente envolvem não somente perguntas usuais sobre como a média das respostas obtidas diferem entre os tratamentos, mas também como a mudança na resposta média ao longo do tempo difere, incluindo relações entre a resposta e o tempo. Sendo assim, é necessário representar esta situação em modelos estatísticos que validem o modo com que os dados foram coletados. Complementando os modelos, métodos especializados para a análise são necessários.

Na experimentação animal, os trabalhos que envolvem medidas repetidas têm sido utilizados especialmente na nutrição animal, podendo ser tratados como experimentos em esquema fatorial, com tratamento e época como dois fatores (ALEXANDRE et al., 2005). Uma outra forma de analisar dados coletados em medidas repetidas ao longo do tempo seria a utilização do delineamento em parcelas subdivididas. No entanto, de acordo com Xavier (2000) este tipo de análise pode não ser válido devido à ausência de aleatorização, pois pares de mensurações no tempo são correlacionados, o que pode invalidar os testes envolvendo o fator tempo. Ainda, a análise de dados de medidas repetidas vem utilizando a metodologia de modelos mistos que possibilita a utilização de diferentes estruturas para a matriz de covariâncias, uma vez que se torna possível modelar a verdadeira estrutura de correlação do fator tempo, permitindo uma análise mais eficiente (XAVIER, 2000; MALHEIROS, 1999). A análise pode ser feita tanto através de um modelo univariado, que impõe uma restrição rigorosa para a matriz de covariâncias, como por

meio de um modelo multivariado, que adota uma matriz de covariâncias sem restrições, ou seja, a matriz é sem estrutura (XAVIER, 2000).

Para a exemplificação prática e discussão da metodologia de análise estatística neste trabalho, foram obtidos dados provenientes de um experimento que teve como objetivo avaliar a eficácia do tanino condensado, presente no extrato de acácia, no controle de *Haemoncus contortus* em ovinos. Segundo Minho et al. (2010), com o aumento dos relatos de resistência de helmintos aos antihelmínticos químicos convencionais, alguns metabólitos secundários de plantas têm sido testados e avaliados para a verificação do seu potencial no controle de nematóides gastrointestinais em ruminantes, entre eles o tanino. Alguns estudos recentes já identificaram efeitos antihelmínticos de diferentes substâncias bioativas (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006), particularmente em taninos concentrados (MINHO et al., 2008a; 2008b). Niezen et al. (1995) encontraram redução na contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) em ovinos alimentados com plantas ricas em taninos. O mesmo foi relatado por Niezen et al. (1998) em ovinos mantidos em pastagens com níveis médios de taninos condensados. Os animais mostraram-se mais resilientes ao parasitismo quando comparados àqueles manejados em pastagem com ausência de taninos condensados.

A partir dos dados coletados, o presente trabalho teve como objetivo discutir a análise de dados longitudinais em experimentação animal, evidenciando o ganho para o pesquisador na qualidade dos resultados obtidos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Estação Experimental Raul Juliatto do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em Ibitiporã. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)

da Universidade de São Paulo (USP), Brasil, número 001/2007.

Foram utilizados dezoito cordeiros Santa Inês com quatro meses de idade, alocados em três grupos. Inicialmente, todos os animais receberam drogas antihelmínticas, por dois dias consecutivos, a fim de garantir o estado de livres de infecção por nematóides gastrintestinais.

O experimento avaliou o efeito do tanino sobre o ganho de peso, o número de ovos por grama de fezes (OPG), a carga parasitária, o número de larvas L3 e L1 por grama de fezes e o hematócrito dos ovinos. O teste de viabilidade dos ovos foi conduzido de acordo com as recomendações da *World Association for the Advanced of Veterinary Parasitology (WAAVP)*, como descrito por Coles et al. (1992). Entretanto, para a discussão da metodologia de análise estatística, serão utilizados somente os dados de ganho de peso.

A fonte do tanino foi o extrato de acácia (AE) proveniente da *Acacia mearnsii* (disponível comercialmente) e os valores do tanino condensado (TC) foram determinados de acordo com o método do HCl-Butanol (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1985). O extrato de acácia continha 15% do TC. O total de TC oferecido aos animais atingiu cerca de 7,2 g por animal/dia, considerando valores estimados para um animal com 30 kg de peso vivo (PV). Nenhuma sobra da ração concentrada foi encontrada após 24 horas durante o período experimental.

Uma combinação de fosfato de levamisol (20 mg.kg⁻¹) e albendazol (20 mg.kg⁻¹) foi administrada para confirmar a ausência de infecção prévia. Uma semana após o tratamento com o antihelmíntico, doze animais foram experimentalmente infectados com 6.000 L3 de *H. contortus* e seis foram mantidos como o grupo controle não infectado ou controle negativo. Grupo 1 (G1) era o controle positivo, infectado, porém não tratado; grupo 2 (G2), o grupo infectado e submetido ao tratamento com tanino condensado; e o grupo 3 (G3), o controle negativo,

grupo não infectado. Os três grupos foram mantidos em instalações fechadas, onde recebiam feno e ração concentrada (dieta com 13% de proteína bruta), além de água e sal mineral *ad libitum*.

Trinta dias após a infecção, o G2 foi suplementado com o extrato de acácia (1,6 g/kg PV/dia), adicionado ao concentrado, durante 10 dias. A mesma quantidade (1,6 g/kg PV/dia) de melação em pó (MP) foi adicionada ao extrato de acácia para melhorar a palatabilidade da dieta. Os animais do G1 foram suplementados apenas com MP na mesma dose do G2.

O experimento teve duração total de 48 dias, porém neste trabalho foram considerados os dados até o 41º dia, quando foi encerrado o tratamento com tanino. Os animais foram pesados nos dias 0, 14, 28, 35 e 41; ou seja, três vezes antes do início do tratamento e duas vezes após o início do tratamento. Os dias das pesagens serão designados como D0, D14, D28, D35 e D41.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com medidas repetidas ao longo do tempo. Os dados foram analisados através do *software* livre R 2.11.1 (2010).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentadas as médias (\pm desvio padrão) dos valores obtidos para o peso vivo dos animais, por grupo, nos dias 0; 14; 28; 35 e 41. Em uma análise inicial exploratória dos dados foi possível observar que o peso corporal dos ovinos sofreu aumento ao longo do tempo (Figura 1). Também se pode observar que o peso inicial dos animais no experimento é bastante variável entre os grupos.

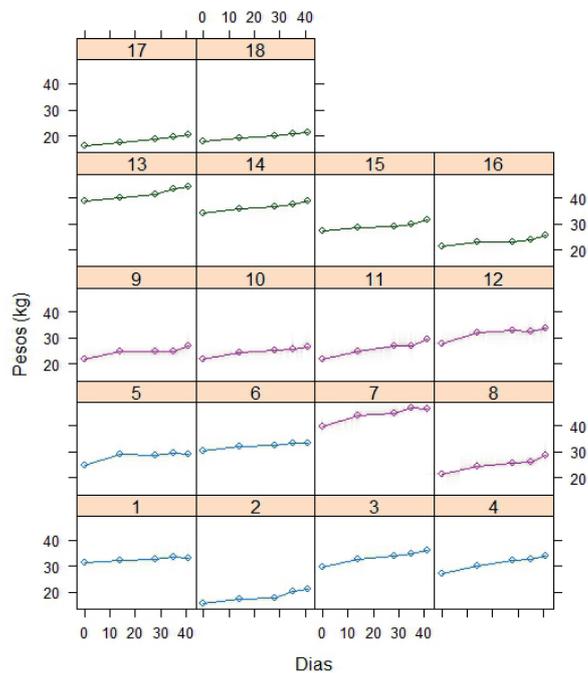
O comportamento quanto ao peso se manteve, entretanto, o perfil médio do G2, com menor peso médio no início do experimento (D0), foi aquele que apresentou maior peso médio ao final do experimento (D41) (Figura 2).

Tabela 1. Médias \pm desvio padrão do peso vivo, por grupo, de ovinos experimentalmente infectados com 6.000 L3 de *H. contortus*. Grupo tratado com extrato de acácia (G2), controle positivo, infectado e não tratado (G1) e grupo não infectado (G3).

Tempo (Dias)	G1	G2	G3
0	26,43 \pm 5,75	25,82 \pm 7,29	26,02 \pm 9,09
14	28,83 \pm 5,87	29,00 \pm 7,82	27,28 \pm 9,11
28	29,55 \pm 6,16	30,05 \pm 7,83	28,13 \pm 9,31
35	30,65 \pm 5,28	30,48 \pm 8,55	29,22 \pm 9,65
41	31,05 \pm 5,41	31,95 \pm 7,59	30,33 \pm 9,54

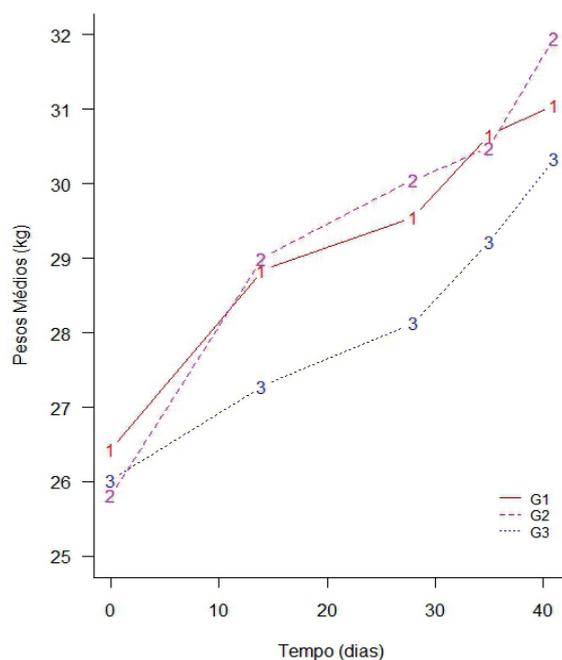
Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 1. Perfis individuais do peso vivo dos cordeiros, durante o período experimental.



Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 2. Peso vivo médio de cordeiros experimentalmente infectados com 6.000 L3 de *H. contortus* nos cinco tempos avaliados. Grupo tratado com extrato de acácia (G2), controle positivo, infectado e não tratado (G1) e grupo não infectado (G3).



Fonte: Elaboração dos autores.

Inicialmente, a análise da variável peso foi feita considerando um delineamento em parcelas subdivididas, tendo o animal como parcela e o tempo como subparcela.

A análise de variância mostrou não haver diferença significativa entre os grupos não tratados e o grupo que recebeu suplementação com o tanino condensado (p -valor=0,9538). No entanto, foi encontrada diferença no peso dos animais entre os Dias avaliados (p -valor=0,00001) e na interação entre os Grupos e Dias (p -valor=0,010027) (Tabela 2).

Foi realizado o desdobramento da interação Grupos*Dias, estudando-se o efeito de grupos dentro de dias e não houve diferença significativa, ou seja, não existe diferença no peso corporal entre os grupos de animais G1, G2 e G3 nos diferentes dias avaliados. Já no estudo dos dias dentro de cada grupo foi observada diferença significativa ($p < 0,01$). Portanto, existe diferença no peso obtido entre pelo menos dois dias dentro dos grupos G1, G2 e G3 (Tabela 3).

A partir deste resultado, foi realizado o ajuste dos modelos de regressão para os grupos estudados. A variável Dias apresentou efeito linear ao longo do experimento dentro do G1 (Tabela 4).

Tabela 2. Análise de variância no delineamento de parcelas subdivididas.

	GL	SQ	QM	Fc	Pr(>Fc)
Grupos	2	28,45267	14,226333	0,047441	0,953809
Resíduo (A)	15	4.498,10333	299,873556		
Dias	4	263,36289	65,840722	140,252426	< 0,00001***
Grupos*Dias	8	10,59844	1,324806	2,822071	0,010027***
Resíduo (B)	60	28,16667	0,469444		
Total	89	4.828,68400			

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 3. Desdobramento da interação: estudo dos Dias dentro de cada Grupo.

	GL	SQ	QM	F _{calc}	Pr(>Fc)
Grupos	2	28,45267	14,226333	0,047441	0,953809
Resíduo (A)	15	4.498,10333	299,873556		
Dias : Grupo 1	4	80,29800	20,074500	42,762289	< 0,00001
Dias : Grupo 2	4	126,48533	31,621333	67,359117	< 0,00001
Dias : Grupo 3	4	67,17800	16,794500	35,775300	< 0,00001
Resíduo (B)	60	28,16667	0,469444		
Total	107	5.892,22963			

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 4. Análise de Regressão dos Dias dentro do Grupo 1.

Efeitos	GL	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
Efeito Linear	1	77,25277	77,25277	164,56	< 0,00001
Desvios de Regressão	3	3,04523	1,01508	2,16	0,10182
Resíduos	60	28,16667	0,46944		

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 5. Estimativas do modelo de regressão linear dentro do Grupo 1.

Parâmetros	Estimativa	Erro padrão	t _{calc}	p-valor
$\hat{\beta}_0$	26,7514530	0,23499	113,84071	< 0,00001
$\hat{\beta}_1$	0,1081305	0,00843	12,82818	< 0,00001

R² = 0,9621

Fonte: Elaboração dos autores.

Modelo linear definido para o Grupo 1:

$$\hat{y} = 26,75 + 0,1981 d$$

Tabela 6. Análise de regressão dos Dias dentro do Grupo 2.

Efeitos	GL	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
Efeito Linear	1	119,32466	119,32466	254,18	< 0,00001
Efeito Quadrático	1	1,85247	1,85247	3,95	0,05155
Efeito Cúbico	1	5,02242	5,02242	10,7	0,00178
Desvios de Regressão	1	0,28578	0,28578	0,61	0,43832
Resíduos	60	28,16667	0,46944		

Fonte: Elaboração dos autores.

Houve efeito significativo linear e cúbico ($p < 0,05$), portanto, foi ajustado o modelo polinomial de maior grau (Tabela 7).

Tabela 7. Estimativas do modelo de regressão cúbica dentro do G2.

Parâmetros	Estimativas	Erro padrão	t _{calc}	p-valor
$\hat{\beta}_0$	25,80810508	0,27950	92,33664	< 0,00001
$\hat{\beta}_1$	0,40501523	0,07158	5,65856	< 0,00001
$\hat{\beta}_2$	-0,01562030	0,00438	-3,56340	0,00073
$\hat{\beta}_3$	0,00022835	0,00007	3,27088	0,00178

$R^2 = 0,9977$

Fonte: Elaboração dos autores.

Modelo cúbico definido para o G2:

$$\hat{y} = 25,81 + 0,4050 d - 0,0156 d^2 + 0,00023 d^3$$

Tabela 8. Análise de regressão dos dias dentro do Grupo 3.

Efeitos	GL	SQ	QM	F _{calc}	p-valor
Efeito Linear	1	64,43033	64,43033	137,25	< 0,00001
Desvios de Regressão	3	2,74767	0,91589	1,95	0,13103
Resíduos	60	28,16667	0,46944		

Fonte: Elaboração dos autores.

O efeito linear foi significativo ($p < 0,05$), portanto foi estimado o modelo linear.

Tabela 9. Estimativas do modelo de regressão linear dentro do Grupo 3.

Parâmetros	Estimativas	Erro padrão	t_{calc}	p-valor
$\hat{\beta}_0$	25,86617024	0,23499	110,07339	< 0,00001
$\hat{\beta}_1$	0,09874985	0,00843	11,71529	< 0,00001

$R^2 = 0,9591$

Fonte: Elaboração dos autores.

Modelo linear definido para o G3:

$$\hat{y} = 25,87 + 0,0987 d$$

O principal problema envolvido na análise de dados longitudinais adotando o delineamento em parcelas subdivididas está ligado à dependência das

medidas obtidas ao longo do tempo. Por exemplo, o peso obtido no D41 está relacionado ao peso obtido no D35, como é possível perceber com o estudo das correlações entre os tempos (dias) avaliados que, neste trabalho, mostrou valores superiores a 0,9 (Tabela 10); o que indica forte correlação.

Tabela 10. Correlação observada entre tempos (dias) em que foram obtidos os pesos dos animais.

Tempos (Dias)	Tempos (Dias)				
	0	14	28	35	41
0	1,0000	0,9890	0,9854	0,9879	0,9804
14	0,9890	1,0000	0,9967	0,9934	0,9869
28	0,9854	0,9967	1,0000	0,9942	0,9933
35	0,9879	0,9934	0,9942	1,0000	0,9930
41	0,9804	0,9869	0,9933	0,9930	1,0000

Fonte: Elaboração dos autores.

Segundo Barbosa (2009), é comum admitir-se correlação não nula entre observações feitas em ocasiões distintas e heterogeneidade de variâncias nas diversas ocasiões. A autora afirma ainda que, o uso do delineamento em parcelas subdivididas no tempo, que corresponde a uma análise univariada dos perfis, nem sempre é recomendado, porque pressupõe que a estrutura da matriz de covariância seja do tipo uniforme (variâncias iguais nas diversas ocasiões e covariâncias iguais entre duas ocasiões quaisquer).

Quando considerado o modelo multivariado:

$$\mathbf{Y}_{ij} = \boldsymbol{\mu} + \boldsymbol{\tau}_i + \boldsymbol{\beta}_j + \boldsymbol{\varepsilon}_{ij}$$

em que o vetor aleatório $\mathbf{Y}_{ij} = [Y_{ij1}, Y_{ij2}, \dots, Y_{ijp}]^T$, refere-se às observações multivariadas, que são os tempos, em \mathcal{R}^p associado ao i -ésimo nível do tratamento ($\boldsymbol{\tau}_i$) e o j -ésimo efeito de blocos ($\boldsymbol{\beta}_j$); $\boldsymbol{\mu}$ é o vetor de constantes do modelo linear, dado por: $\boldsymbol{\mu}_i = [\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_p]^T$. A matriz das correlações parciais dos resíduos é dada como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11. Correlação entre tempos (dias) em que foram obtidos os pesos dos animais, quando considerado o modelo multivariado.

Tempos (Dias)	Tempos (Dias)				
	0	14	28	35	41
0	1,0000	0,9910	0,9868	0,9894	0,9805
14	0,9910	1,0000	0,9967	0,9934	0,9880
28	0,9868	0,9967	1,0000	0,9941	0,9940
35	0,9894	0,9934	0,9941	1,0000	0,9937
41	0,9805	0,9880	0,9940	0,9937	1,0000

Fonte: Elaboração dos autores.

Assim, como alternativa para a análise de medidas repetidas no tempo, tem-se a análise multivariada. Quando se utiliza esse tipo de análise, as hipóteses de interesse testadas são:

- igualdade do efeito de tratamentos, que corresponde à hipótese de perfis coincidentes;
- igualdade do efeito de tempos, que corresponde à hipótese de perfis constantes;
- não interação entre tempos*tratamentos, que corresponde à hipótese de perfis paralelos.

Os testes multivariados de: Lambda de Wilks, Traço de Pillai, Traço de Hottelling-Lawley e Roy são apresentados nas Tabelas 10 e 11. Em geral, a ordem de preferência em termos de poder é Traço de Pillai, Lambda de Wilks, Traço de Lawley-Hotelling e Roy. Entretanto, Lambda de Wilks é o teste mais comumente usado (XAVIER, 2000).

Neste caso, a matriz de covariâncias Σ desse modelo é sem estrutura com $t(t+1)/2$ parâmetros. A matriz de correlações parciais dos resíduos e seus níveis descritivos associados aos testes das correlações parciais é dada por:

$$R = \begin{bmatrix} 1,0000 & 0,9951 & 0,9926 & 0,9914 & 0,9868 \\ & < 0,0001 & < 0,0001 & < 0,0001 & < 0,0001 \\ 0,9951 & 1,0000 & 0,9968 & 0,9937 & 0,9882 \\ < 0,0001 & & < 0,0001 & < 0,0001 & < 0,0001 \\ 0,9926 & 0,9968 & 1,0000 & 0,9951 & 0,9940 \\ < 0,0001 & < 0,0001 & & < 0,0001 & < 0,0001 \\ 0,9914 & 0,9937 & 0,9951 & 1,0000 & 0,9949 \\ < 0,0001 & < 0,0001 & < 0,0001 & & < 0,0001 \\ 0,9868 & 0,9882 & 0,9940 & 0,9949 & 1,0000 \\ < 0,0001 & < 0,0001 & < 0,0001 & < 0,0001 \end{bmatrix}$$

O teste para o fator Dias, testou a hipótese de perfis horizontais (constantes). Esta hipótese foi rejeitada, indicando que existem diferenças verticais entre as curvas que descrevem os pesos médios dos grupos de animais ao longo do tempo (Tabela 12). Já o teste para a interação Grupo*Dias, testou a hipótese de perfis paralelos, que não foi rejeitada (Tabela 13), embora o teste de Roy tenha sido significativo (p-valor=0,0164).

De acordo com Xavier (2000), a análise multivariada pode apresentar menor poder em seus testes e às vezes indicar diferença significativa onde não existem, mas esses riscos podem ser minimizados garantindo a distribuição normal multivariada dos erros. Mauchly (1940) apresentou a estatística de teste para a condição de esfericidade (condição de Huynh e Feldt ou H-F), que verifica se uma população normal multivariada apresenta variâncias iguais e correlações nulas. Caso uma população apresente essa simetria, será chamada de “esférica”.

Tabela 12. Testes multivariados para os fatores intra-indivíduos.

Estatística	Valor	F valor	Num GL	Den GL	Pr > F
Lambda de Wilks	0,04032185	71,40	4	12	< 0,0001
Traço de Pillai	0,95967815	71,40	4	12	< 0,0001
Traço de Hotelling-Lawley	23,80044769	71,40	4	12	< 0,0001
Roy	23,80044769	71,40	4	12	< 0,0001

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 13. Testes multivariados para os fatores intra-indivíduos.

Estatística	Valor	F valor	Num GL	Den GL	Pr > F
Lambda de Wilks	0,32765297	2,24	8	24	0,0604
Traço de Pillai	0,79782995	2,16	8	26	0,0663
Traço de Hotelling-Lawley	1,66903449	2,41	8	15	0,0678
Roy	1,39437789	4,53	4	13	0,0164

Fonte: Elaboração dos autores.

No presente trabalho, pelo resultado do Teste de esfericidade (Tabela 14) pode-se verificar que a condição de esfericidade não foi violada, com um nível de significância de 0,0668 (Teste de Mauchly não significativo, com $p > 0,05$). Portanto, a população multivariada apresenta variâncias iguais e correlações nulas. Nesse caso, não se faz necessária a utilização da correção para os graus de liberdade dos fatores intra-indivíduos para o fator Dias e a interação Grupos*Dias.

Uma outra desvantagem da análise multivariada segundo Meredith e Stehman (1991), é a falta de

poder para estimar os parâmetros da matriz de covariâncias, isto quando t (número de ocasiões medidas ou tempos) é grande e n é pequeno. Sob a condição de H-F, os testes univariados para o efeito intra-indivíduos são usualmente mais poderosos que os testes multivariados, proporcionando uma maior probabilidade de detectar efeitos significativos, quando esses realmente existem.

Os testes sobre as tendências lineares (Tabela 15) mostram que o comportamento dos perfis médios pode ser explicado por um polinômio de 3º grau (p-valor = 0,0185).

Tabela 14. Teste de esfericidade de Mauchly.

Teste para a Esfericidade: Critério de Mauchly = 0,3033527					
Aproximação Qui-quadrado: 16,004195					
Graus de liberdade: 9					
Probabilidade > Qui-quadrado = 0,0668					

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 15. Testes sobre as tendências lineares.

Contraste: linear					
Causa de variação	GL	S.Q.	Q.M.	F valor	Pr > F
Dias	1	250,1602222	250,1602222	252,65	<,0001
Grupo*Dias	2	3,5314444	1,7657222	1,78	0,2019
Resíduo	15	14,8523333	0,9901556		
Contraste: quadrático					
Causa de variação	GL	S.Q.	Q.M.	F valor	Pr > F
Dias	1	8,54349206	8,54349206	19,93	0,0005
Grupo*Dias	2	4,09388889	2,04694444	4,77	0,0249
Resíduo	15	6,43119048	0,42874603		
Contraste: cúbico					
Causa de variação	GL	S.Q.	Q.M.	F valor	Pr > F
Dias	1	4,23200000	4,23200000	17,94	0,0007
Grupo*Dias	2	2,48633333	1,24316667	5,27	0,0185
Resíduo	15	3,53766667	0,23584444		
Contraste: quadrático					
Causa de variação	GL	S.Q.	Q.M.	F valor	Pr > F
Dias	1	0,42717460	0,42717460	1,92	0,1866
Grupo*Dias	2	0,48677778	0,24338889	1,09	0,3610
Resíduo	15	3,34547619	0,22303175		

Fonte: Elaboração dos autores.

Uma terceira forma possível para analisar dados longitudinais, seria o ajuste de modelos mistos. Everitt (2005) destacou a importância do uso desses modelos na análise de dados com medidas repetidas.

Os modelos mistos englobam a análise de curvas de crescimento ou curvas polinomiais, que levam em conta a matriz de covariâncias que melhor explica o comportamento das observações (VON ENDE, 1993; LITTELL; HENRY; AMMERMAN, 1998). Neste caso, como uma das formas para verificar se a condição Huynn-Feldt, relativa à esfericidade, é satisfeita, ajusta-se o modelo usando-se as estruturas de variâncias-covariâncias não estruturadas

(UN) e de Huynn-Feldt, obtendo-se os valores de $-2 \log\text{-verossimilhança}$. Então, tem-se que $\chi^2 = 292,92 - 254,3 = 38,62$; com $gl = 20 - 6 = 14$ graus de liberdade e um nível de significância de 0,0089. Rejeita-se, portanto, a hipótese de esfericidade. Embora, uma das vantagens de modelos mistos é que não se tem que assumir esfericidade ou simetria composta no modelo.

Na análise de modelos mistos, dentre as várias estruturas de matrizes de variâncias e co-variâncias, tem-se o componente simétrico (CS), auto regressivo de primeira ordem (AR1) e não estruturada (UN).

Os testes obtidos através das duas estruturas de covariâncias apresentaram os mesmos resultados (Tabela 16), indicando que existe diferença entre os Dias e a interação Grupo*Dias, mas não há efeito

de Grupo, isto é, não existe diferença significativa entre o grupo tratado com tanino e os controles positivo e negativo ($p > 0,05$).

Tabela 16. Testes para os efeitos fixos dos modelos com estruturas para a matriz de covariâncias do tipo Huynh-Feldt e sem estrutura (UN).

Matriz de covariâncias – Huynh-Feldt				
Efeito	GL numerador	GL denominador	F valor	Pr > F
Grupo	2	15	0,04	0,9646
Dias	4	60	140,25	< 0,0001
Grupo*Dias	8	60	2,82	0,0100
Matriz de covariâncias – Sem Estrutura				
Efeito	GL numerador	GL denominador	F valor	Pr > F
Grupo	2	15	0,05	0,9538
Dias	4	15	89,25	< 0,0001
Grupo*Dias	8	15	3,13	0,0270

Fonte: Elaboração dos autores.

Considerando o número elevado de estruturas de variâncias-covariâncias possíveis, um dos principais objetivos da análise é de encontrar um modelo que melhor represente os dados, para depois realizar os testes sobre os efeitos fixos. Para a escolha do modelo adequado foi utilizado o critério de Akaike (AIC).

O modelo testado foi o de efeito quadrático:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_j + \tau\delta_{ij} + \delta_j^2 + \tau\delta_{ij}^2 + \varepsilon_{ijk}$$

em que y_{ijk} é o peso observado para o i -ésimo grupo, no j -ésimo dia e k -ésima repetição; τ_i é o efeito do i -ésimo grupo; δ_j é o efeito do j -ésimo tempo e ε_{ijk} o erro associado ao i -ésimo grupo, j -ésimo tempo e k -ésima repetição.

As estruturas de covariâncias testadas para esse modelo foram: não-estruturada (UN), Huynh-Feldt (HF), Auto-Regressiva de ordem 1 (AR(1)) e Simetria Composta (CS), e os resultados são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Comparação das estruturas de covariâncias através do critério de Akaike (AIC) e o de Informação Bayesiana (BIC).

Parâmetros	Não estruturada (UN)	Huynh-Feldt (HF)	AR(1)	Simetria Composta (CS)
AIC	369,9	358,4	357,8	358,1
BIC	383,3	363,7	359,6	359,8

Fonte: Elaboração dos autores.

De acordo com o critério de Akaike, a estrutura de covariâncias mais adequada foi a AR (1), tornando necessária a verificação dos testes para

os efeitos fixos, e caso algum efeito não fosse significativo deveria ser retirado do modelo (Tabela 18). Entretanto, todos os efeitos foram significativos ($p < 0,05$).

Tabela 18. Testes para os efeitos fixos do modelo completo com a estrutura da matriz de covariâncias do tipo AR(1).

Causa de variação	GL numerador	GL denominador	F valor	Pr > F
Grupo	2	15	0,01	0,9906
Dias	1	66	54,53	< 0,0001
Grupo*Dias	2	66	5,64	0,0055
Dias ²	1	66	3,44	0,0679
Grupo*Dias ²	2	66	3,61	0,0325

Fonte: Elaboração dos autores.

Pode-se então realizar testes para verificar se os efeitos dos Grupos podem ser considerados sem diferenças, ou seja, se uma única curva pode explicar o comportamento de mais de um Grupo. Neste trabalho, o teste utilizado foi o de Tukey-Kramer (Tabela 19).

Pelo teste de Tukey-Kramer para os Grupos verifica-se que as comparações entre os Grupos: G1-G2, G1-G3 e G2-G3, não são significativas, sugerindo que é possível unir os Grupos em um único, ou seja, não há diferença entre o grupo tratado

com o extrato de acácia e os controles positivo e negativo.

Assim, a curva ajustada para explicar o comportamento dos Grupos em função dos Dias é dada por:

$$y_{ijk} = 26,3 + 0,151\delta_j$$

As estimativas dos parâmetros da curva de crescimento para o modelo escolhido são apresentadas na Tabela 20.

Tabela 19. Teste de Tukey-Kramer para o fator Grupo com a estrutura da matriz de covariâncias do tipo AR(1).

Grupos	Diferenças	Erro-padrão	GL	t valor	PR > t
G1 – G2	-0,3132	4,3666	15	-0,07	0,9438
G1 – G3	1,0921	4,3666	15	0,25	0,8059
G2 – G3	1,4053	4,3666	15	0,32	0,7520

Fonte: Elaboração dos autores.

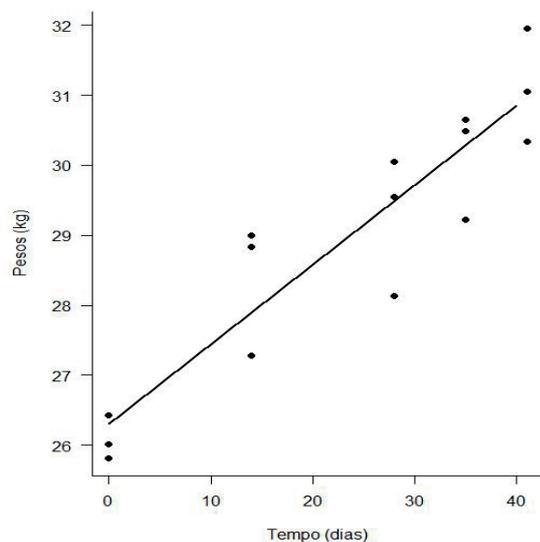
Tabela 20. Estimativas do modelo final ajustado.

Efeitos	Estimativas	Erro padrão	GL	t valor	Pr> t
Grupo	26,2864	1,6894	17	15,56	< 0,0001
Dias*Grupo	0,1510	0,02167	70	6,97	< 0,0001

Fonte: Elaboração dos autores.

Na Figura 3 é apresentado o ajuste do modelo final para os valores médios dos pesos dos animais, também demonstrado na Tabela 20. É possível verificar que houve um bom ajuste dos pesos em função do tempo, demonstrado através da pouca variabilidade encontrada.

Figura 3. Ajuste do modelo final para os valores médios do peso vivo dos ovinos.



Fonte: Elaboração dos autores.

Conclusões

No presente trabalho não foi encontrado efeito significativo sobre o peso vivo, da suplementação com extrato de acácia, em ovinos experimentalmente infectados com *Haemochus contortus*.

As metodologias utilizadas para a análise dos dados: delineamento em parcelas subdivididas, análise multivariada e de modelos mistos apresentaram resultados semelhantes. E, considerando a dependência das observações relacionadas à variável peso, recomenda-se o ajuste de modelos mistos, que podem envolver curvas de crescimento ou modelos polinomiais que incluam a matriz de covariâncias que melhor explique o comportamento dos dados.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro oferecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR).

Referências

ALEXANDRE, J. C.; ARAÚJO, S. I.; ARAÚJO, C. V. de; REGAZZI, J. A. Análise de dados longitudinais em experimentação com animais usando a metodologia de modelos mistos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 10., 2005, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: UEMS, 2005. p. 1-4.

BARBOSA, M. *Uma abordagem para análise de dados com medidas repetidas utilizando modelos lineares mistos*. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

COLES, G.; BAUER, C.; BORQSTEEDE, F. H.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 35-44, 1992.

CROWDER, M. J.; HAND, D. J. *Analysis of repeated measures*. London: Chapman & Hall, 1990. 257 p.

DAVIDIAN, M. *Applied longitudinal data analysis: lecture notes*. North Carolina: North Carolina State University, 2005. 528 p.

EVERITT, B. S. *An R and S-Plus® companion to multivariate analysis*. London: Springer-Verlag, 2005. 221 p.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

LITTELL, R. C.; HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.*, Madison, v. 76, n. 4, p. 1216-1231, 1998.

MALHEIROS, E. B. Precisão de análise de dados longitudinais, com diferentes estruturas para a matriz de variância e covariâncias, quando se utiliza o esquema em parcelas subdivididas. *Revista de Matemática e Estatística*, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 263-273, 1999.

- MAUCHLY, J. W. Significance test for sphericity of a normal n-variate distribution. *The Annals of Mathematical Statistics*, Michigan, v. 11, n. 2, p. 204-209, 1940.
- MEREDITH, M. P.; STEHMAN, S. V. Repeated measures experiments in forestry: focus on analysis of response curves. *Canadian Journal of Forest Research*, Ottawa, v. 21, n. 7, p. 957-965, 1991.
- MINHO, A. P.; BUENO, I. C. S.; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.; GENNARI, S. M.; ABDALLA, A. L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 147, n. 1-3, p. 172-181, 2008a.
- MINHO, A. P.; BUENO, I. V. C. da S.; GENNARI, S. M.; JACKSON, F.; ABDALLA, A. L. *In vitro* effect of condensed tannin extract from acacia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 144-148, 2008b.
- MINHO, A. P.; FILIPPSEN, L. F.; AMARANTE, A. F. T. do; ABDALLA, A. L. Efficacy of condensed tannin presents in acacia extract on the control of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1360-1365, jun. 2010.
- NIEZEN, J. H.; ROBERSTON, G. C.; WAGHORN, G. C.; CHARLESTON, W. A. G. Production, fecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 15-27, 1998.
- NIEZEN, J. H.; WAGHORN, T. S.; CHARLESTON, W. A. G.; WAGHORN, G. C. Growth and gastrointestinal parasitism in lamb grazing one of seven herbage and dosed with larvae for six weeks. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 281-289, 1995.
- PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, Oxford, v. 25, n. 1, p. 223-230, 1985.
- VON ENDE, C. N. Repeated-measures analysis: Growth and other time-dependent measures. In: SCHEINER, S. M.; GUREVITCH, J. (Ed.). *Design and analysis of ecological experiments*. New York: Chapman and Hall, 1993. p. 113-137.
- XAVIER, L. H. *Modelos univariado e multivariado para análise de medidas repetidas e verificação da acurácia do modelo univariado por meio de simulação*. 2000. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agrônômica) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, São Paulo.

