

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA – CÓDIGO 04P25

TÍTULO: Desenvolvimento de software e análise estatística para teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames)

PESQUISADORA: Gisela de Aragão Umbuzeiro

INSTITUIÇÃO: CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

FINALIDADE: Análise estatística e elaboração de software para o teste de mutação reversa utilizando *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames).

RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE: Carlos Alberto de Bragança Pereira
Julio da Motta Singer
Jackelyne Cristina Reis Ferreira Gense
José Roberto Villar Perez

REFERÊNCIA DESTE TRABALHO:

Pereira, C. A. B., Singer, J. M., Gense, J. C. R. F. e Perez, J. R. V., **Relatório de Análise Estatística sobre o projeto:** “Desenvolvimento de software e análise estatística para teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames)”, São Paulo, IME-USP, 2004 (RAE – CEA 04P25)

FICHA TÉCNICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMES,B.N., LEE,F.D. and DURSTON,W.E. (1973) **An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens.** Proc. Natl Acad. Sci. USA, 70, 782–786.

AMES,B.N., MCCANN,J. and YAMASAKI,E. (1975) **Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.** Mutat. Res., 31, 347–364.

BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P.A. (2002). **Estatística Básica.** 5.ed. São Paulo: Editora Saraiva. 526p.

NETER,J., NACHSTHEIM, C. and KUTNER, M. H. **Applied linear regression models.** 4.ed. USA: IE-MCGRAW-HILL .1408p.

UMBUZEIRO, G. A. e ROUBICEK, D.A. (2004) **Genotoxicidade Ambiental.** São Paulo: CETESB. 20p. Apostila.

PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS:

Excel for Windows (versão 2002);

Microsoft Word;

Minitab 14.0 for Windows;

SAS V.8 for Windows;

Statística 6.0

TÉCNICAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS:

Análise Descritiva Unidimensional

(03:010)

Regressão Não Linear

(07:140)

Análise de Variância com Efeitos Fixos

(08:010)

ÁREA DE APLICAÇÃO:

Outros:

(14:990)

ÍNDICE

<u>RESUMO</u>	5
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	6
<u>2. DESCRIÇÃO DO ESTUDO</u>	8
<u>3. DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS</u>	9
<u>4. ANÁLISE DESCRITIVA</u>	10
<u>5. ANÁLISE INFERENCIAL</u>	12
<u>6. CONCLUSÕES</u>	16
<u>APÊNDICE A</u>	17
<u>APÊNDICE B</u>	32
<u>APÊNDICE C</u>	63

RESUMO

O teste de mutação reversa que utiliza bactérias (teste de Ames, ensaio Salmonella/microsoma) é eficiente para detectar uma grande variedade de compostos mutagênicos. A maioria das linhagens bacterianas utilizadas no teste apresenta características que as tornam mais sensíveis para detecção de mutações.

O interesse da CETESB foi definir uma metodologia para avaliar se um composto presente no meio ambiente é mutagênico ou não. Esta metodologia baseia-se na validação do ensaio através do grupo controle (número de revertentes negativos) e, após validado o ensaio, verifica se o composto é mutagênico.

Para realização do estudo, foram utilizados alguns dados de experimentos que a CETESB realizou e arquivou ao longo de alguns anos.

Com base nas distribuições de cada linhagem de bactérias, foram definidos intervalos de validação para o número médio de colônias de cada linhagem. Para verificar a mutagenicidade de um determinado composto foi construído um modelo utilizando uma análise de regressão não-linear.

Com a utilização do modelo de regressão não-linear, podemos identificar se um composto é ou não mutagênico. Com os dados históricos as conclusões obtidas com o modelo foram validadas com as estimativas do parâmetro de mutagenicidade de outros experimentos, e assim ter uma conclusão mais precisa a respeito dos compostos em estudo.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial nos centros urbanos tem provocado deterioração do meio ambiente trazendo sérias conseqüências à saúde pública. Por isto, é crescente a preocupação com os efeitos mutagênicos de agentes genotóxicos (compostos orgânicos capazes de alterar a seqüência das bases nitrogenadas no DNA) em populações expostas direta ou indiretamente.

Existem diversos métodos para detecção de mutação genética; entre eles destacamos o Teste de Ames (Ames *et al.*, 1973, 1975), cujo objetivo é avaliar a capacidade de um determinado composto provocar mutações reversas¹ em diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*. As linhagens utilizadas possuem uma alteração em uma das bases nitrogenadas, o que significa que elas nascem e não conseguem viver a menos que exista algum composto que entre nas células e sejam capazes de alterar essa base.

O ensaio utilizado para o teste de Ames consiste em colocar linhagens bacterianas em contato com uma amostra coletada do meio ambiente (água, ar, solo, etc.) suspeita de conter algum composto mutagênico e observar o crescimento dessas bactérias durante um certo intervalo de tempo. Quando número de bactérias que crescem é “estatisticamente” maior que os valores esperados naturalmente, o composto é considerado mutagênico. A amostra a que nos referimos acima é um extrato orgânico, resultado de um processo físico-químico ao qual o material de estudo (água, ar, solo, etc.) é submetido.

Para alguns compostos, apenas o contato com as bactérias não é suficiente para evidenciar mutações. Nesses casos é necessário realizar o ensaio com a incorporação de um sistema de ativação metabólica, em que além do composto e da linhagem, é adicionado um “homogeneizado” de células de fígado de rato, conhecido como fração microsomal (S9). A fração S9 pode ser responsável pela ativação ou inativação de mutágenos e por isso, os ensaios são realizados com e sem a ativação metabólica.

Para realização dos ensaios, diferentes quantidades da amostra são submetidas a diferentes diluições em solvente apropriado (água, Dimetilsulfóxido - DMSO ou outro). Cada uma dessas diluições corresponde a uma dose diferente.

Para cada ensaio há necessariamente uma dose controle em que a linhagem não é exposta ao extrato orgânico, pois existe um número de colônias de bactérias que crescem por meio de um processo de mutação espontânea; essas doses são os controles negativos (“brancos”). Para a validação do teste de AMES, o número de colônias de bactérias, de cada linhagem que se desenvolvem espontaneamente, deve estar dentro de certos limites. Existem limites padrões internacionais para cada uma das linhagens; entretanto os intervalos definidos por esses limites não parecem compatíveis com os resultados dos estudos realizados na CETESB, sugerindo que nessas condições, o crescimento espontâneo obedece a padrões diferentes. Uma vez validado o ensaio, devemos observar se o composto é mutagênico e caso seja, devemos verificar a potência da mutação.

As outras doses, que variam de acordo com o composto e com a linhagem, são utilizadas para detectar mutações por meio da comparação do número de bactérias que se proliferam quando expostas ao extrato orgânico com o número de bactérias que se proliferam espontaneamente. Um composto é considerado mutagênico numa determinada dose, quando o número médio de colônias observado sob essa dose for “estatisticamente” superior àquele obtido com o branco (dose zero)

Quando existe mutação, a potência do efeito mutagênico é calculada por intermédio de um dos parâmetros de um modelo construído para explicar a mudança do número de colônias de bactérias em função do valor da dose.

Os ensaios podem ser realizados com a utilização de vários métodos (incorporação em placas, pré-incubação, microssuspensão e direto). A escolha do método depende dos objetivos do estudo, quantidade de material disponível e de características físico-químicas dos compostos suspeitos.

Os objetivos deste estudo são:

1. Analisar as distribuições do número de colônias de bactérias que crescem nas placas denominadas “controle negativo”;
2. Ajustar um dos modelos existentes na literatura (Lawrence et al.,1981) para avaliar a potência de mutação.

¹ Mutações reversas: Revertem os efeitos de mutações que tinham inativado um gene

2. DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Para a realização deste estudo, foram utilizados dois bancos de dados:

- **BANCO DE DADOS 1:** 2195 ensaios realizados pela CETESB no período de fevereiro de 2000 a março de 2004. Este banco de dados contém apenas informações dos controles negativos. Foram utilizados 4 tipos de linhagens (TA98, TA100, YG1041 e YG1042), 4 métodos de ensaio (Ames - Incorporação em placas, Ames com pré-incubação, Microsuspensão (Kado) e Direto); além disso, os ensaios foram realizados com e sem ativação metabólica (S9);

- **BANCO DE DADOS 2:** 173 ensaios realizados pela CETESB no período de 1987 a 2004. Este banco de dados contém informações sobre ensaios completos realizados com duas linhagens (TA98 e TA100).

Na tabela 2.1. apresentamos detalhes sobre os números de ensaios incluídos no estudo por linhagem, método e ativação metabólica.

Tabela 2.1. Números de ensaios incluídos no estudo sobre controles negativos.

Método	Linhagem	Nº de ensaios COM S9	Nº de ensaios SEM S9
Ames - Incorporação em Placas	TA98	132	132
Ames - Incorporação em Placas	TA100	124	120
Ames - Incorporação em Placas	YG1041	38	38
Ames - Incorporação em Placas	YG1042	31	30
Ames com pré-incubação	TA98	10	11
Ames com pré-incubação	YG1041	8	8
Ames com pré-incubação	YG1042	11	11
Microsuspensão (Kado)	TA98	237	234
Microsuspensão (Kado)	TA100	147	148
Microsuspensão (Kado)	YG1041	112	107
Microsuspensão (Kado)	YG1042	163	167
Direto	TA98	44	46
Direto	TA100	42	44
Total		1099	1096

Na tabela 2.1. apresentamos detalhes sobre os números de ensaios completos incluídos no estudo por linhagem.

Tabela 2.2. Números de ensaios completos incluídos no estudo

Linhagem	Nº de ensaios
TA98	77
TA100	96
Total	173

O número de doses varia de 4 a 6, com 2 ou 3 repetições em cada dose, dependendo do estudo e da quantidade de extrato que foi retirado do meio ambiente; para os controles negativos, em geral, são feitas 5 repetições. Os valores das doses dependem da concentração do composto na amostra, pois essa concentração influencia o número de colônias de bactérias que se proliferam. Quanto maior a concentração do composto, menor será a dose necessária para detectar a mutação.

3. DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS

As variáveis envolvidas no estudo são:

VARIÁVEIS EXPLICATIVAS:

- **Linhagens:** TA98, TA100, YG1041 e YG1042;
- **Métodos de ensaio:** Ames - Incorporação em Placas, Ames com pré-incubação, Direto, Microsuspensão (Kado);
- **Ativação Metabólica:** Com ou Sem fração S9;
- **Doses (μ l):** Volume de amostra diluída

VARIÁVEL RESPOSTA:

- **Número de colônias de bactérias por placa.**

4. ANÁLISE DESCRITIVA

Na tabela 4.1 estão dispostas as quantidades de réplicas² observadas nos ensaios incluídos no estudo.

Tabela 4.1. Número de réplicas por ensaio

Metodo	Ativacao	Linhagem	Réplica1	Réplica2	Réplica3	Réplica4	Réplica5
Ames - Incorporação em Placas	Com S9	TA100	123	124	123	124	115
	Sem S9	TA100	120	120	120	118	107
	Com S9	TA98	131	124	126	122	100
	Sem S9	TA98	128	132	127	117	97
	Com S9	YG1041	38	37	37	35	32
	Sem S9	YG1041	38	38	38	37	36
	Com S9	YG1042	31	31	31	30	26
	Sem S9	YG1042	30	30	30	29	26
Ames com pré-incubação	Com S9	TA98	10	10	10	10	8
	Sem S9	TA98	11	11	11	10	7
	Com S9	YG1041	8	8	8	8	7
	Sem S9	YG1041	8	8	8	8	6
	Com S9	YG1042	11	11	11	11	11
	Sem S9	YG1042	11	11	11	11	11
Microsupensão (Kado)	Com S9	TA100	147	147	147	142	134
	Sem S9	TA100	148	147	148	144	137
	Com S9	TA98	235	232	228	206	172
	Sem S9	TA98	228	229	230	216	177
	Com S9	YG1041	111	110	112	106	96
	Sem S9	YG1041	107	107	107	105	100
	Com S9	YG1042	162	163	162	160	149
	Sem S9	YG1042	164	167	167	166	152
Direto	Com S9	TA100	42	42	42	41	35
	Sem S9	TA100	44	44	44	43	43
	Com S9	TA98	43	43	43	44	37
	Sem S9	TA98	45	46	45	42	35

Na tabela A.1. apresentamos as medidas resumo (tamanho amostral (N), média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) para os controles negativos, separados por linhagem. Nas tabelas A.2 à A.5, temos as medidas resumo para os controles negativos, por linhagem, método e ativação metabólica. Para melhor visualização destes resultados, gráficos do tipo *Box-Plot* (Bussab e Morettin, 2004) estão apresentados nas Figuras B.14 à B.17 e não sugerem diferenças entre os métodos e a utilização de ativação metabólica com respeito à distribuição do número de colônias de bactérias.

² Réplicas: Número de placas analisadas em cada dose, num determinado ensaio.

Com o objetivo de estudar a distribuição do número médio de colônias de bactérias para os controles negativos, foram construídos histogramas e gráficos do tipo QQ referentes às distribuições normais e log-normais (Figuras B.18 à B.53) para cada combinação de linhagem, método e ativação metabólica. Outras distribuições foram analisadas, porém não houve resultados satisfatórios. A tabela 4.2 mostra as distribuições consideradas mais apropriadas para o número médio de colônias de bactérias para os controles negativos.

Para avaliar a homogeneidade das respostas entre as réplicas para os controles negativos em cada ensaio, construímos gráficos de perfis de médias (Figuras B.1 à B.13) e calculamos correlações entre os valores correspondentes às diferentes réplicas (Tabelas A.5 à A.30). Além de não haver evidências de diferenças entre as médias das diferentes réplicas, há indicações de que, em geral, os valores obtidos das diferentes réplicas mesmo ensaio são altamente correlacionados.

Há alguns casos com correlações baixas (tabelas: A.27 e A.28), porém se referem ao Método de Ames com pré-incubação para o qual há poucas observações coletadas.

Esses resultados permitem-nos concluir que o uso de apenas uma das réplicas é suficiente para a análise; por essa razão realizamos a análise com a média do número de colônias observado em cada uma das réplicas.

Tabela 4.2. Distribuição do número de colônias de bactérias para os controles negativos.

DISTRIBUIÇÃO LOG NORMAL	DISTRIBUIÇÃO NORMAL
TA100	TA98
YG1041	
YG1042*	

* Exceto para o Método Microsupensão, em que foi considerada uma distribuição empírica.

5. ANÁLISE INFERENCIAL

Para cada uma das linhagens, foram calculados intervalos de validação para o número médio de colônias dos controles negativos, os quais estão dispostos na tabela 4.3. Estes intervalos têm como objetivo validar o ensaio, ou seja, só será dada continuidade no ensaio caso nenhuma das placas apresentem número de colônias de revertentes espontâneos fora do intervalo descrito na tabela 4.3. Para o cálculo destes intervalos, primeiramente foram realizados alguns testes (ANOVA) para verificarmos se existia alguma diferença entre métodos e ativação metabólica, para cada uma das linhagens. Foi verificado que existe efeito de interação entre as variáveis, método e ativação metabólica para a linhagem TA100, a um nível de 5% de significância ($p = 0,02$). Entretanto, para este caso, se considerarmos o nível de significância igual a 1%, não teremos evidências para rejeitar a hipótese de que não há interação entre as duas variáveis. Para analisarmos os efeitos de interações entre as variáveis, método e ativação metabólica, também foram construídos gráficos para cada uma das linhagens, que podem ser visualizados nas figuras B.61 à B.65.

Os resultados destes testes estão dispostos nas tabelas A.32 à A.35. Embora os resultados tenham sido estatisticamente significante para as linhagens TA98, TA100 e YG1041, só foi considerada biologicamente significante a diferença de médias do número médio de controles negativos para a linhagem TA98. Portanto, a tabela 4.3 foi construída de acordo com estes resultados.

Tabela 4.3. Intervalos de validação para o número médio de colônias dos controles negativos.

Linhagem	Método	99,0%	95,0%	90,0%
TA98	Incorp. em Placas/ Microsuspensão / Ames com pré-incubação	[3;53]	[8;47]	[12;44]
TA98	Direto	[8;54]	[13;49]	[16;46]
TA100	Incorp. em Placas/ Microsuspensão / Direto	[73;210]	[83;186]	[89;174]
YG1041	Incorp. em Placas/ Microsuspensão / Ames com pré-incubação	[53;199]	[72;182]	[81;173]
YG1042	Incorp. em Placas/ Ames com pré-incubação	[27;215]	[48;193]	[60;182]
YG1042	Microsuspensão (Sem S9)*	[63;249]	[68;195]	[70;166]
YG1042	Microsuspensão (Com S9)*	[43;285]	[67;208]	[72;189]

* Estes intervalos foram calculados com base na distribuição empírica

Para detectar efeitos mutagênicos e quantificar a potência da mutagenicidade do tipo de composto químico sob investigação adotamos o seguinte modelo proposto por Lawrence (Lawrence et al.,1981):.

$$Y_{ij} = [B_j + S_j * x_{ij}] * e^{-T_j * x_{ij}} + \varepsilon_{ij} \quad (1.1)$$

em que

Y_{ij} : Número médio de colônias revertentes sob a dose i no ensaio j ;

X_{ij} : Valor da dose i no ensaio j ;

B_j : Número médio de revertentes espontâneos (controles negativos) no ensaio j ; $B_j > 0$;

S_j : Inclinação da curva de reversão no ensaio j ; $S_j > 0$.

T_j : Constante de toxicidade no ensaio j ; $T_j > 0$.

ε_{ij} : Erro aleatório associado à dose i no ensaio j .

Assumimos que os ε_{ij} , são identicamente distribuídos com média 0.

Existe a suposição de que a variância do número de colônias observado varie conforme aumente a média do número de colônias para cada dose observada em cada ensaio. Porém, observando os gráficos apresentados nas figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 e a baixa correlação (0,28) entre a média e a variância observada nos ensaios em estudo, não consideramos no nosso trabalho a correção sugerida no artigo.

Figura 5.1. Gráfico Dose x Número de revertentes (TA 100)

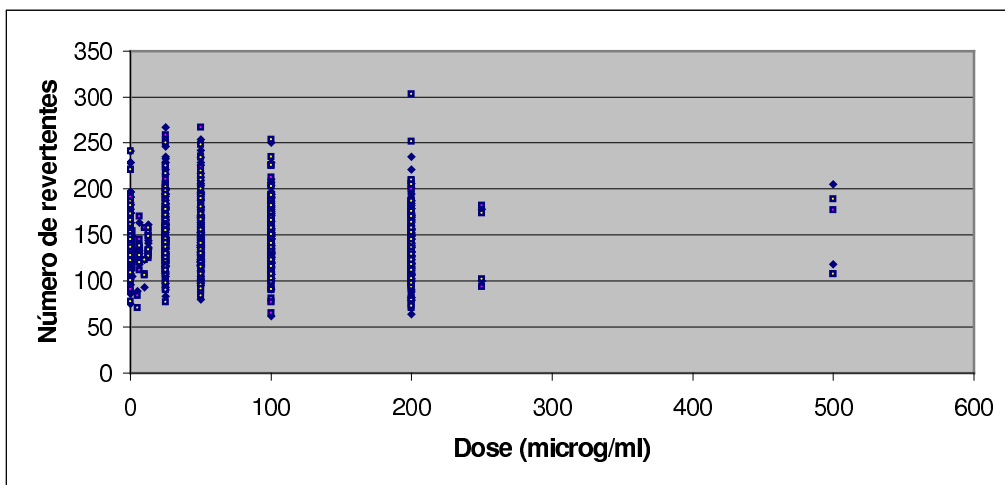


Figura 5.2. Gráfico de dispersão do log da variância X log da média do número de revertentes TA 100.

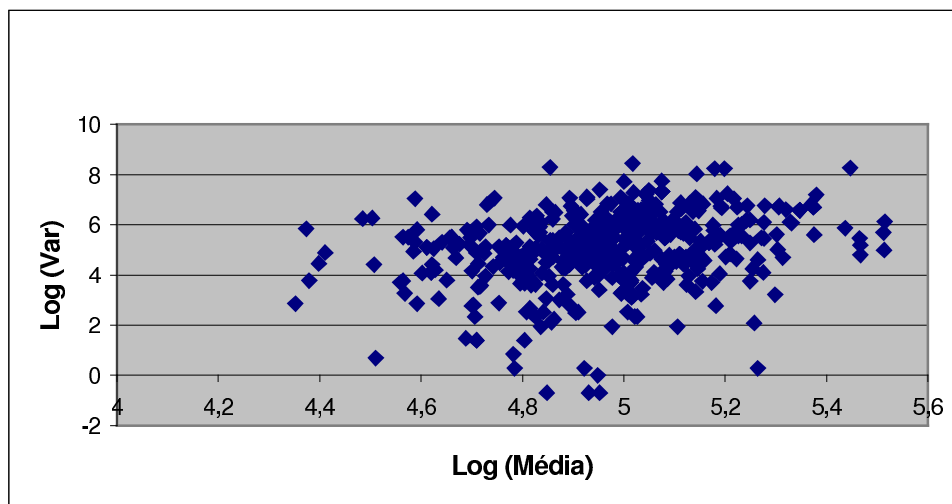


Figura 5.3. Gráfico Dose x Número de revertentes (TA 98)

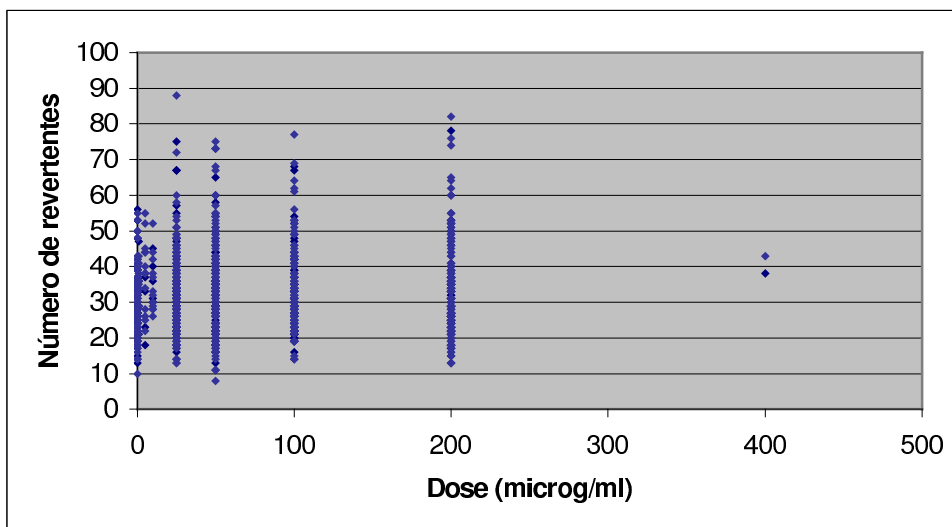
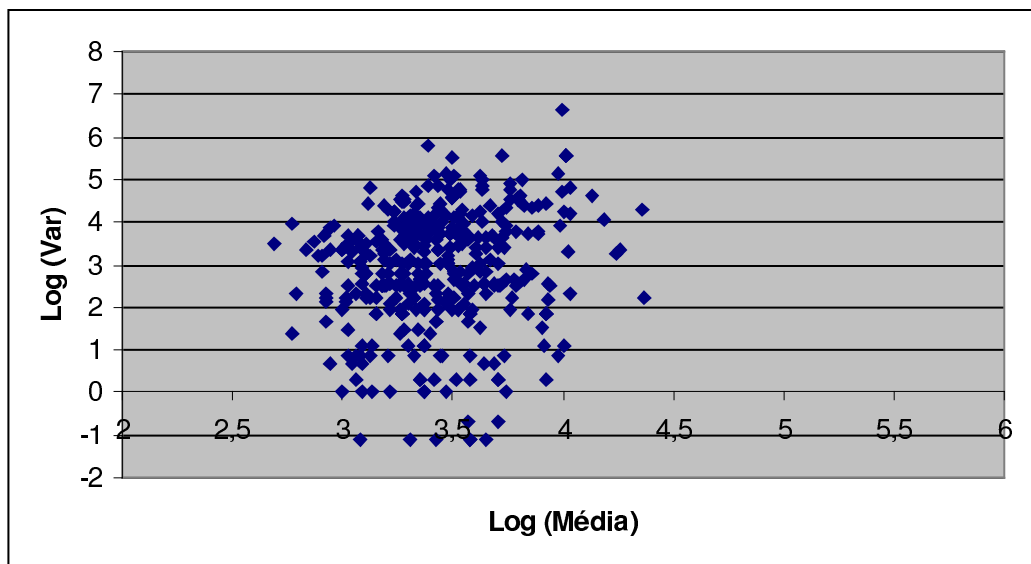


Figura 5.4. Gráfico de dispersão do log da variância X log da média do número de revertentes TA 98.



O modelo foi aplicado para os 173 ensaios presentes no banco de dados 2, banco de dados esse que continha estudos completos (dose zero e demais doses) para as linhagens TA 100 e TA98. Em cada caso, a hipótese de que o composto não é mutagênico, $H_0: S=0$ foi testada.

Foram analisados 60 ensaios de cada linhagem, os quais foram classificados mutagênicos. Utilizando as estimativas dos parâmetros S de cada um destes ensaios, construímos a correspondente distribuição empírica, apresentadas nas Figuras B.56 e B.57. Esses resultados podem ser utilizados para a classificação de um composto como mutagênico conforme a seguinte estratégia. Ao ser realizado um novo ensaio, ajusta-se o modelo e testa-se a hipótese de que $S=0$. Se a hipótese for rejeitada, o composto é considerado mutagênico e pode-se construir um intervalo de confiança para a potência da mutagenicidade. Analisando a Saída 1 (Apêndice C), observamos que o ensaio será considerado mutagênico e de potência 1,55 (estimativa do S) e a hipótese $H_0: S = 0$ deve ser rejeitada pois o intervalo de confiança para S é $[0.2896; 2.8002]$ não incluindo zero. Se a hipótese não for rejeitada, o valor deve ser comparado com a distribuição empírica das estimativas do parâmetro S obtidas de ensaios com resultados não mutagênicos. Se a estimativa de S em questão corresponder a um quantil maior que 95%, o ensaio deve ser

considerado não conclusivo. Em caso contrário o ensaio deve ser classificado como não mutagênico e a distribuição empírica correspondente deve ser atualizada.

6. CONCLUSÕES

Conforme os objetivos iniciais estabelecidos, a CETESB conta agora com novos intervalos para o número de revertentes negativos, podendo variar esse intervalo apenas para a linhagem, quanto para a combinação linhagem/método.

Um novo método foi proposto, levando-se em conta não só os dados do ensaio em estudo como também dados históricos que foram coletados. E a cada novo ensaio que seja considerado não mutagênico, os valores poderão ser incorporados ao banco de dados. Esse procedimento dinâmico torna as validações mais robustas sempre que houver aumento do banco de dados, devido a incorporação de ensaios não mutagênicos. O software foi desenvolvido no pacote estatístico SAS e está em anexo (vide Programa no apêndice C).

APÊNDICE A

Tabelas

Tabela A.1. Medidas resumo referentes ao número de colônias de bactérias para os controles negativos por linhagem

Linhagem	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
TA98	846	29	10	11	184	26
TA100	625	127	28	70	368	122
YG1041	311	121	37	36	244	116
YG1042	413	100	33	43	285	90

Tabela A.2. Medidas resumo referentes ao número de colônias de bactérias para os controles negativos - linhagem TA98

Método	Com S9					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Ames - Incorporação em Placas	132	29	6	14	54	28
Ames com pré-incubação	10	29	4	24	37	27
Kado	237	30	15	12	184	26
Direto	44	33	9	19	62	32
Método	Sem S9					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Ames - Incorporação em Placas	132	27	7	12	76	25
Ames com pré-incubação	11	26	7	18	43	25
Kado	234	28	7	11	64	26
Direto	46	29	9	17	65	26

Tabela A.3. Medidas resumo referentes ao número de colônias de bactérias para os controles negativos - linhagem TA100

Método	Com S9					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Ames - Incorporação em Placas	124	114	21	81	183	110
Kado	147	137	28	83	238	137
Direto	42	135	24	85	204	131
Método	Sem S9					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Ames - Incorporação em Placas	120	118	23	70	187	116
Kado	148	129	32	79	368	122
Direto	44	136	23	90	186	133

Tabela A.4. Medidas resumo referentes ao número de colônias de bactérias para os controles negativos - linhagem YG1041

Método	Com S9					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Ames - Incorporação em Placas	38	112	25	64	207	109
Ames com pré-incubação	8	98	16	84	134	91
Kado	112	115	39	46	244	108
Método	Sem S9					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Ames - Incorporação em Placas	38	123	32	66	201	120
Ames com pré-incubação	8	100	10	88	118	99
Kado	107	135	39	36	242	130

Tabela A.5. Medidas resumo referentes ao número de colônias de bactérias para os controles negativos - linhagem YG1042

Método	Com S9					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Ames - Incorporação em Placas	31	97	29	68	187	85
Ames com pré-incubação	11	101	10	88	126	97
Kado	163	102	38	43	285	91
Método	Sem S9					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Ames - Incorporação em Placas	30	95	27	63	172	87
Ames com pré-incubação	11	96	9	80	111	98
Kado	167	99	33	63	249	89

Tabela A.6. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA98/Método Incorporação em Placas (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.511	0.581	0.520	0.587
R2		1.000	0.539	0.630	0.644
R3			1.000	0.637	0.594
R4				1.000	0.647
R5					1.000

Tabela A.7. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA98/Método Incorporação em Placas (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.690	0.736	0.639	0.707
R2		1.000	0.592	0.551	0.681
R3			1.000	0.735	0.734
R4				1.000	0.706
R5					1.000

Tabela A.8. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA98/Método Ames com pré-incubação (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0,272	0,058	0,348	0,197
R2		1.000	0,655	0,781	0,990
R3			1.000	0,310	0,669
R4				1.000	0,714
R5					1.000

Tabela A.9. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA98/Método Ames com pré-incubação (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.950	0.795	0.935	0.847
R2		1.000	0.837	0.951	0.903
R3			1.000	0.799	0.762
R4				1.000	0.955
R5					1.000

Tabela A.10. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA98/Método Direto (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.755	0.830	0.765	0.786
R2		1.000	0.686	0.590	0.687
R3			1.000	0.706	0.800
R4				1.000	0.776
R5					1.000

Tabela A.11. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA98/Método Direto (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.752	0.709	0.698	0.734
R2		1.000	0.823	0.585	0.654
R3			1.000	0.721	0.754
R4				1.000	0.794
R5					1.000

Tabela A.12. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA98/Método Microsuspensão (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.919	0.908	0.863	0.840
R2		1.000	0.928	0.842	0.864
R3			1.000	0.869	0.841
R4				1.000	0.838
R5					1.000

Tabela A.13. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA98/Método Microsuspensão (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.705	0.650	0.689	0.774
R2		1.000	0.731	0.701	0.701
R3			1.000	0.659	0.639
R4				1.000	0.703
R5					1.000

Tabela A.14. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA100/Método Incorporação em Placas (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.716	0.665	0.686	0.679
R2		1.000	0.757	0.759	0.754
R3			1.000	0.787	0.721
R4				1.000	0.761
R5					1.000

Tabela A.15. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA100/Método Incorporação em Placas (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.782	0.717	0.785	0.774
R2		1.000	0.770	0.842	0.787
R3			1.000	0.769	0.740
R4				1.000	0.813
R5					1.000

Tabela A.16. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA100/Método Direto (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.851	0.849	0.797	0.680
R2		1.000	0.824	0.798	0.772
R3			1.000	0.830	0.738
R4				1.000	0.726
R5					1.000

Tabela A.17. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA100/Método Direto (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.808	0.778	0.817	0.806
R2		1.000	0.847	0.756	0.788
R3			1.000	0.756	0.798
R4				1.000	0.766
R5					1.000

Tabela A.18. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA100/Método Microsuspensão (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.850	0.806	0.805	0.822
R2		1.000	0.796	0.830	0.813
R3			1.000	0.826	0.808
R4				1.000	0.833
R5					1.000

Tabela A.19. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem TA100/Método Microsuspensão (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.869	0.897	0.868	0.887
R2		1.000	0.884	0.870	0.883
R3			1.000	0.888	0.906
R4				1.000	0.888
R5					1.000

Tabela A.20. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1041/Método Incorporação em Placas (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.825	0.766	0.693	0.798
R2		1.000	0.727	0.793	0.749
R3			1.000	0.786	0.707
R4				1.000	0.769
R5					1.000

Tabela A.21. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1041/Método Incorporação em Placas (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.851	0.833	0.831	0.839
R2		1.000	0.938	0.864	0.861
R3			1.000	0.887	0.899
R4				1.000	0.861
R5					1.000

Tabela A.22. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1041/Método Ames com pré-incubação (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1,000	0,933	0,798	0,922	0,711
R2		1,000	0,722	0,916	0,634
R3			1,000	0,905	0,348
R4				1,000	0,583
R5					1,000

Tabela A.23. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1041/Método Ames com pré-incubação (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1,000	0,820	0,116	0,837	0,527
R2		1,000	0,296	0,842	0,580
R3			1,000	0,391	0,487
R4				1,000	0,786
R5					1,000

Tabela A.24. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1041/Método Microsuspensão (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1,000	0,900	0,921	0,912	0,908
R2		1,000	0,902	0,924	0,925
R3			1,000	0,924	0,924
R4				1,000	0,918
R5					1,000

Tabela A.25. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1041/Método Microsuspensão (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1,000	0,886	0,869	0,846	0,839
R2		1,000	0,918	0,885	0,862
R3			1,000	0,883	0,865
R4				1,000	0,876
R5					1,000

Tabela A.26. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1042/Método Incorporação em Placas (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1,000	0,919	0,935	0,916	0,868
R2		1,000	0,912	0,914	0,891
R3			1,000	0,926	0,900
R4				1,000	0,918
R5					1,000

Tabela A.27. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1042/Método Incorporação em Placas (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1,000	0,921	0,907	0,889	0,849
R2		1,000	0,812	0,848	0,848
R3			1,000	0,887	0,811
R4				1,000	0,883
R5					1,000

Tabela A.28. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1042/Método Ames com pré-incubação (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1,000	0,290	0,674	0,756	0,609
R2		1,000	0,178	0,213	0,011
R3			1,000	0,496	0,506
R4				1,000	0,820
R5					1,000

Tabela A.29. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1042/Método Ames com pré-incubação (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1,000	0,374	0,507	0,397	0,333
R2		1,000	0,788	0,546	0,240
R3			1,000	0,421	0,283
R4				1,000	0,088
R5					1,000

Tabela A.30. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1042/Método Microsuspensão (Com S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.939	0.933	0.942	0.935
R2		1.000	0.929	0.941	0.940
R3			1.000	0.920	0.924
R4				1.000	0.954
R5					1.000

Tabela A.31. Correlações entre respostas obtidas nas cinco réplicas de controles negativos para linhagem YG1042/Método Microsuspensão (Sem S9)

	R1	R2	R3	R4	R5
R1	1.000	0.925	0.891	0.887	0.881
R2		1.000	0.898	0.902	0.864
R3			1.000	0.906	0.877
R4				1.000	0.901
R5					1.000

Tabela 32. Resultado da ANOVA, para as variáveis Método e Ativação Metabólica (linhagem TA98)

HIPÓTESES:

H_0 : Não existe diferença entre o número médio de colônias para controles negativos, para as variáveis método e ativação metabólica.

H_1 : Existe pelo menos uma diferença entre o número médio de colônias dos controles negativos, para as variáveis método e ativação metabólica.

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	Estatística F	Nível Descritivo
Metodo	3	962,59	320,86	3,25	0,02
Ativacao	1	444,22	444,22	4,50	0,03
Metodo*Ativacao	3	55,14	18,38	0,19	0,91
Erro	838	82.805,32	98,81		
Total	845	84.990,30			

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	Estatística F	Nível Descritivo
Metodo	3	954,89	318,30	3,23	0,02
Ativacao	1	1.184,92	1.184,92	12,03	0,00
Error	841	82.860,46	98,53		
Total	845				

COMPARAÇÃO		Diferença entre as médias	Intervalo de Confiança 95%
Método	Direto - Ames sem pré-incubação	3,6818	[0.5629;6.8007]
Ativação	Com S9 - Sem S9	2.367	[1.027;3.707]

Tabela 33. Resultado da ANOVA, para as variáveis Método e Ativação Metabólica (linhagem TA100)

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	Estatística F	Nível Descritivo
Metodo	2	2,70	1,35	35,67	0,00
Ativacao	1	0,01	0,01	0,22	0,64
Metodo*Ativacao	2	0,28	0,14	3,76	0,02
Erro	619	23,42	0,04		
Total	624				

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	Estatística F	Nível Descritivo
Metodo	2	2,72	1,36	35,57	0,00
Ativacao	1	0,04	0,04	1,11	0,29
Error	621	23,70	0,04		
Total	624				

COMPARAÇÃO		Diferença entre as médias	Intervalo de Confiança 95%
Método	Direto - Ames sem pré-incubação	1.16	[1.10;1.23]
Método	Kado - Ames sem pré-incubação	1.13	[1.09;1.18]

Tabela 34. Resultado da ANOVA, para as variáveis Método e Ativação Metabólica (linhagem YG1041)

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	Estatística F	Nível Descritivo
Metodo	2	0,56	0,28	3,29	0,04
Ativacao	1	0,24	0,24	2,80	0,10
Metodo*Ativacao	2	0,17	0,08	0,97	0,38
Erro	305	26,12	0,09		
Total	310				

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	Estatística F	Nível Descritivo
Metodo	2	0,56	0,28	3,28	0,04
Ativacao	1	1,55	1,55	18,12	0,00
Error	307	26,29	0,09		
Total	310				

COMPARAÇÃO		Diferença entre as médias	Intervalo de Confiança 95%
Método	Direto - Ames sem pré-incubação	1.21	[1.01;1.40]
Ativação	Com S9 - Sem S9	1.15	[1.08;1.23]

Tabela 35. Resultado da ANOVA, para as variáveis Método e Ativação Metabólica (linhagem YG1042)

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	Estatística F	Nível Descritivo
Metodo	1	0,06	0,06	1,07	0,30
Ativacao	1	0,01	0,01	0,25	0,62
Metodo*Ativacao	1	0,00	0,00	0,08	0,77
Erro	79	4,10	0,05		
Total	82				

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	Estatística F	Nível Descritivo
Metodo	1	0,06	0,06	1,09	0,30
Ativacao	1	0,01	0,01	0,17	0,68
Error	80	4,10	0,05		
Total	82				

Tabela 36. Estimativas da média dos controles negativos (B), da inclinação da curva (S) e da taxa de toxicidade (T), para ensaios realizados com as linhagens TA98 e TA100

TA98						TA100					
B	S	T	B	S	T	B	S	T	B	S	T
26.64	0.17	0.00	19.45	0.40	0.01	159.12	2.00	0.01	141.65	0.30	0.00
28.59	0.03	0.00	28.26	0.01	0.00	138.07	2.09	0.01	151.62	0.15	0.00
27.16	0.33	0.00	27.35	0.14	0.00	153.65	0.47	0.00	150.28	1.16	0.00
24.10	0.09	0.00	31.89	0.01	0.00	183.68	0.15	0.00	137.02	0.24	0.00
26.38	0.21	0.00	42.31	0.24	0.00	152.11	0.20	0.00	130.39	2.65	0.01
20.97	0.34	0.01	21.22	0.02	0.00	109.36	1.02	0.01	147.55	0.07	0.00
23.68	0.08	0.00	26.70	0.18	0.00	100.40	1.49	0.01	124.68	2.85	0.02
51.88	0.23	0.00	25.55	0.18	0.00	154.14	0.87	0.00	132.50	3.28	0.02
25.18	0.03	0.00	31.88	0.02	0.00	140.48	0.97	0.00	110.38	3.42	0.01
25.79	0.01	0.00	23.98	0.02	0.00	140.40	0.44	0.00	128.14	1.60	0.01
30.72	0.17	0.00	39.57	0.39	0.01	166.02	1.72	0.01	144.84	0.00	0.00
27.34	0.02	0.00	19.30	0.01	0.00	153.27	1.17	0.00	138.07	0.23	0.00
31.27	0.32	0.00	28.02	0.30	0.01	157.31	2.07	0.01	120.15	1.21	0.01
24.47	0.08	0.00	32.00	0.39	0.00	104.89	0.99	0.01	158.30	0.72	0.00
33.83	0.02	0.00	25.92	0.10	0.00	107.27	0.79	0.00	114.38	0.13	0.00
24.37	0.04	0.00	29.11	0.06	0.00	150.55	0.73	0.00	87.80	0.17	0.00
35.73	0.00	0.00	19.78	0.16	0.00	133.57	0.88	0.00	126.51	1.34	0.01
20.25	0.55	0.01	21.00	0.04	0.00	113.44	0.05	0.00	114.83	0.89	0.00
23.92	0.51	0.01	24.07	0.09	0.00	140.14	0.97	0.01	134.11	0.01	0.00
20.79	0.01	0.00	20.54	0.13	0.00	144.95	1.62	0.01	163.59	3.79	0.01
28.25	0.03	0.00	59.15	0.70	0.01	131.39	0.17	0.00	158.60	0.88	0.00
51.39	0.46	0.00	24.20	0.33	0.00	104.12	1.06	0.00	158.40	1.62	0.01
16.01	0.17	0.00	40.11	0.40	0.00	175.02	1.28	0.01	182.89	2.64	0.01
20.30	0.13	0.00	32.63	2.61	0.03	142.69	0.03	0.00	157.49	4.77	0.01
27.76	0.28	0.01	20.79	1.18	0.01	100.36	0.43	0.00	142.07	1.23	0.00
52.40	0.57	0.01	27.67	0.53	0.00	145.30	0.00	0.00	161.73	1.48	0.01
32.70	0.09	0.00	24.74	0.18	0.00	152.75	1.22	0.00	148.36	1.05	0.00
25.31	0.33	0.01	33.24	0.24	0.00	179.29	0.80	0.00	159.53	1.65	0.01
29.31	0.11	0.00	32.05	1.14	0.01	144.76	1.96	0.01	137.14	0.77	0.00
37.29	0.29	0.00	35.50	0.73	0.01	155.59	0.64	0.00	116.43	0.00	0.00

APÊNDICE B

Gráficos

Linhagem: TA98

Figura B.1. Gráficos de perfis para o método de Ames – Incorporação em Placas

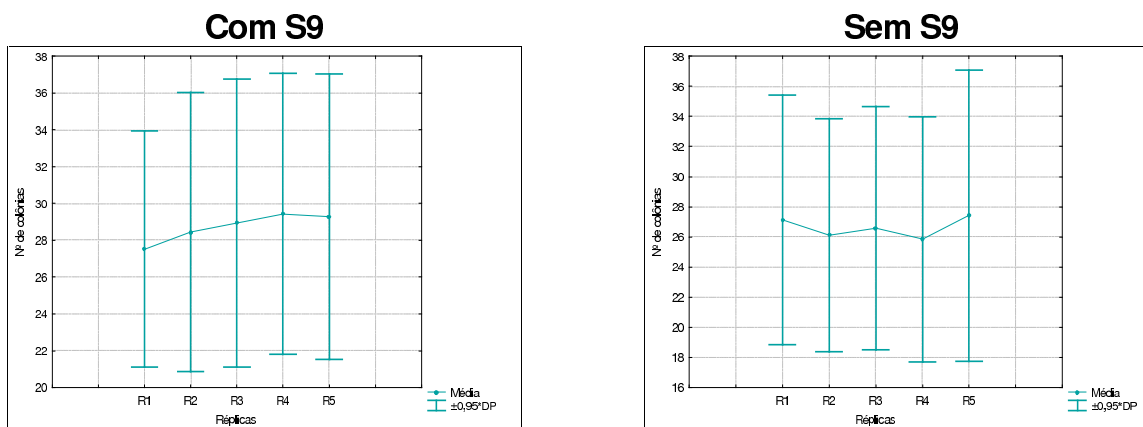
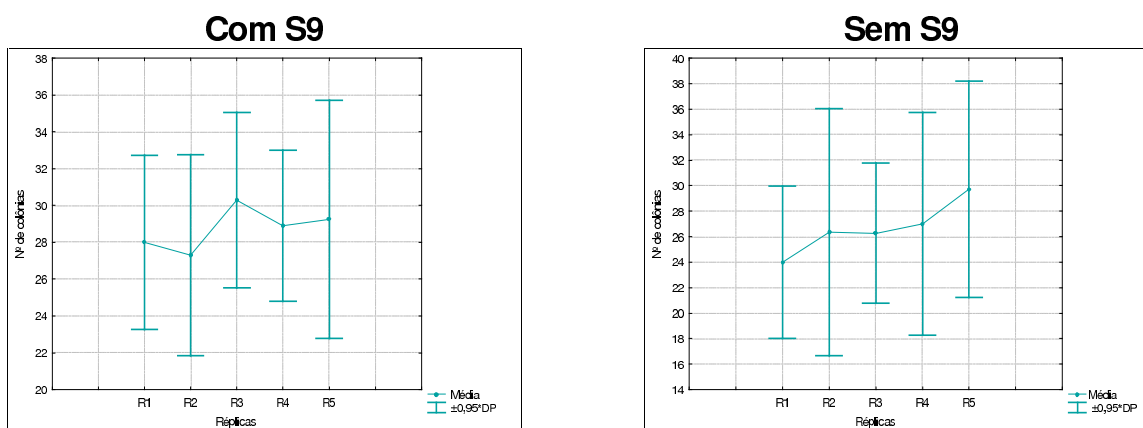


Figura B.2. Gráficos de perfis para o método de Ames com pré-incubação



Linhagem: TA98

Figura B.3. Gráficos de perfis para o método de Kado

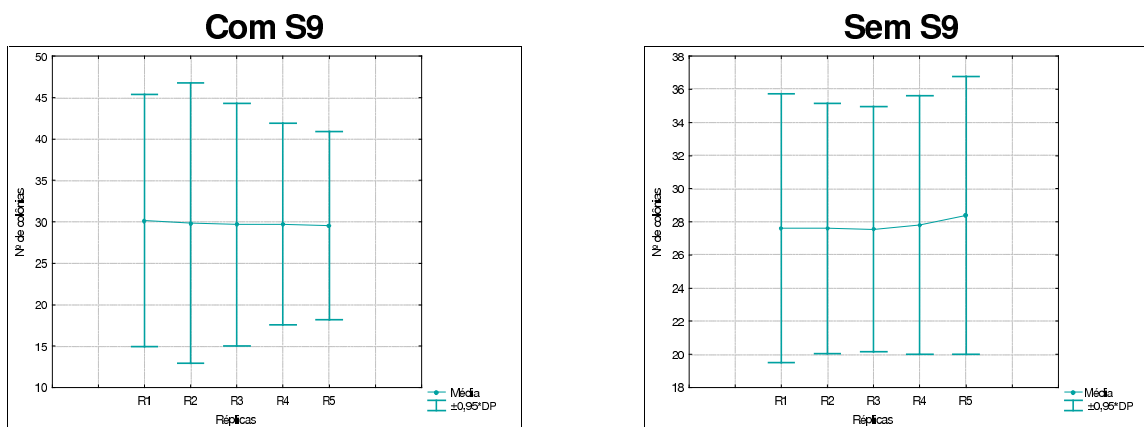
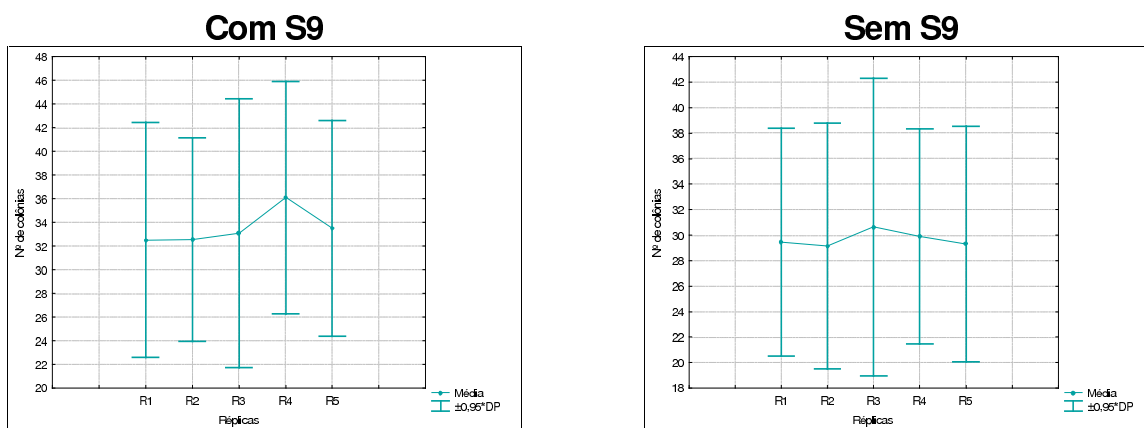


Figura B.4. Gráficos de perfis para o método de Direto



Linhagem: TA100

Figura B.5. Gráficos de perfis para o método de Ames – Incorporação em Placas

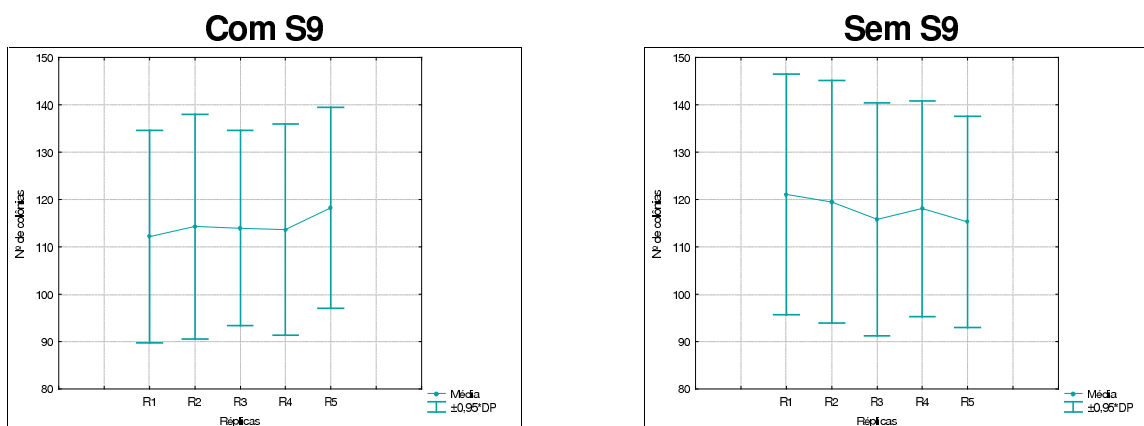


Figura B.6. Gráficos de perfis para o método de Kado

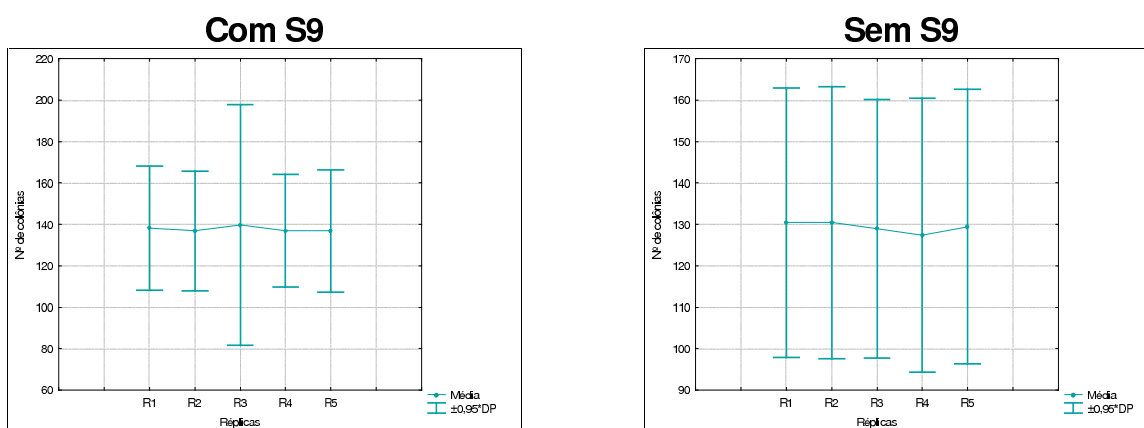
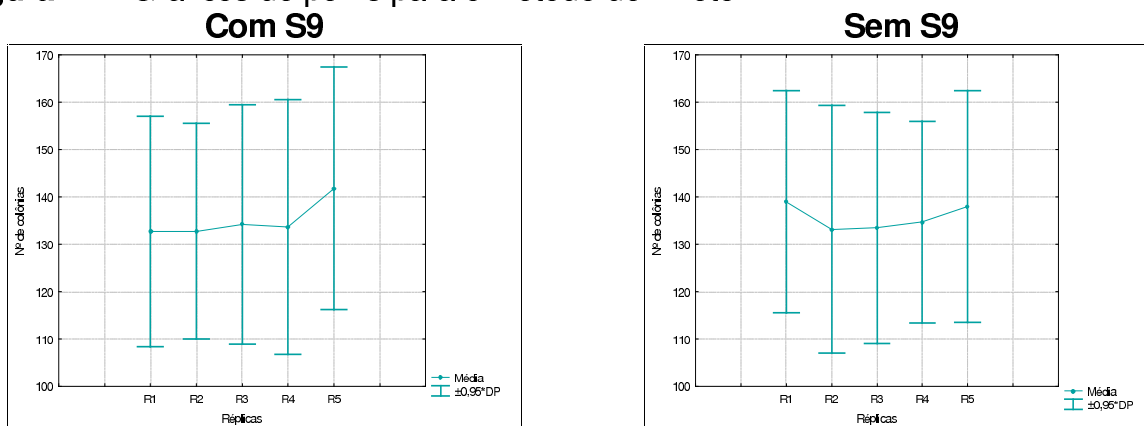


Figura B.7. Gráficos de perfis para o método de Direto



Linhagem: YG1041

Figura B.8. Gráficos de perfis para o método de Ames – Incorporação em Placas

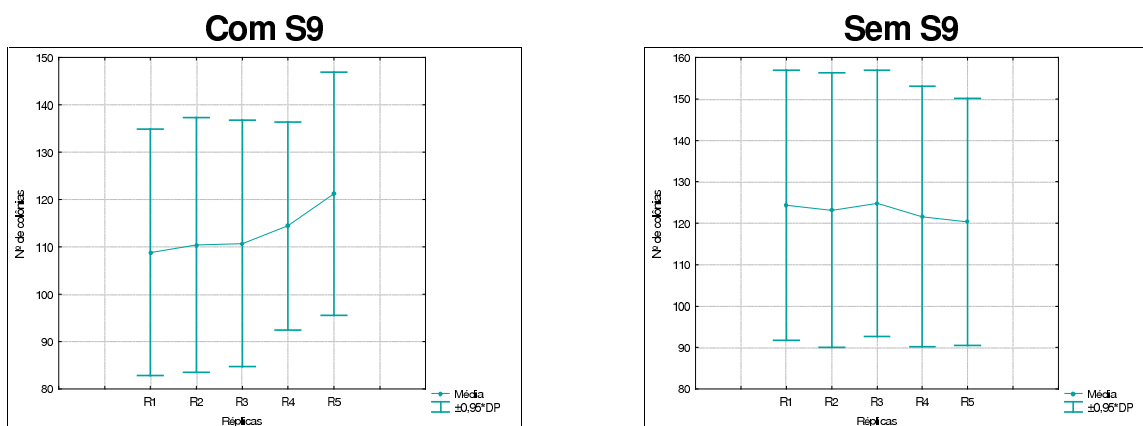


Figura B.9. Gráficos de perfis para o método de Ames com pré-incubação

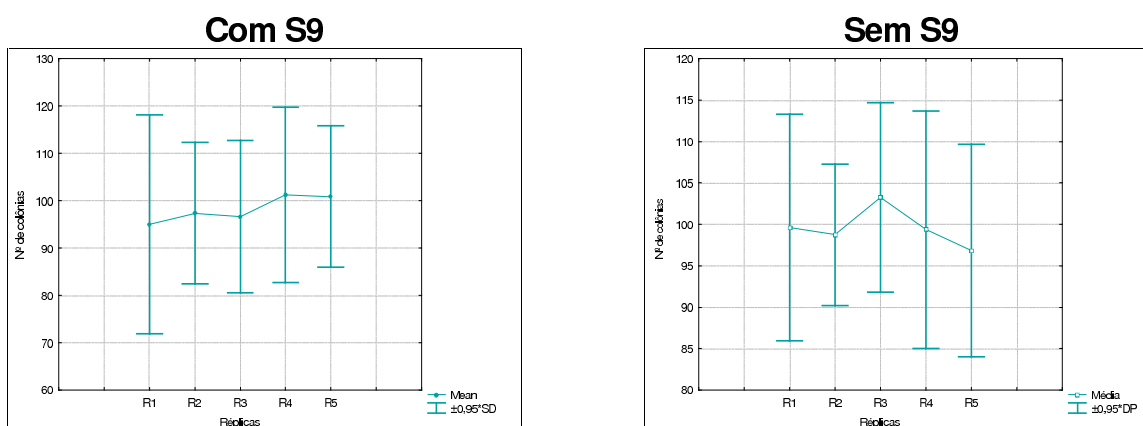
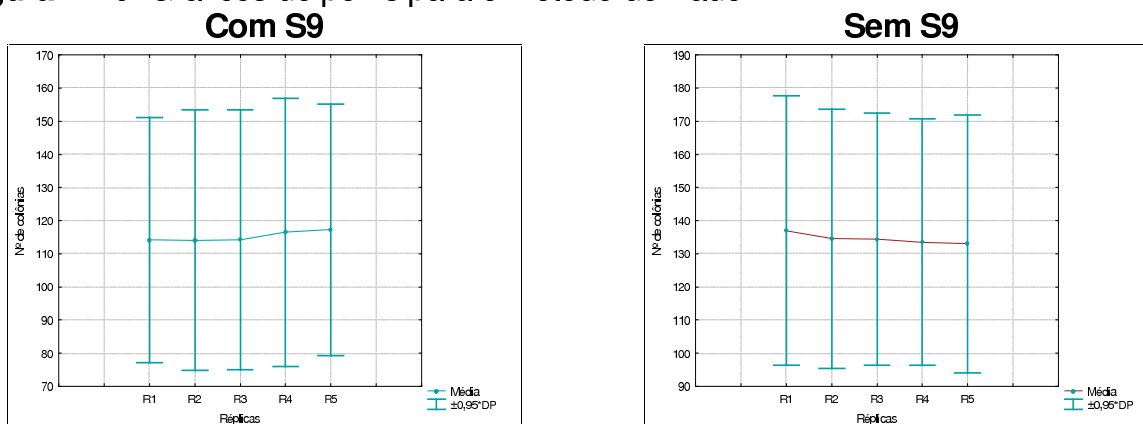


Figura B.10. Gráficos de perfis para o método de Kado



Linhagem: YG1042

Figura B.11. Gráficos de perfis para o método de Ames – Incorporação em Placas

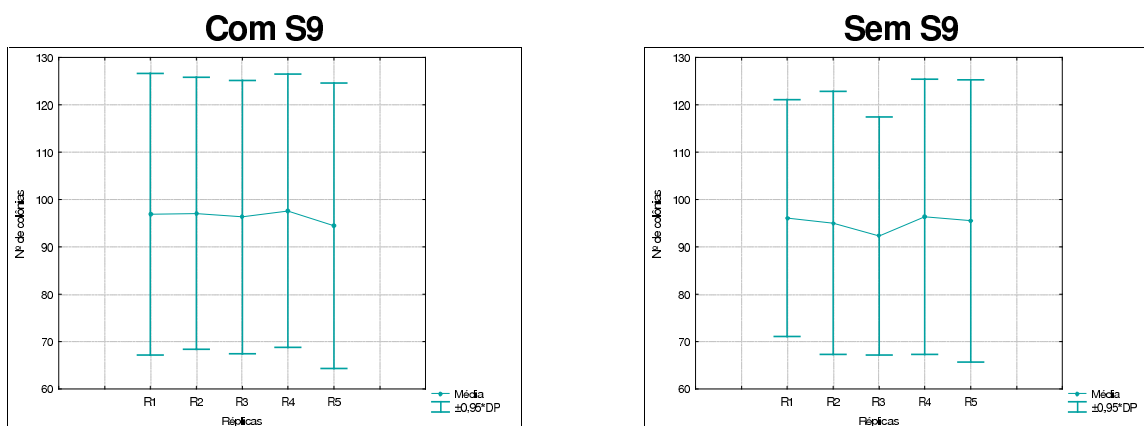


Figura B.12. Gráficos de perfis para o método de Ames com pré-incubação

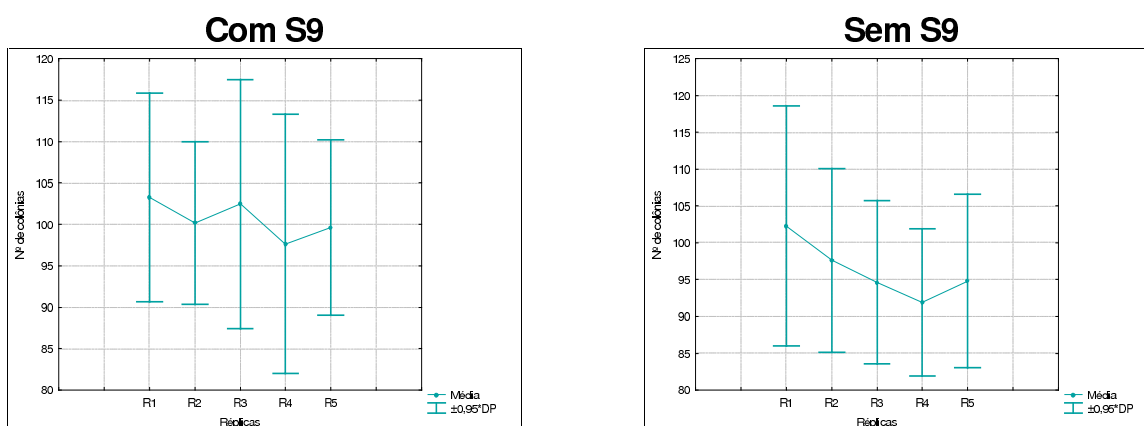


Figura B.13. Gráficos de perfis para o método de Kado

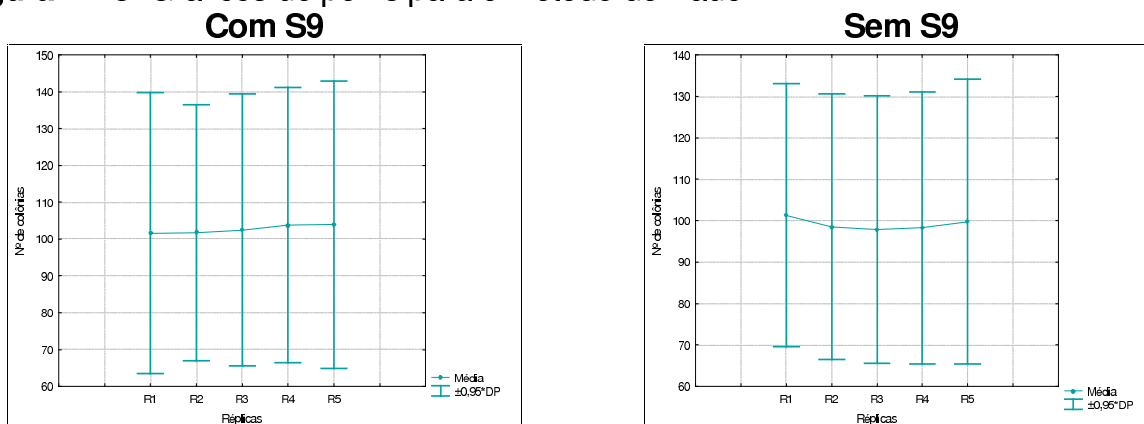


Figura B.14. Box Plot para linhagem TA98, por método e ativação metabólica

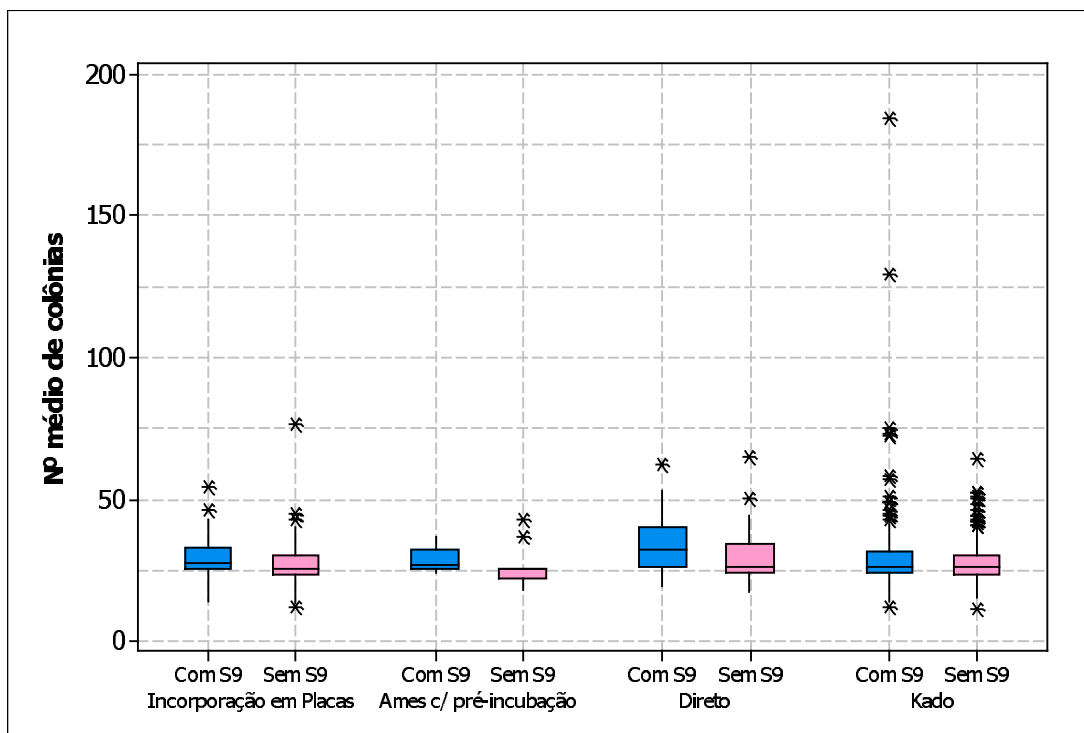


Figura B.15. Box Plot para linhagem TA100, por método e ativação metabólica

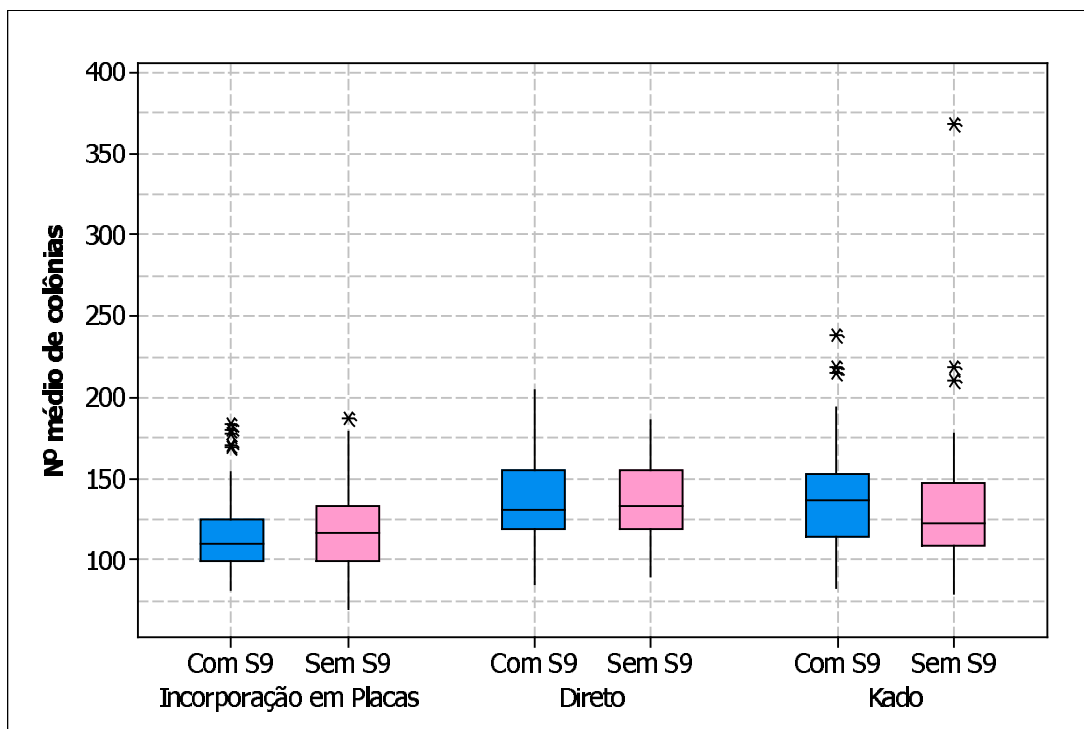


Figura B.16. Box Plot para linhagem YG1041, por método e ativação metabólica

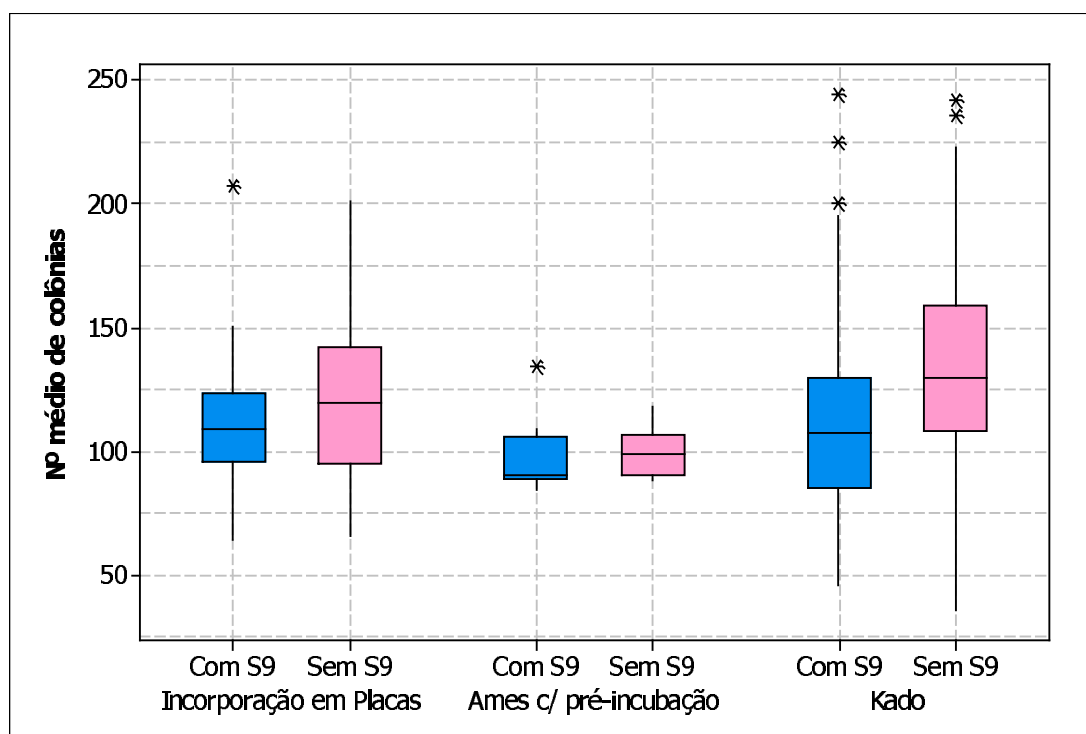
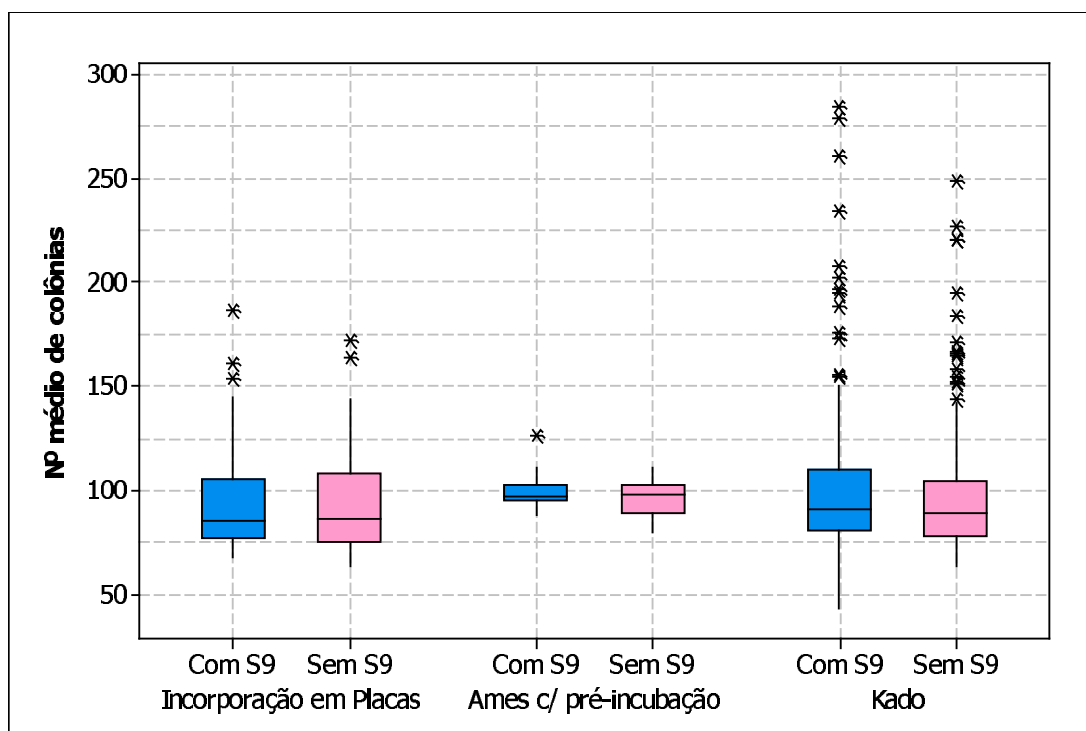


Figura B.17. Box Plot para linhagem YG1042, por método e ativação metabólica



Linhagem: TA98

Figura B.18. Histogramas para o método de Ames sem pré-incubação

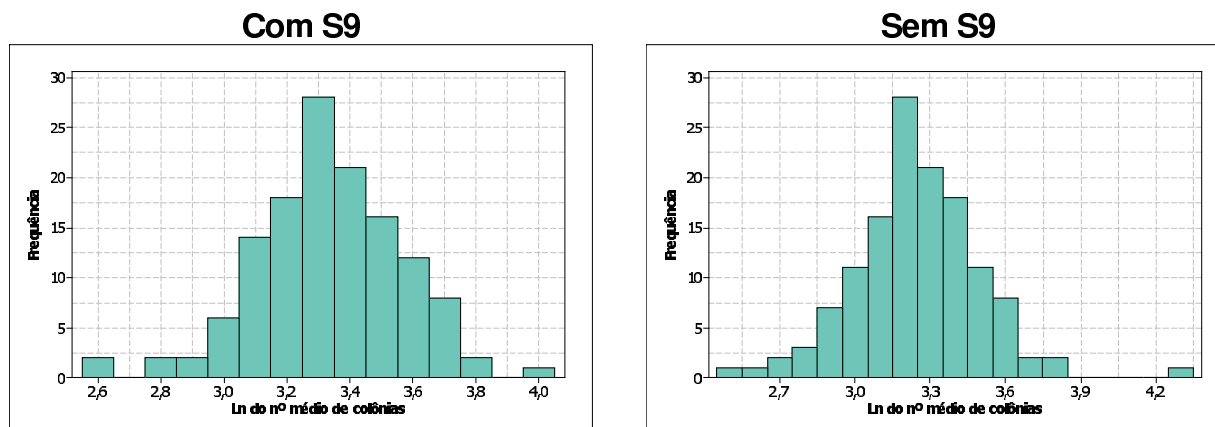


Figura B.19. Histogramas para o método de Kado

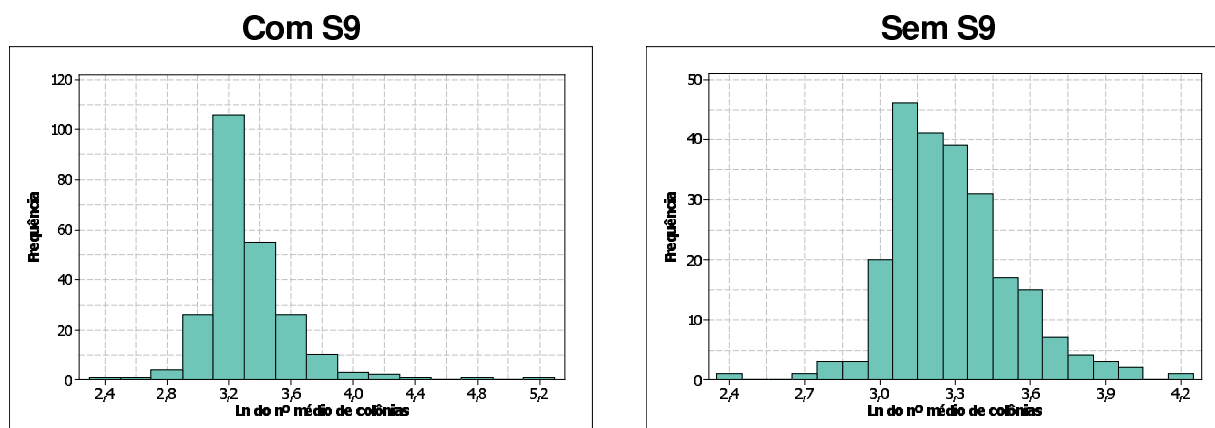


Figura B.20. Histogramas para o método de Direto

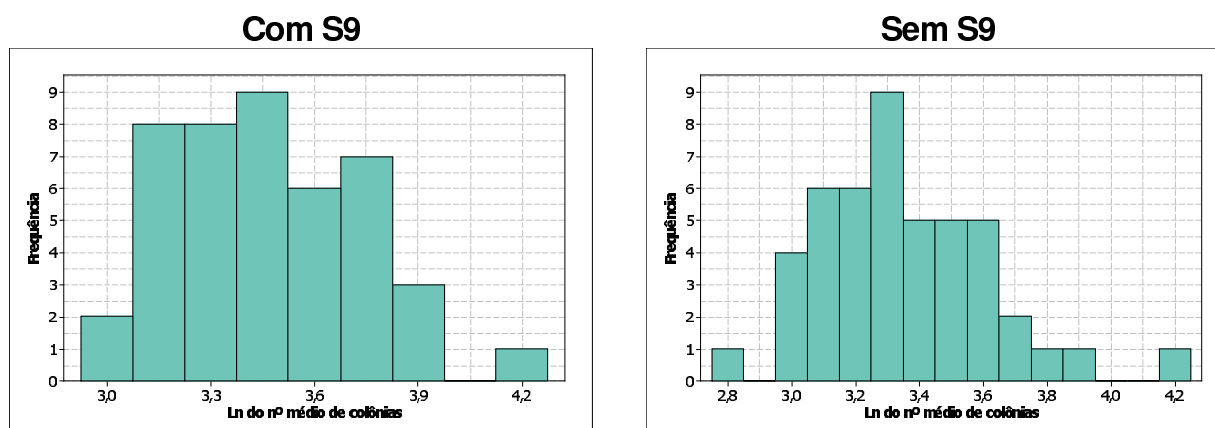
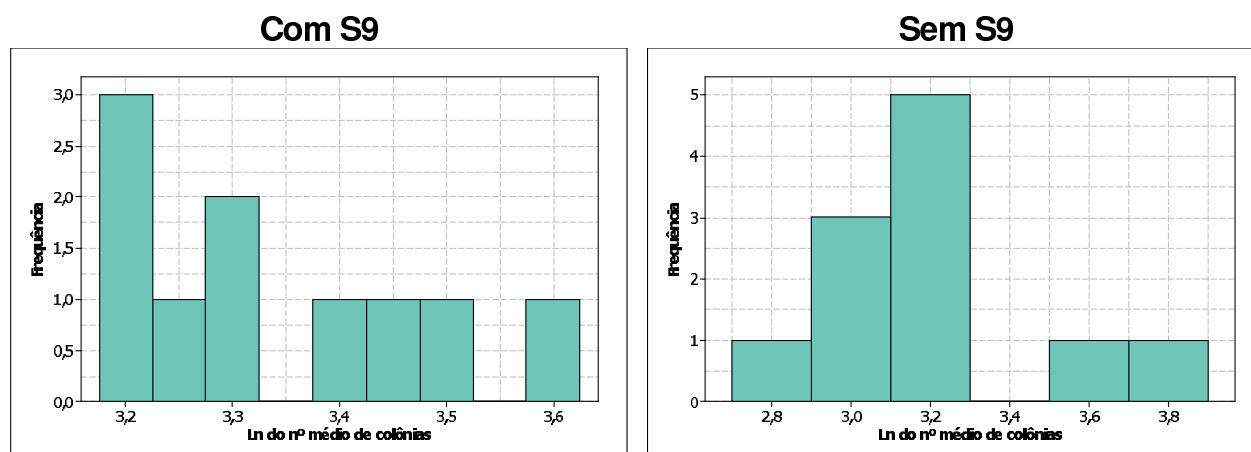


Figura B.21. Histogramas para o método Ames com pré-incubação



Linhagem: TA100

Figura B.22. Histogramas para o método de Ames sem pré-incubação

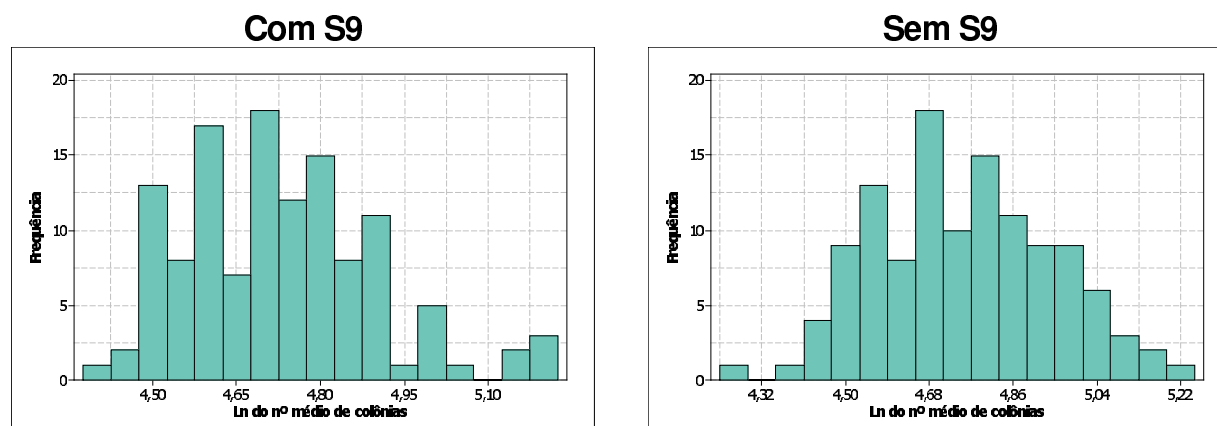


Figura B.23. Histogramas para o método de Kado

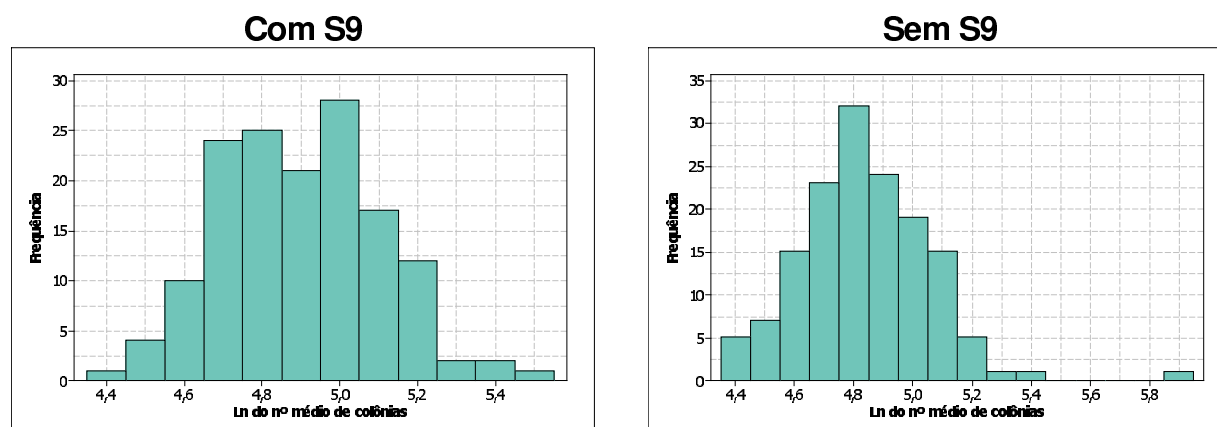
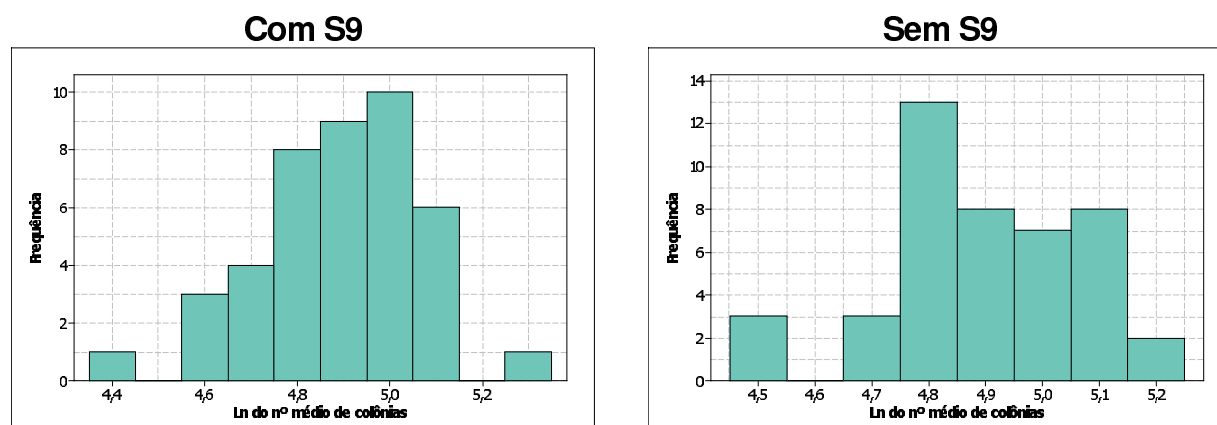


Figura B.24. Histogramas para o método de Direto



Linhagem: YG1041

Figura B.25. Histogramas para o método de Ames sem pré-incubação

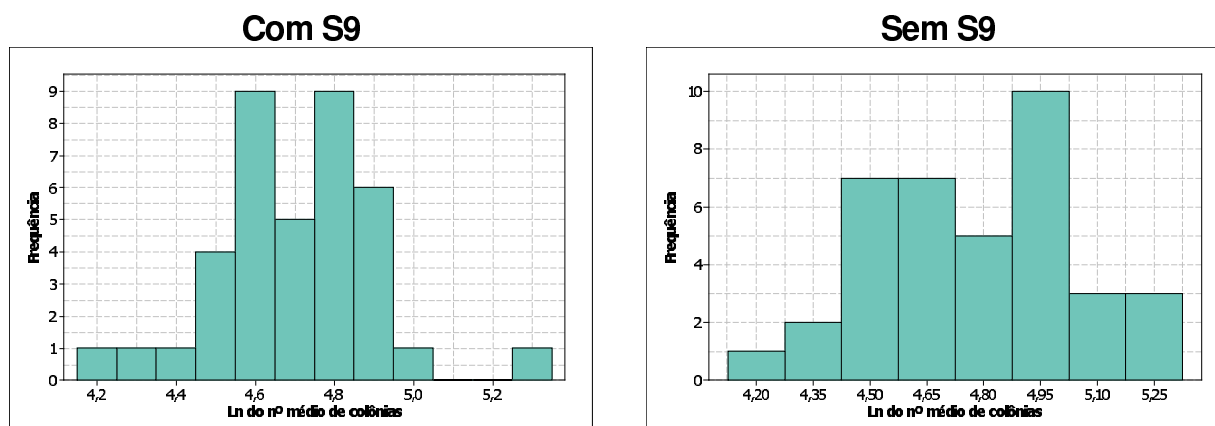


Figura B.26. Histogramas para o método de Kado

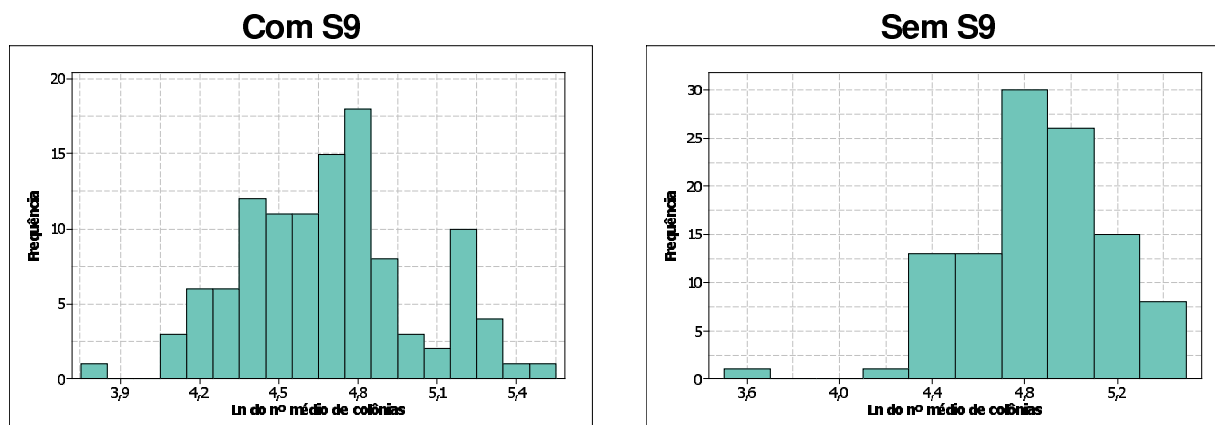
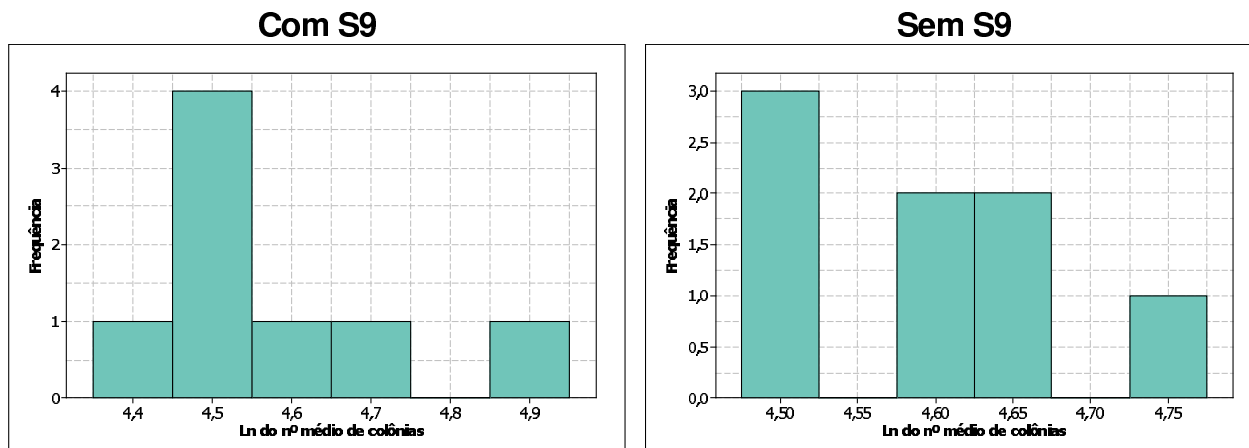


Figura B.27. Histogramas para o método Ames com pré-incubação



Linhagem: YG1042

Figura B.28. Histogramas para o método de Ames sem pré-incubação

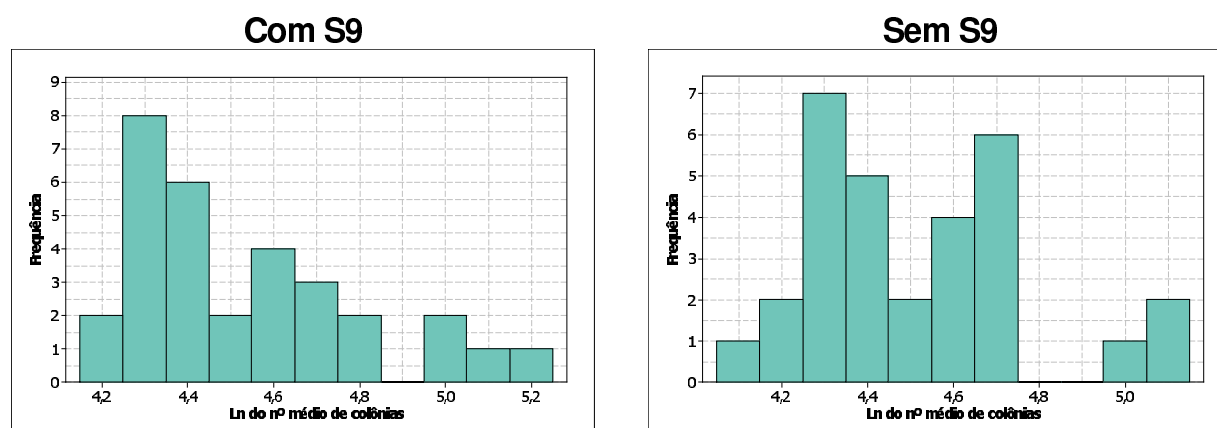


Figura B.29. Histogramas para o método de Kado

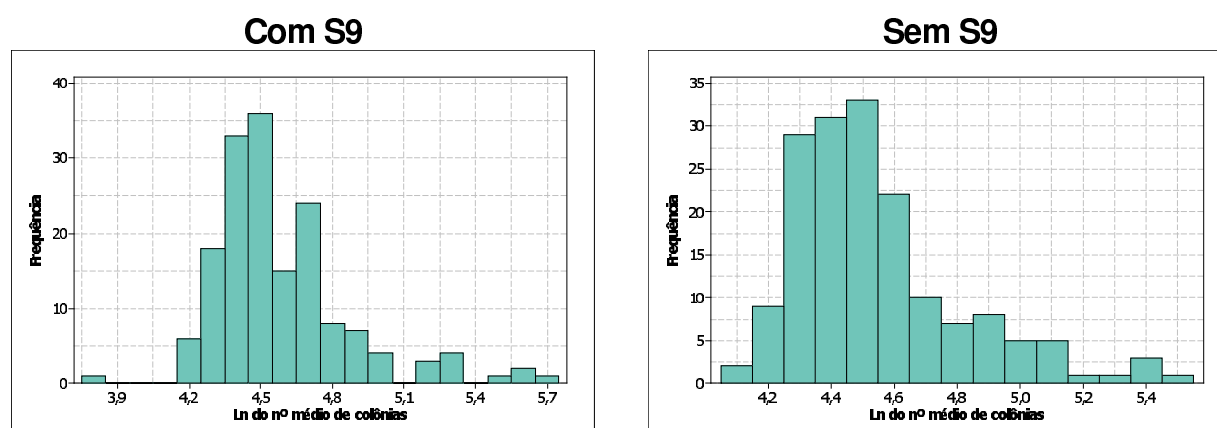
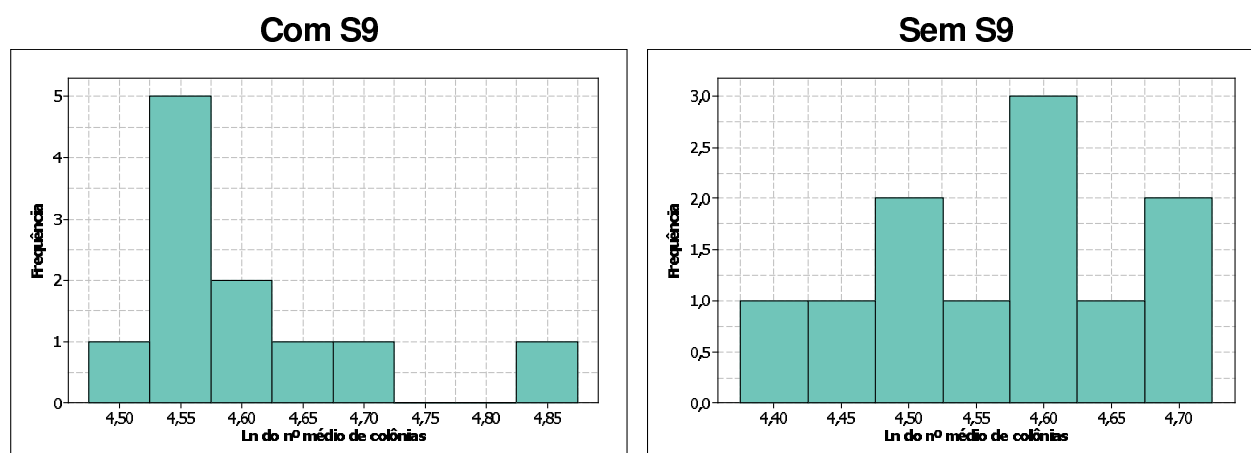


Figura B.30. Histogramas para o método Ames com pré-incubação



Linhagem: TA98

Figura B.31. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames sem pré-incubação, com S9

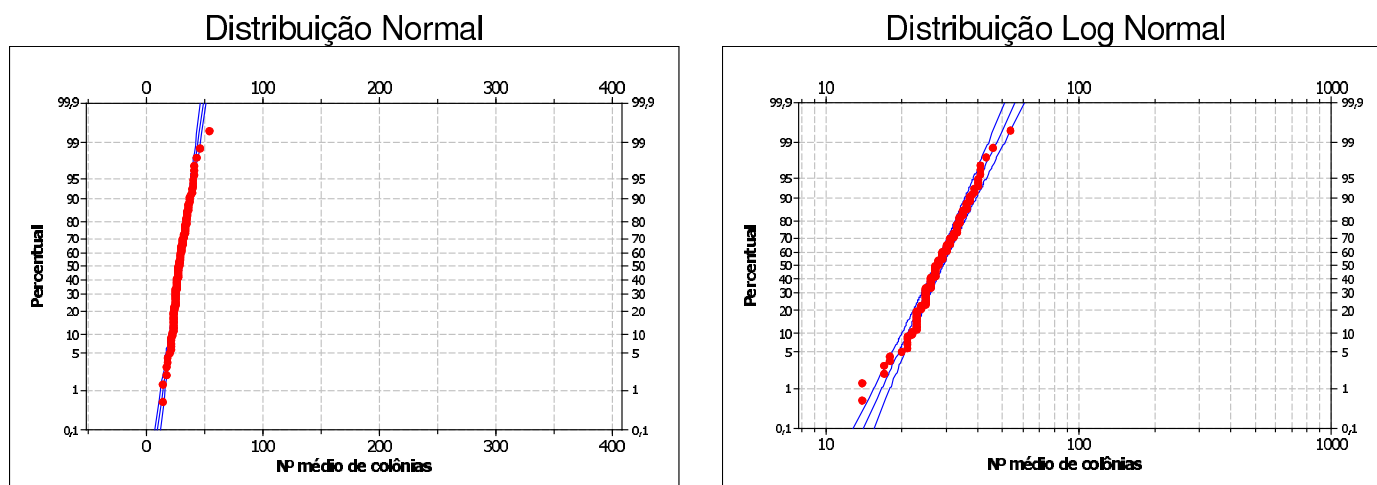
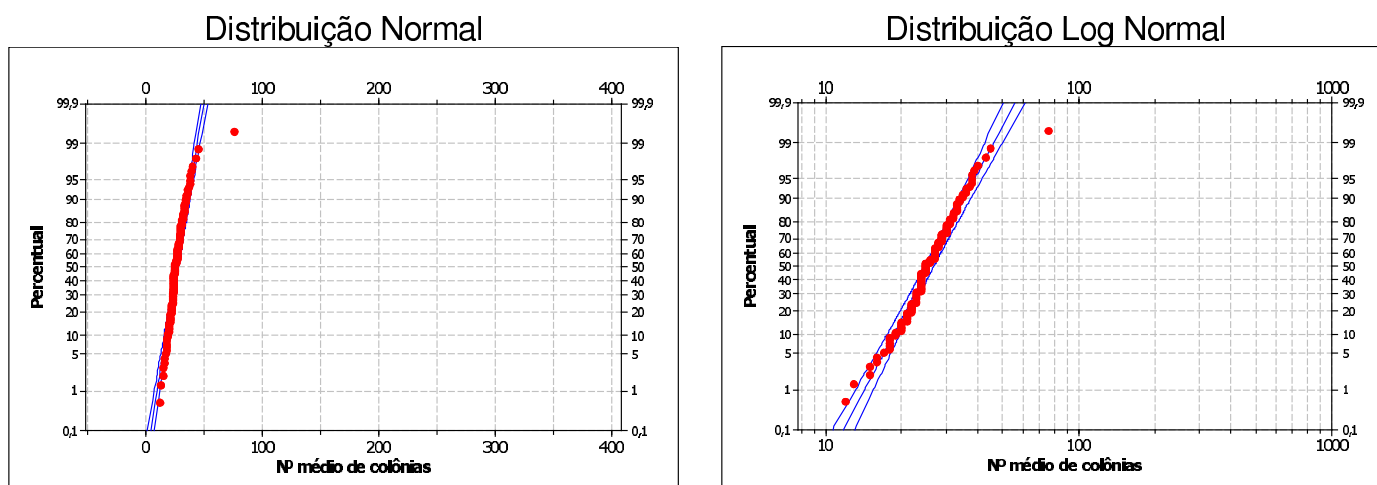


Figura B.32. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames sem pré-incubação, sem S9



Linhagem: TA98

Figura B.33. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames com pré-incubação, com S9

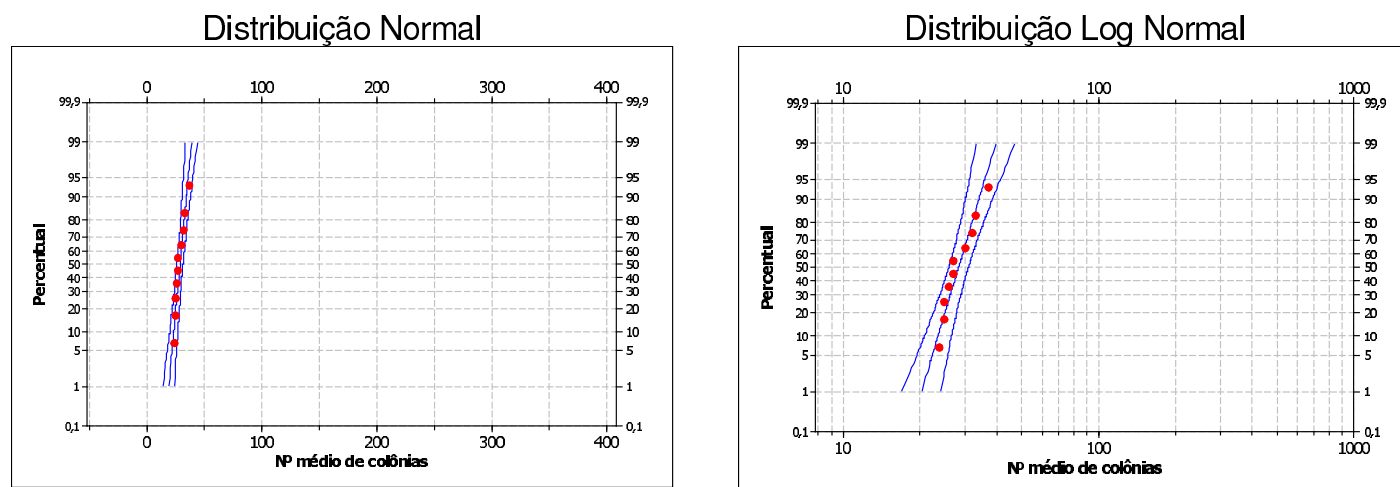
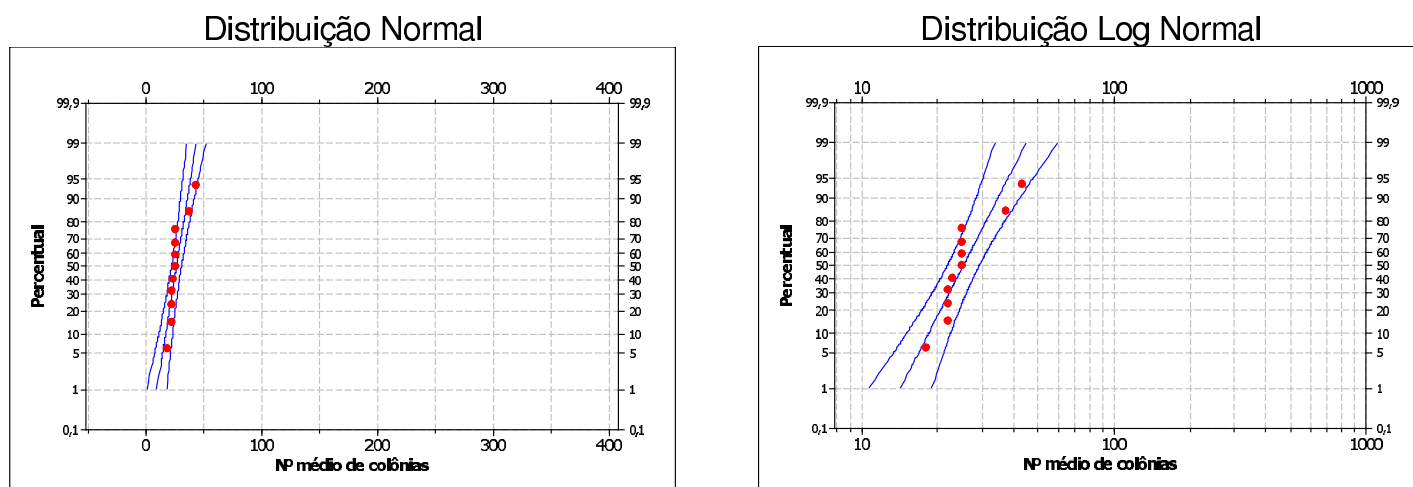


Figura B.34. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames com pré-incubação, sem S9



Linhagem: TA98

Figura B.35. Gráficos de Probabilidade, para o método Kado, com S9

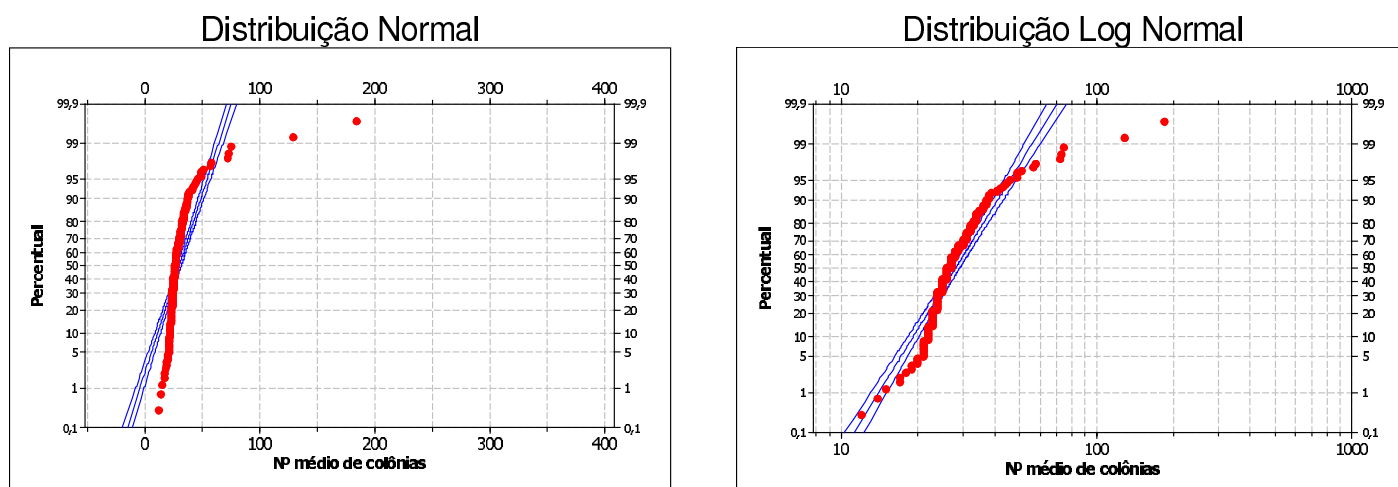
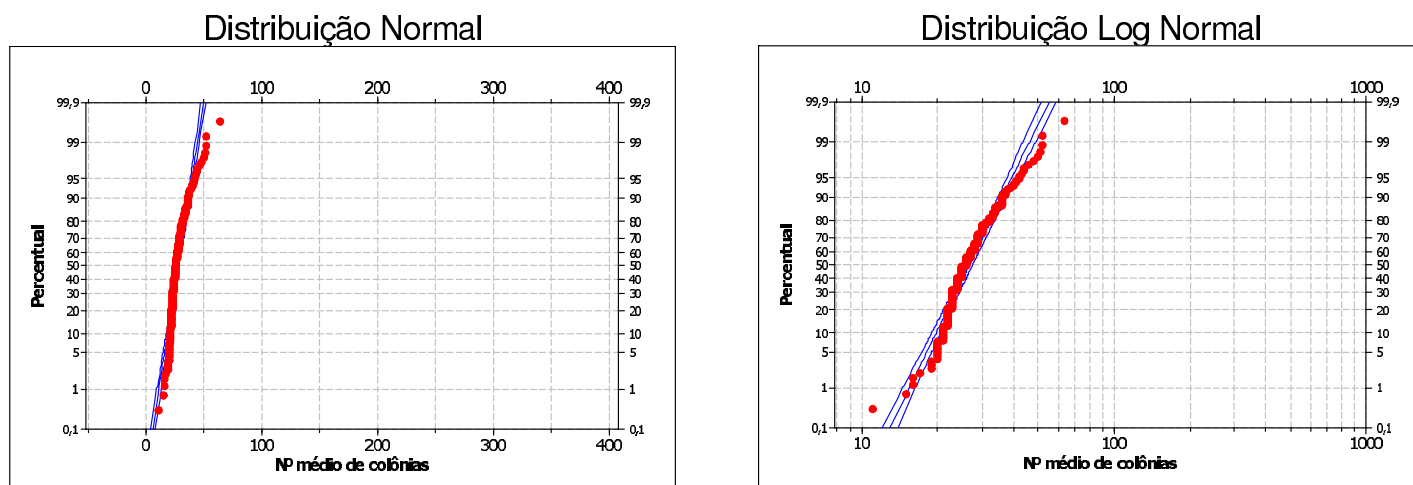


Figura B.36. Gráficos de Probabilidade, para o método Kado, sem S9



Linhagem: TA98

Figura B.37. Gráficos de Probabilidade, para o método Direto, com S9

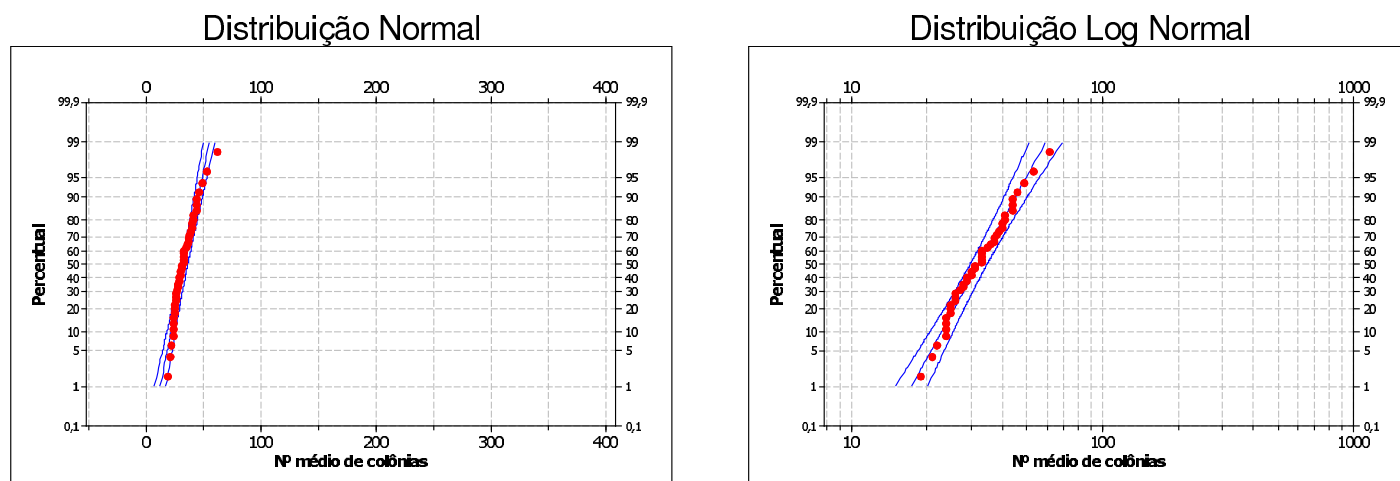
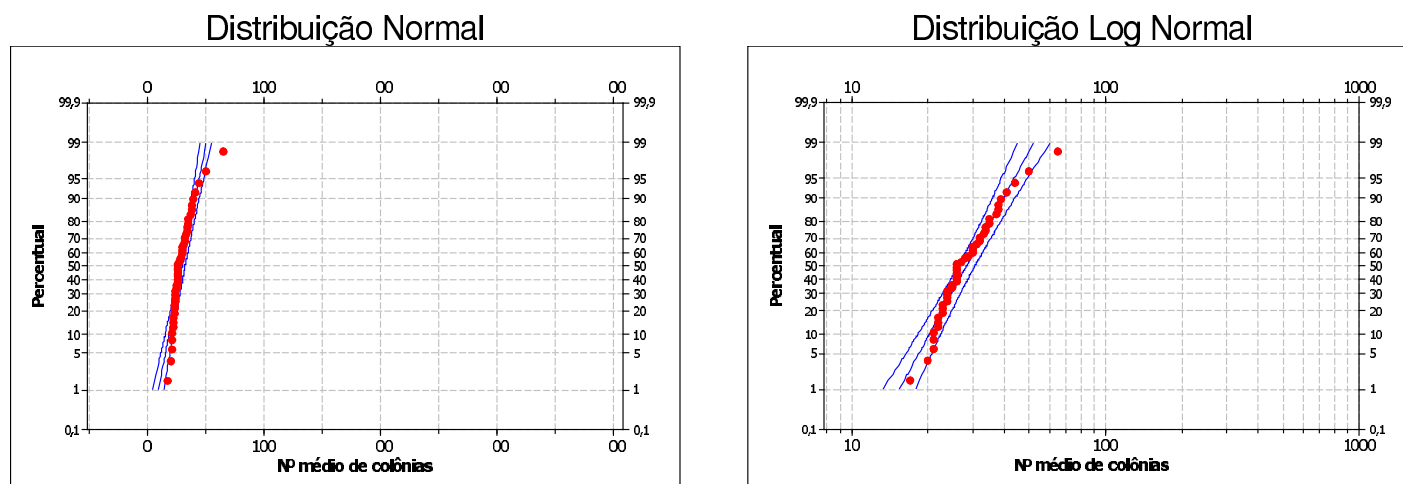


Figura B.38. Gráficos de Probabilidade, para o método Direto, sem S9



Linhagem: TA100

Figura B.39. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames sem pré-incubação, com S9

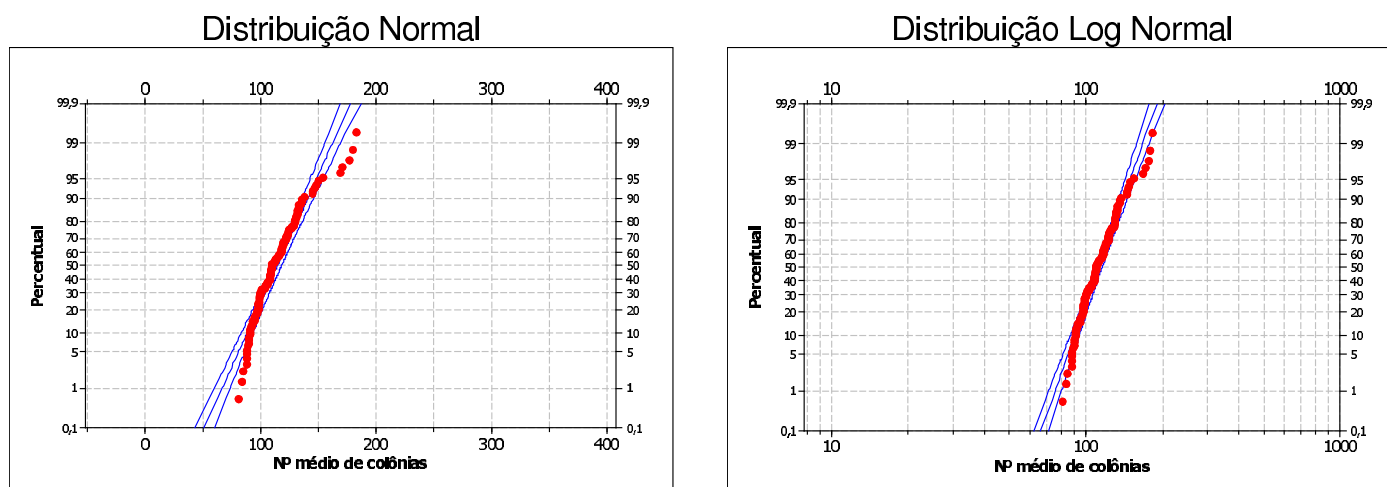
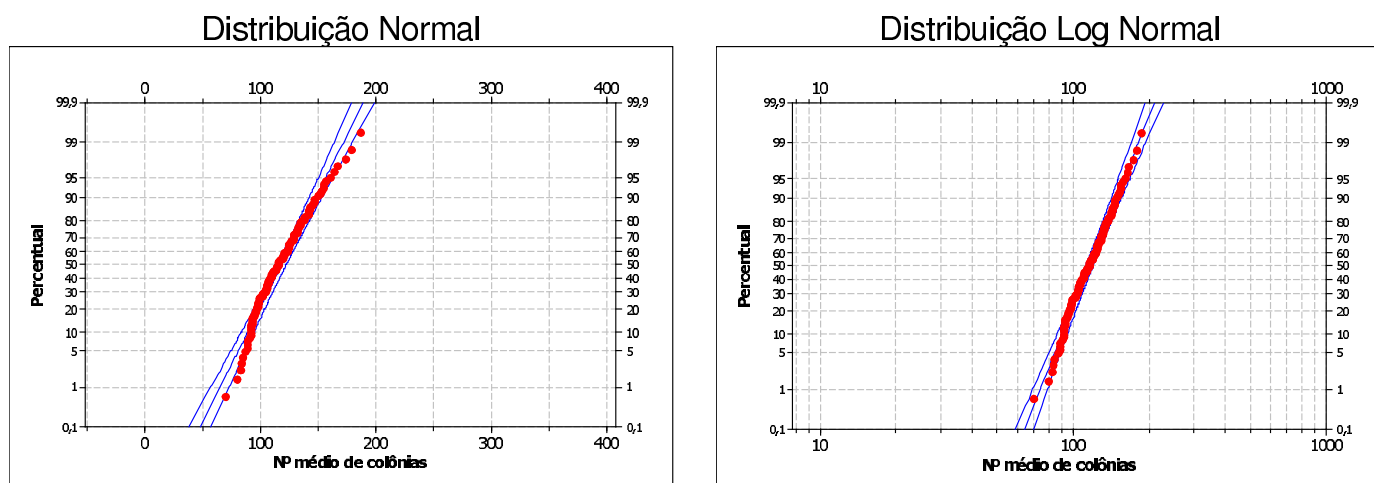


Figura B.40. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames sem pré-incubação, sem S9



Linhagem: TA100

Figura B.40. Gráficos de Probabilidade, para o método Kado, com S9

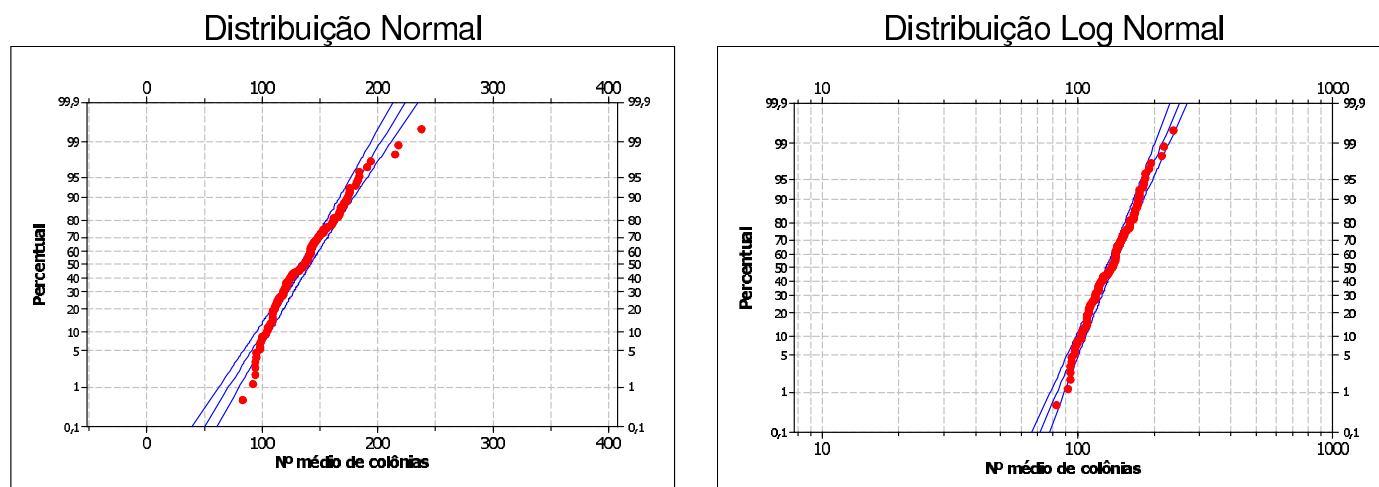
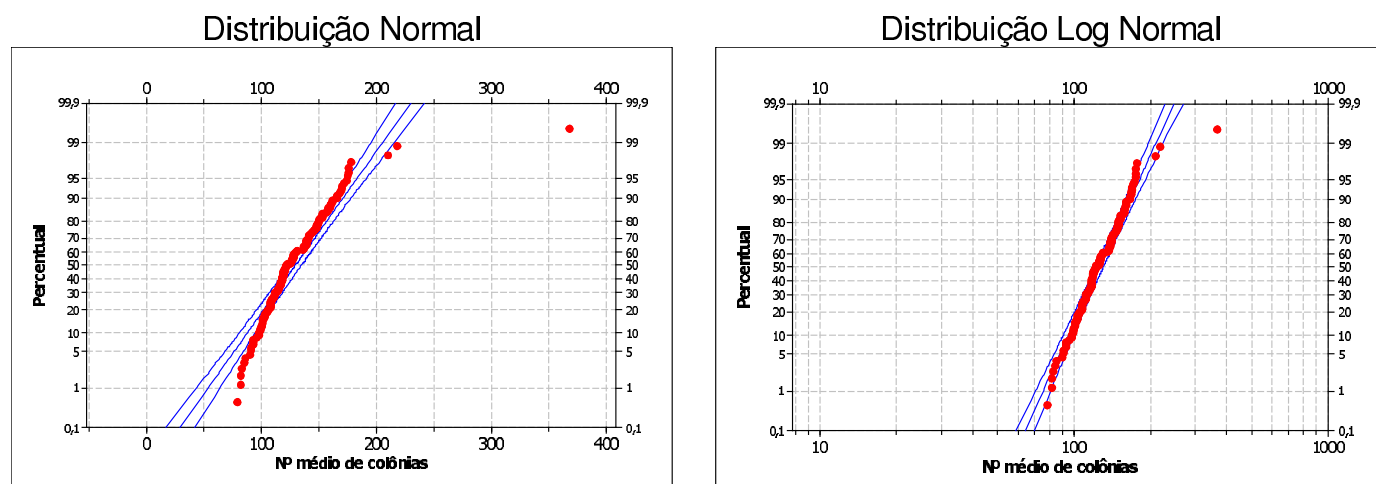


Figura B.41. Gráficos de Probabilidade, para o método Kado, sem S9



Linhagem: TA100

Figura B.42. Gráficos de Probabilidade, para o método Direto, com S9

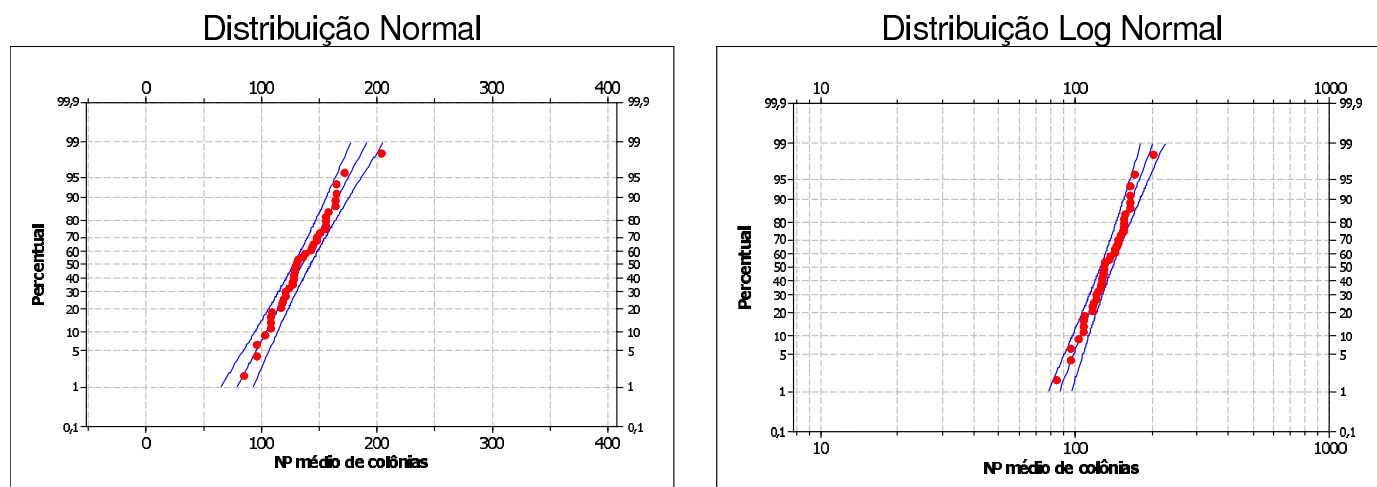
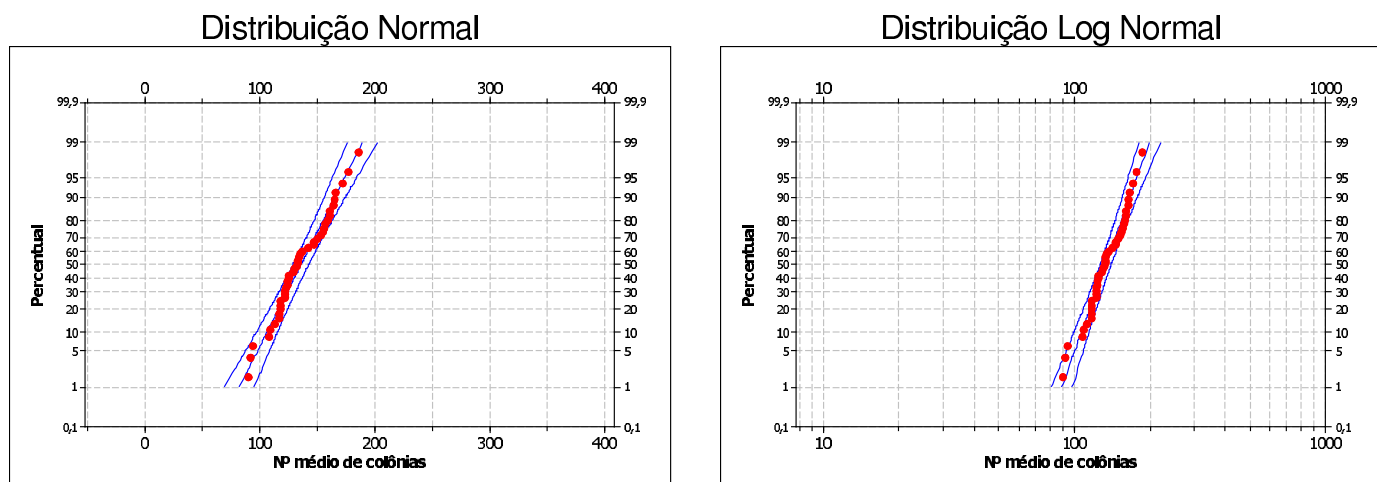


Figura B.43. Gráficos de Probabilidade, para o método Direto, sem S9



Linhagem: YG1041

Figura B.44. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames sem pré-incubação, com S9

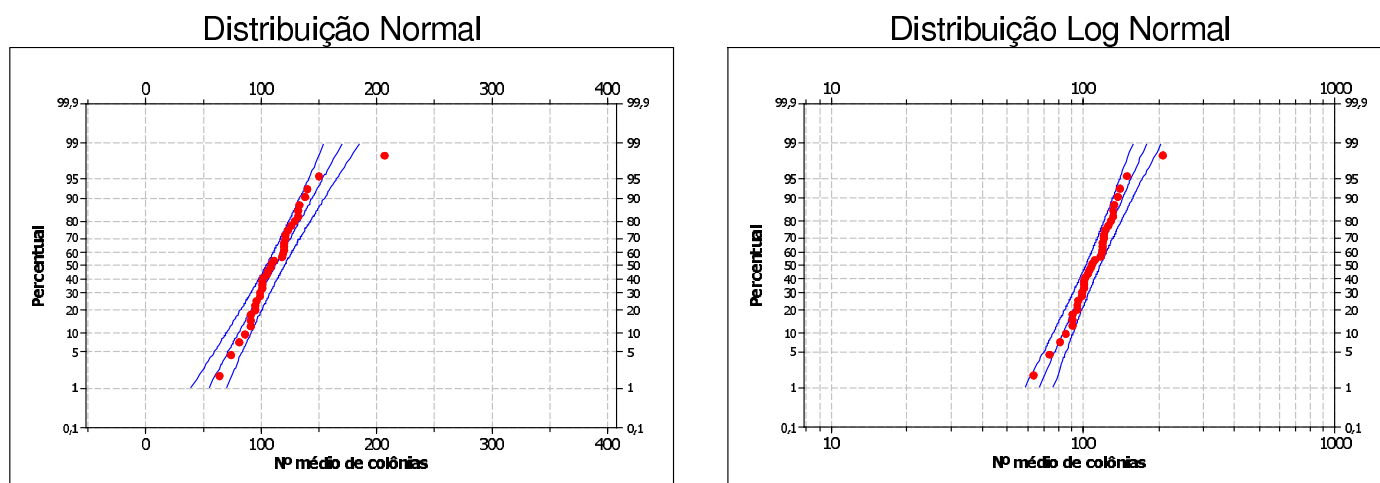
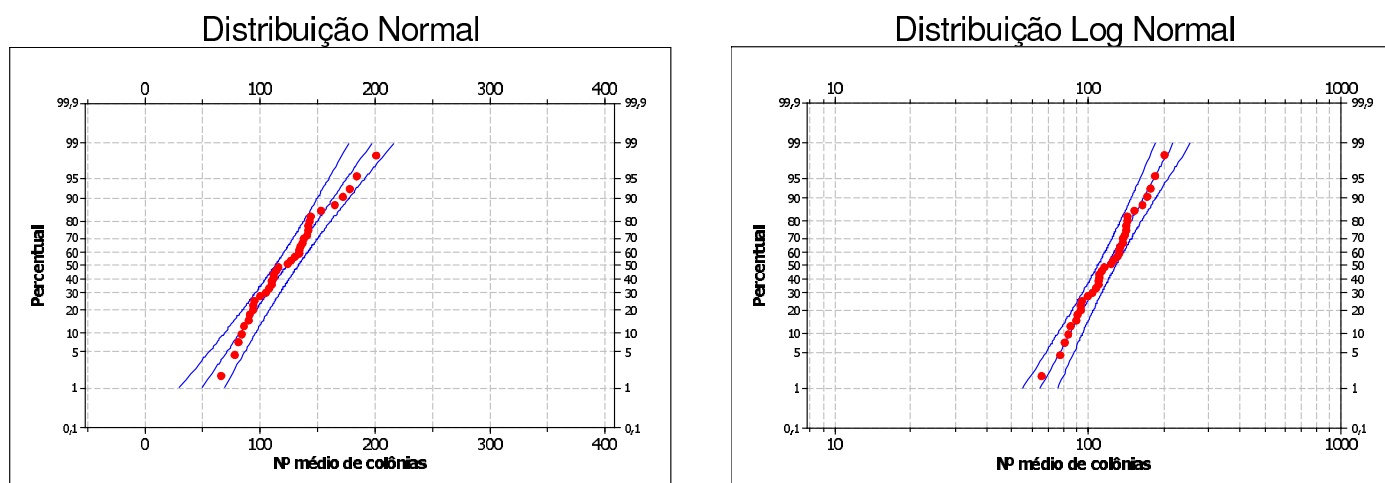


Figura B.45. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames sem pré-incubação, sem S9



Linhagem: YG1041

Figura B.46. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames com pré-incubação, com S9

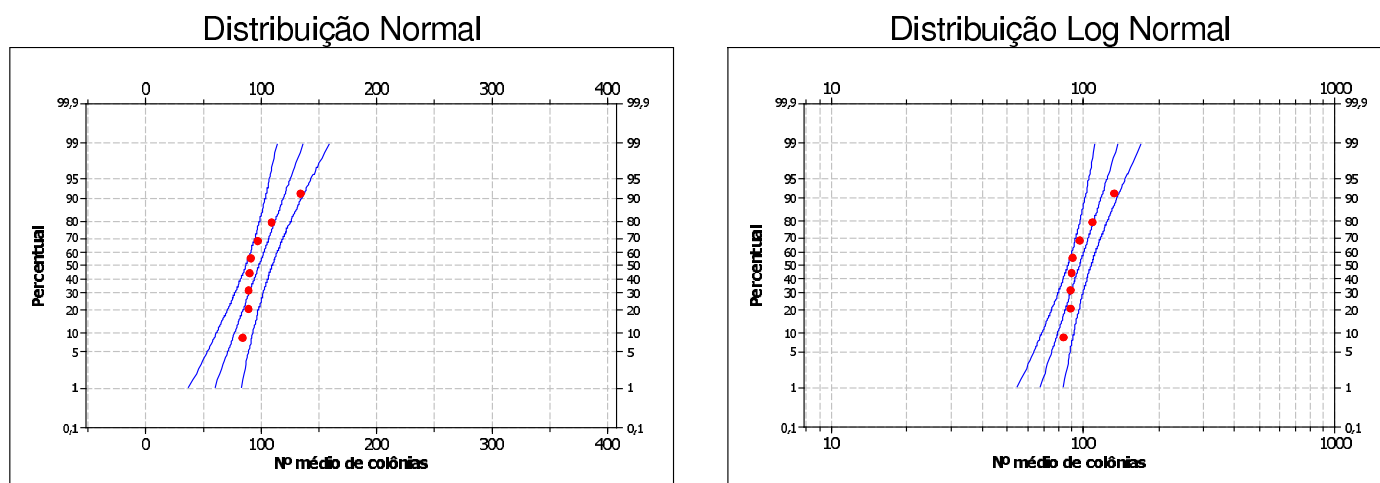
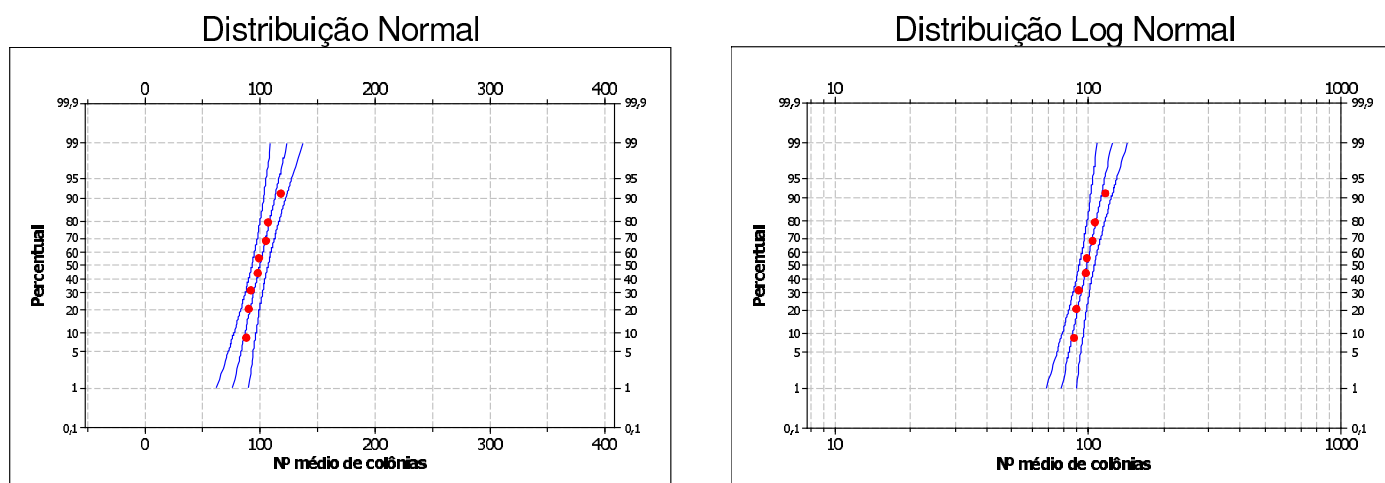


Figura B.47. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames com pré-incubação, sem S9



Linhagem: YG1041

Figura B.48. Gráficos de Probabilidade, para o método Kado, com S9

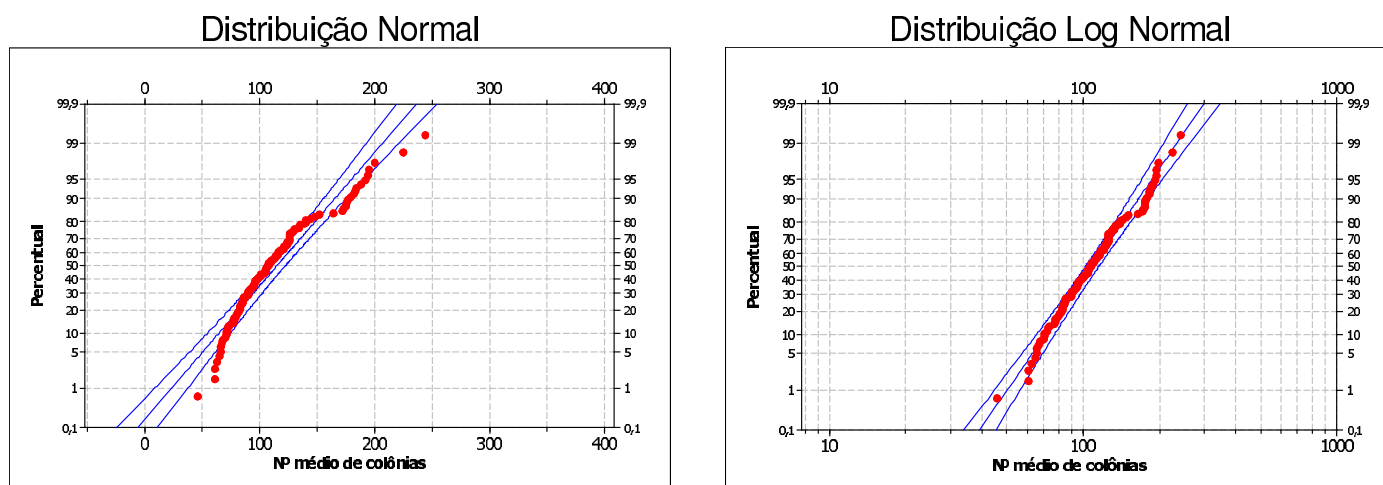
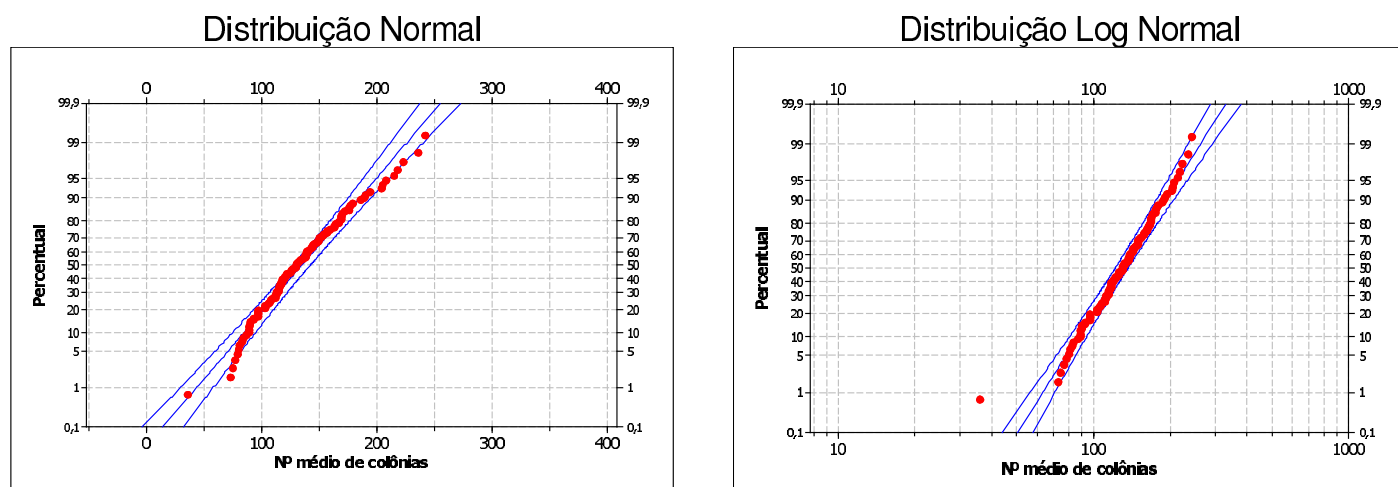


Figura B.49. Gráficos de Probabilidade, para o método Kado, sem S9



Linhagem: YG1042

Figura B.50. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames sem pré-incubação, com S9

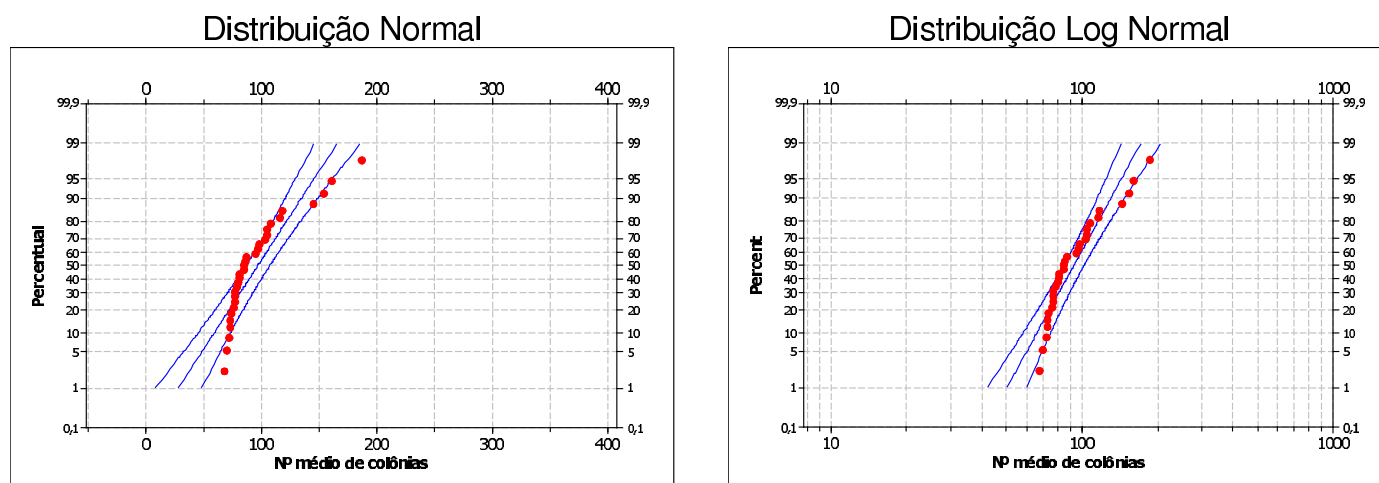
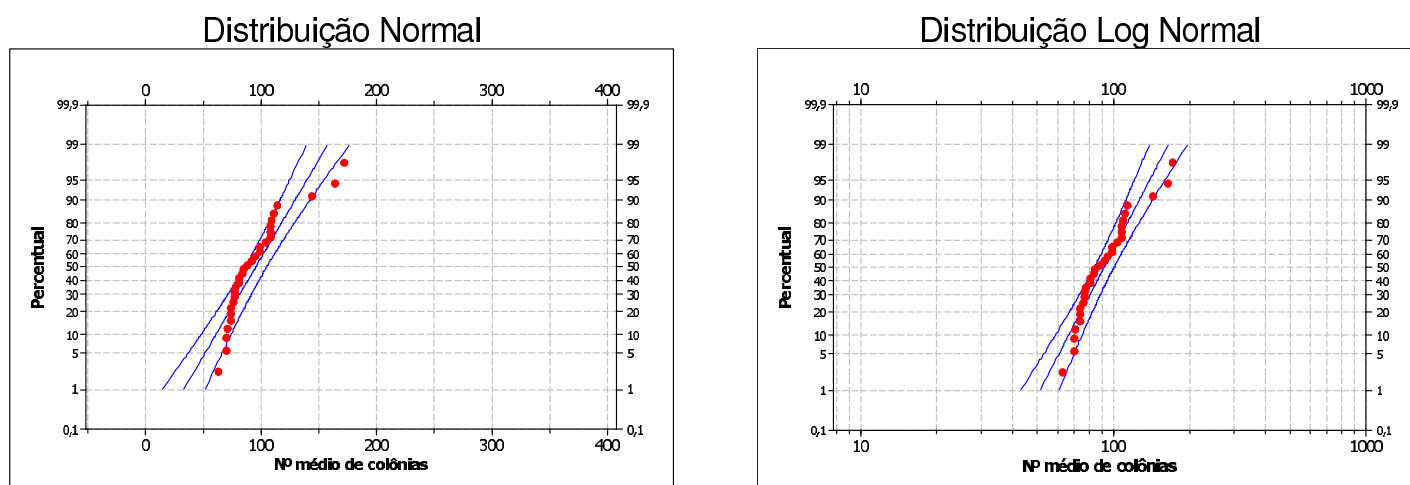


Figura B.51. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames sem pré-incubação, sem S9



Linhagem: YG1042

Figura B.52. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames com pré-incubação, com S9

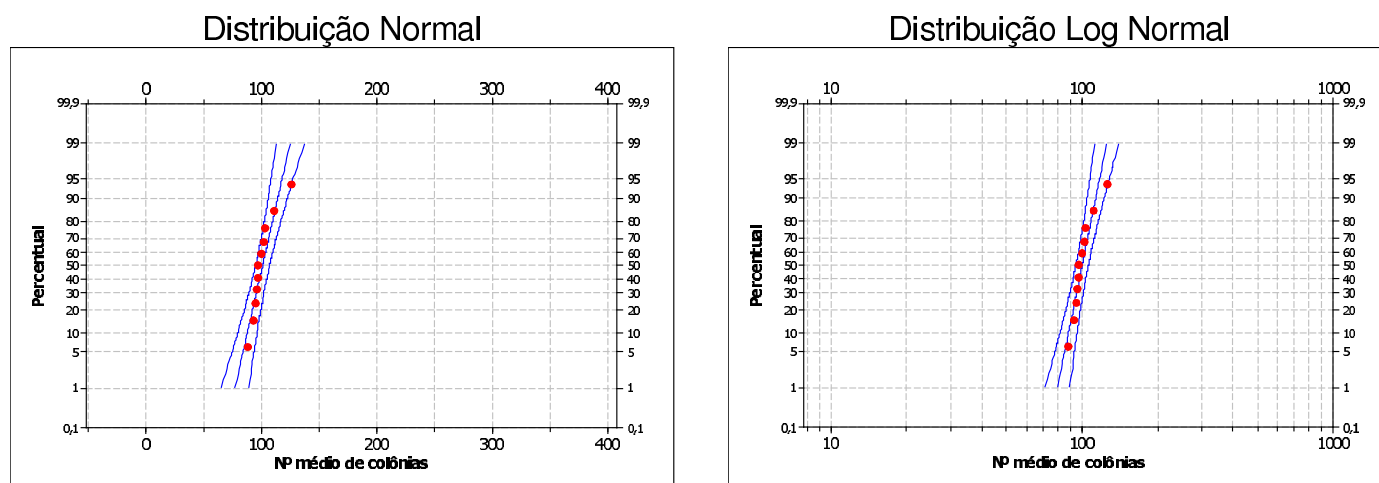
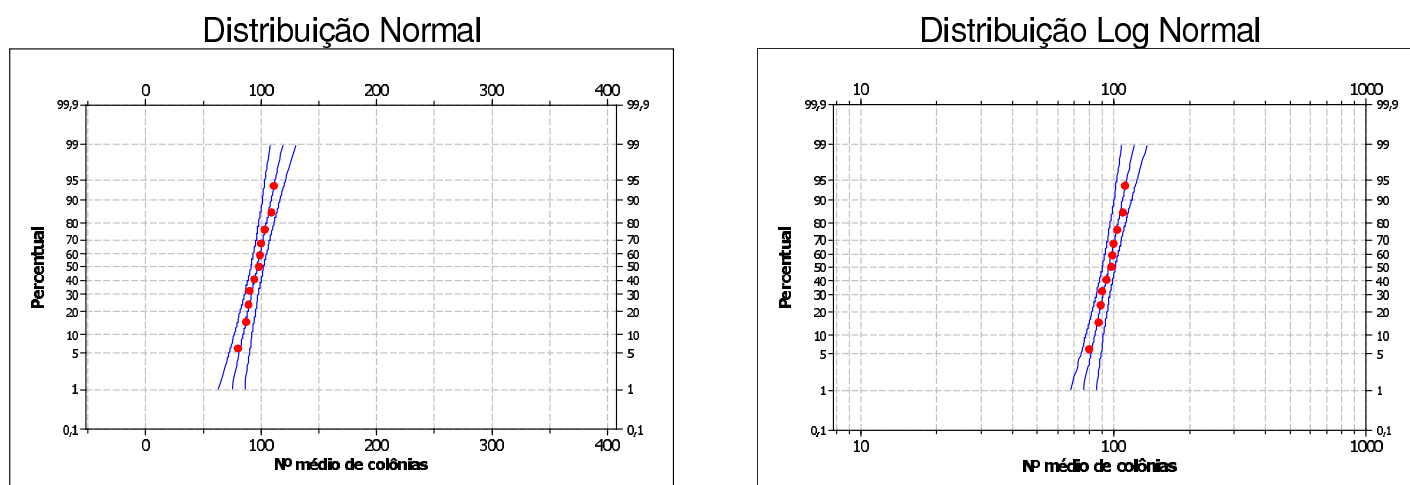


Figura B.53. Gráficos de Probabilidade, para o método Ames com pré-incubação, sem S9



Linhagem: YG1042

Figura B.54. Gráficos de Probabilidade, para o método Kado, com S9

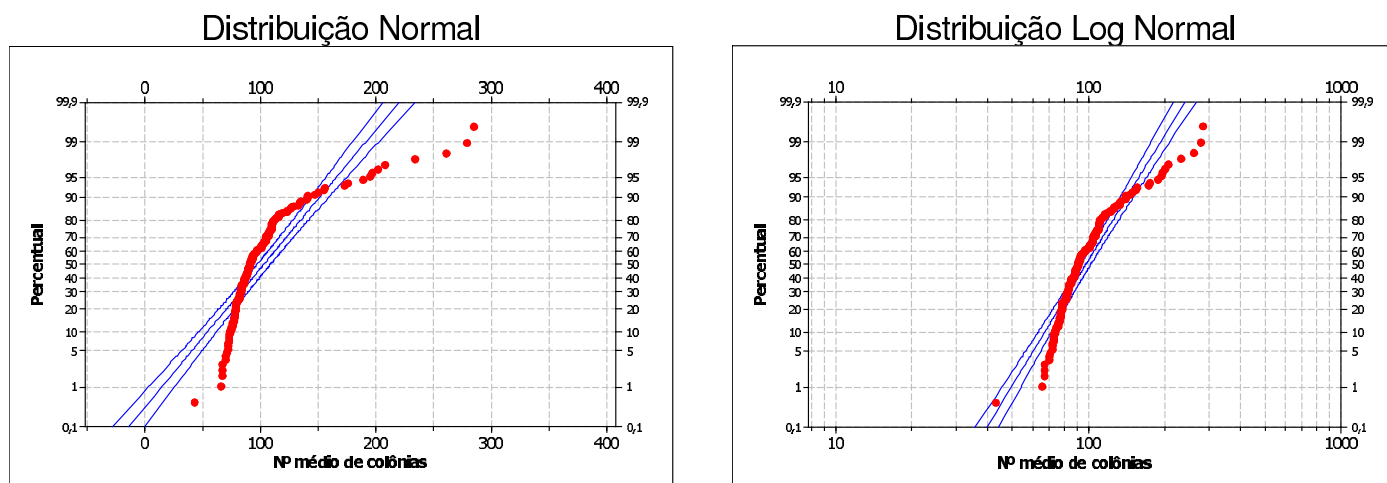


Figura B.55. Gráficos de Probabilidade, para o método Kado, sem S9

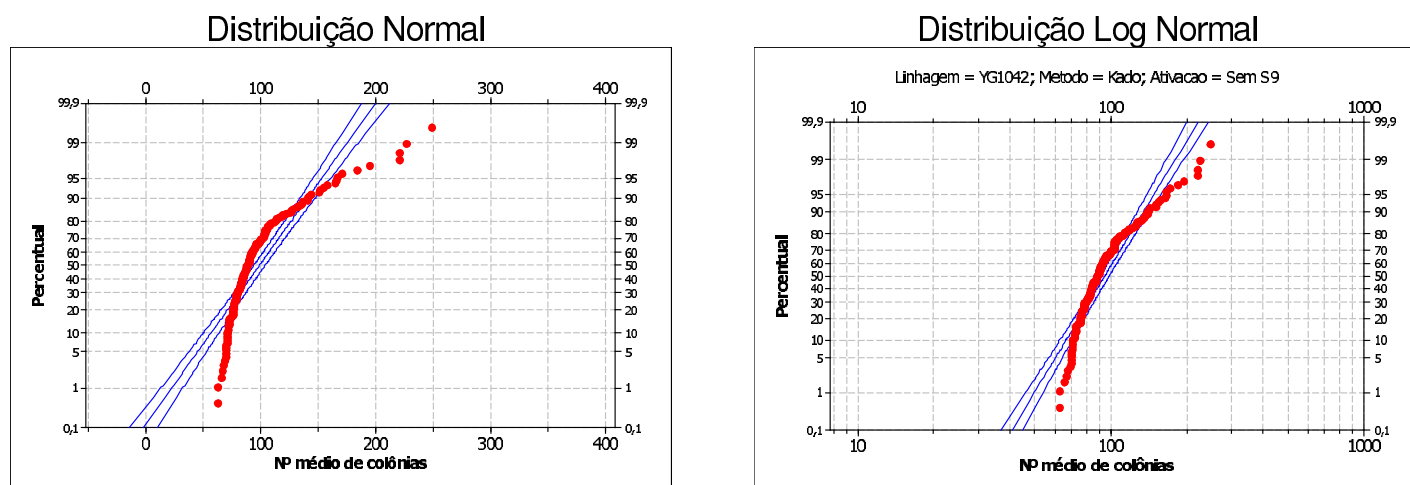


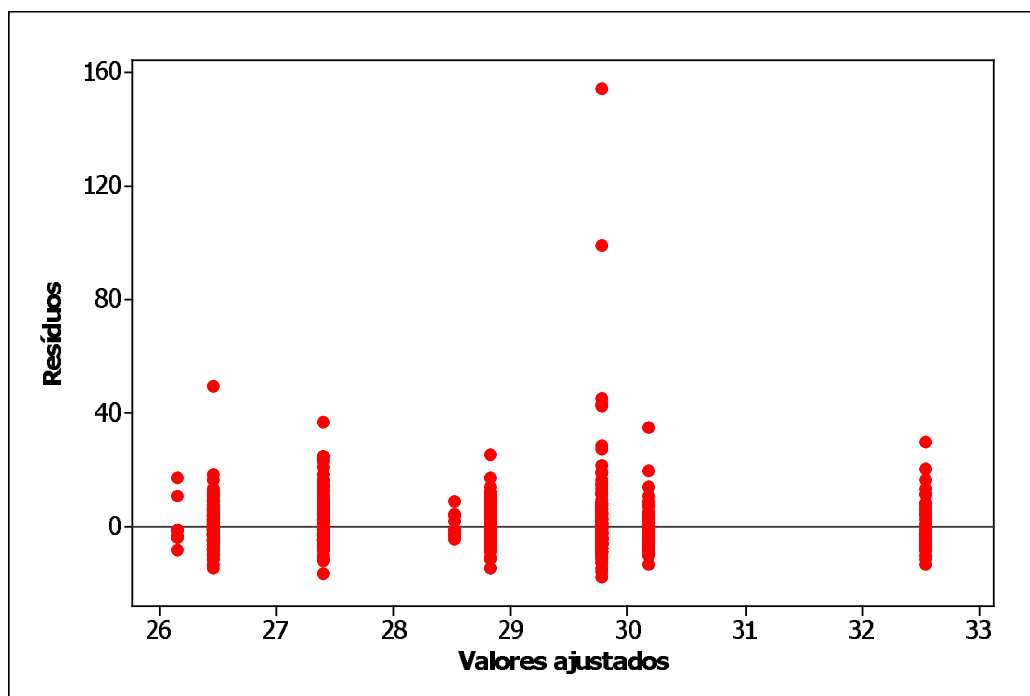
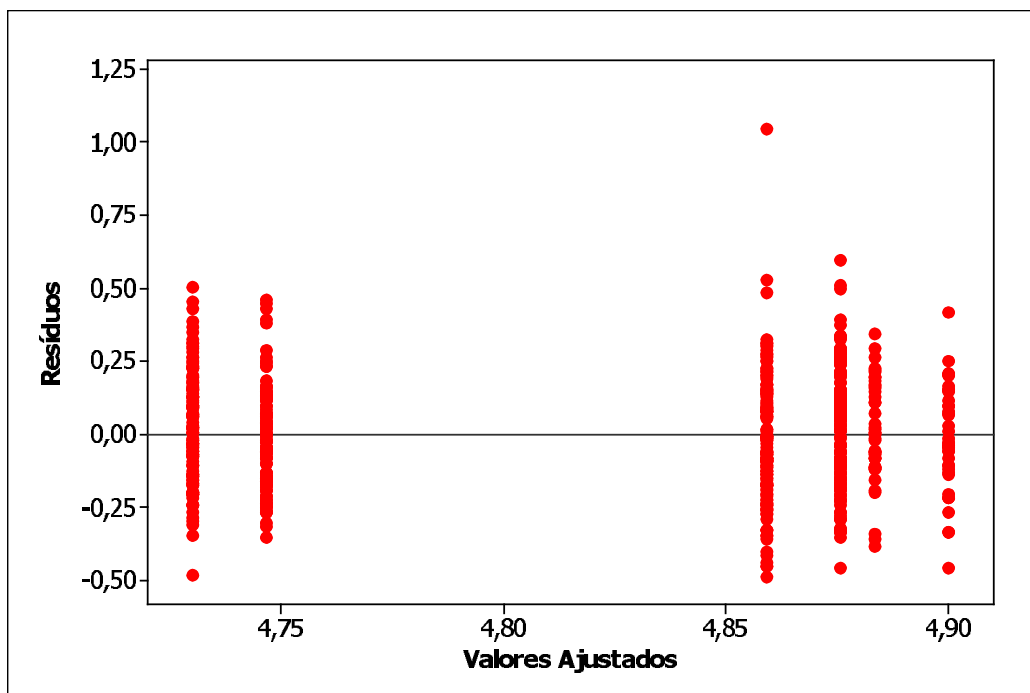
Figura 56. Gráfico dos Resíduos x Valores Ajustados para linhagem TA98**Figura 57.** Gráfico dos Resíduos x Valores Ajustados para linhagem TA100

Figura 58. Gráfico dos Resíduos x Valores Ajustados para linhagem YG1041

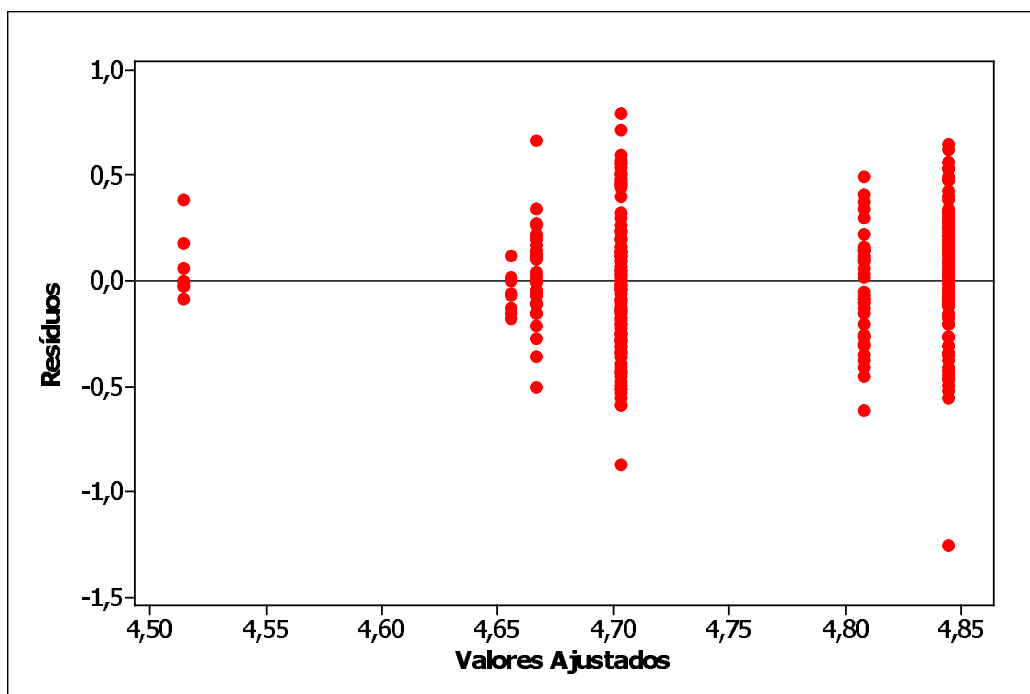


Figura 59. Gráfico dos Resíduos x Valores Ajustados para linhagem YG1042

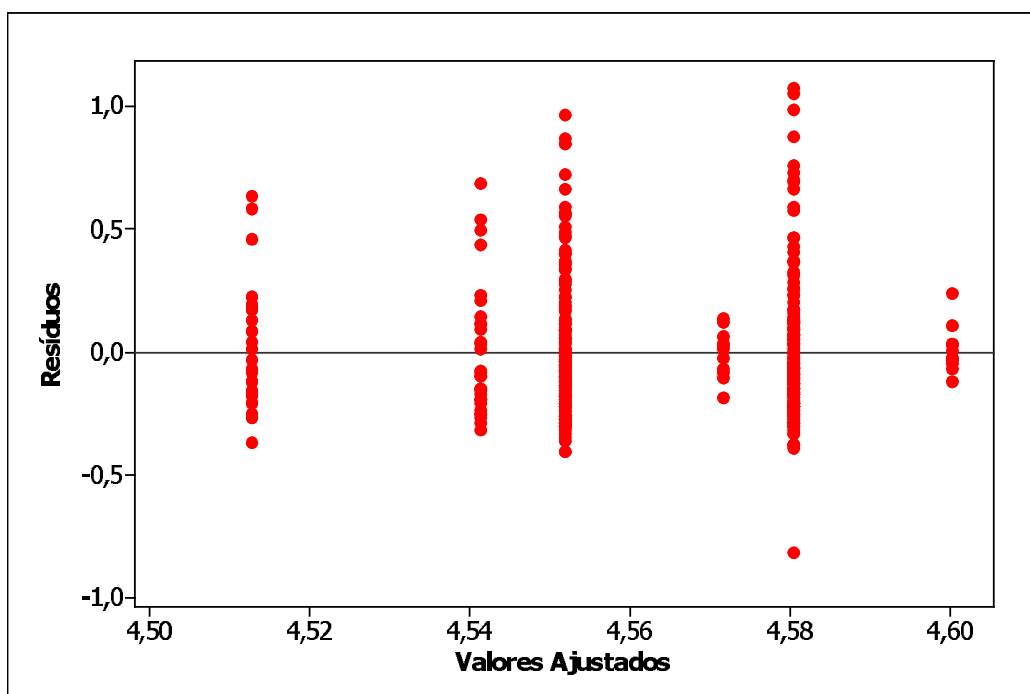


Figura 60. Distribuição empírica da potência de mutação para a linhagem TA100

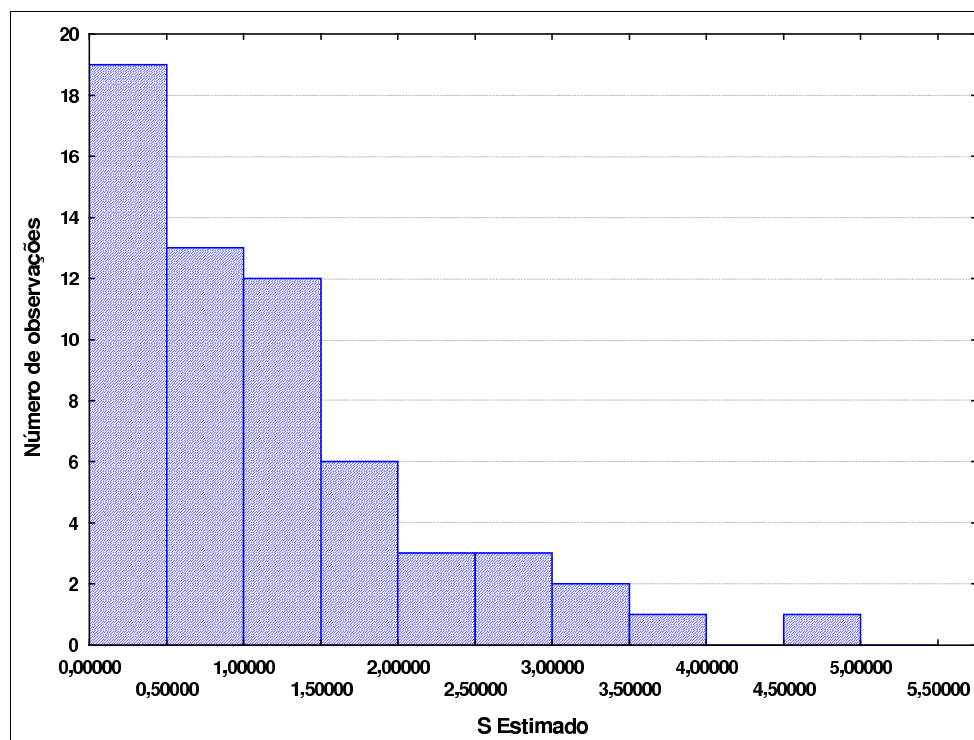


Figura 61. Distribuição empírica da potência de mutação para a linhagem TA98

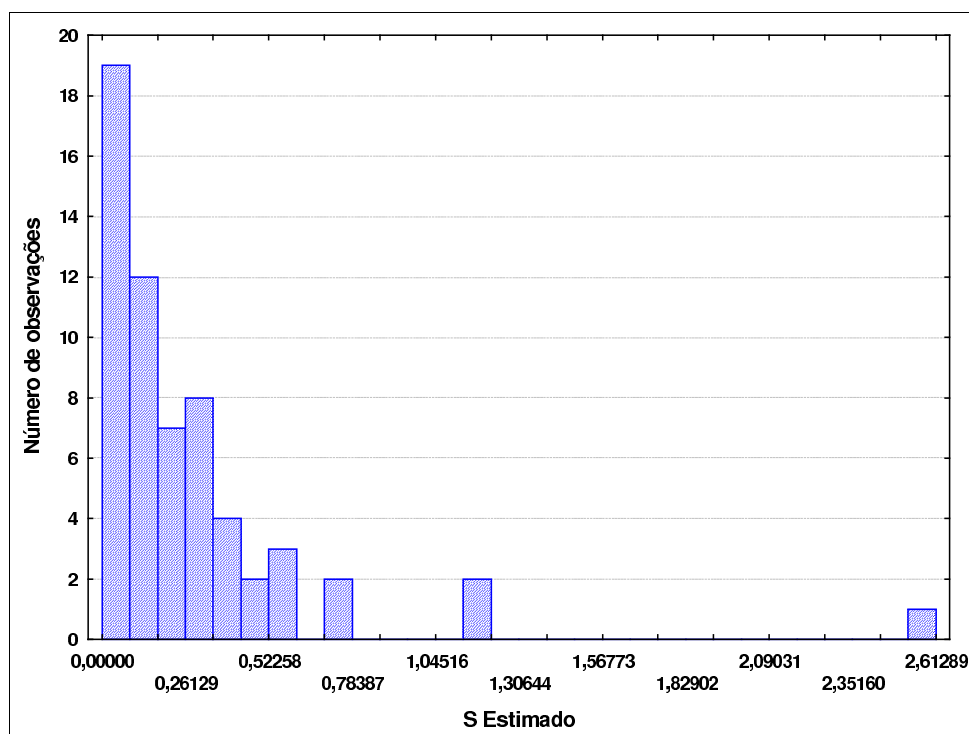


Figura 62. Gráfico de iteração da média do número de colônias, para as variáveis Método e Ativação Metabólica (TA98)

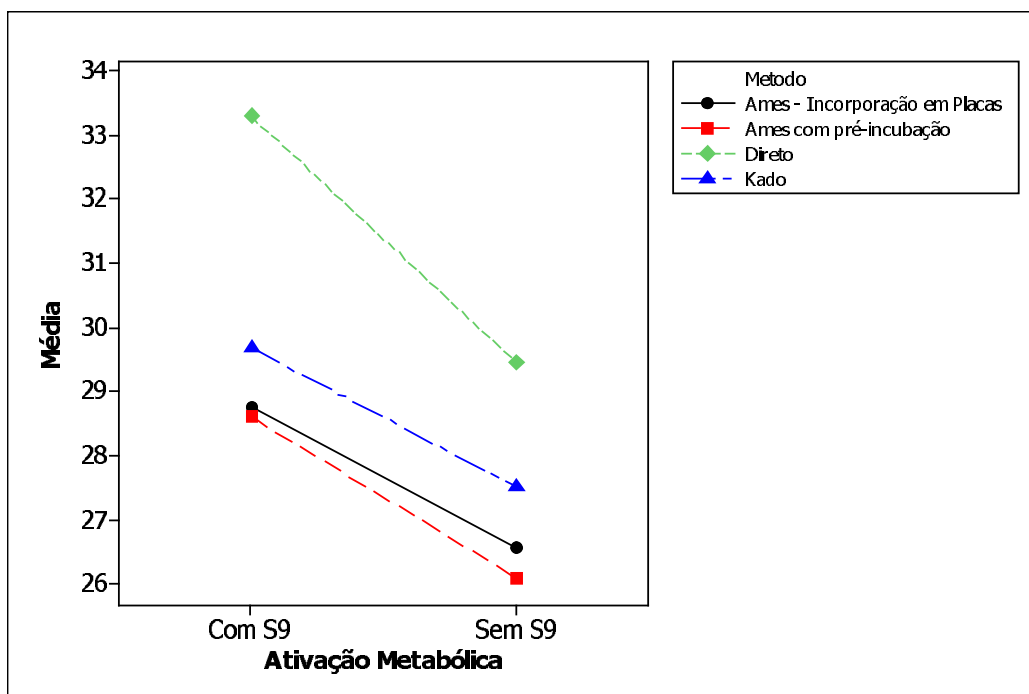


Figura 63. Gráfico de iteração do log da média do número de colônias, para as variáveis Método e Ativação Metabólica (TA100)

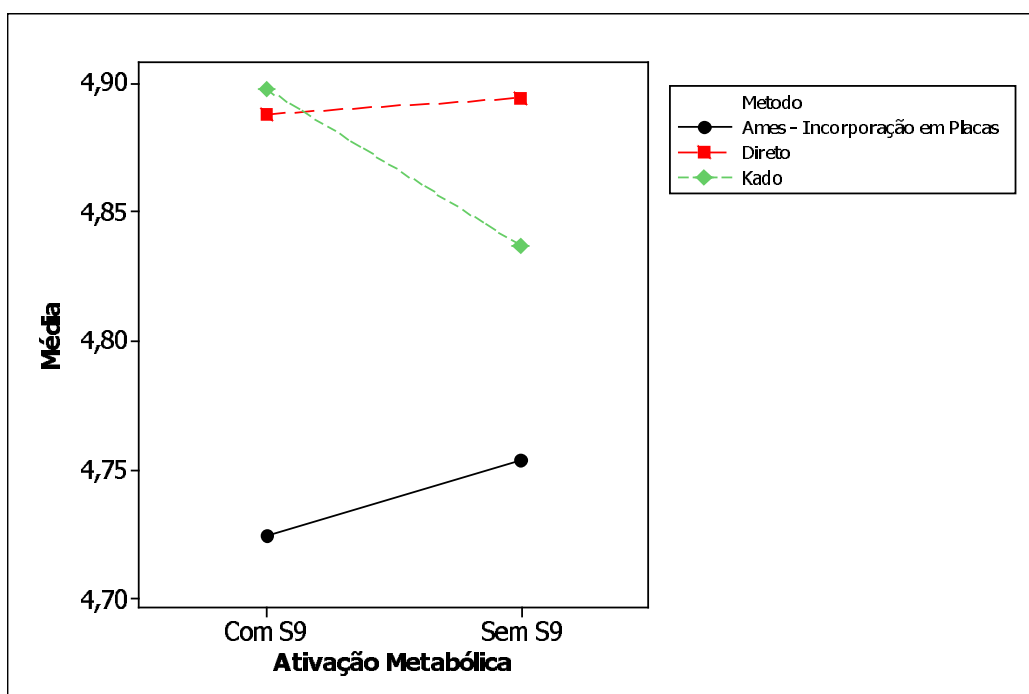


Figura 64. Gráfico de interação do log da média do número de colônias, para as variáveis Método e Ativação Metabólica (YG1041)

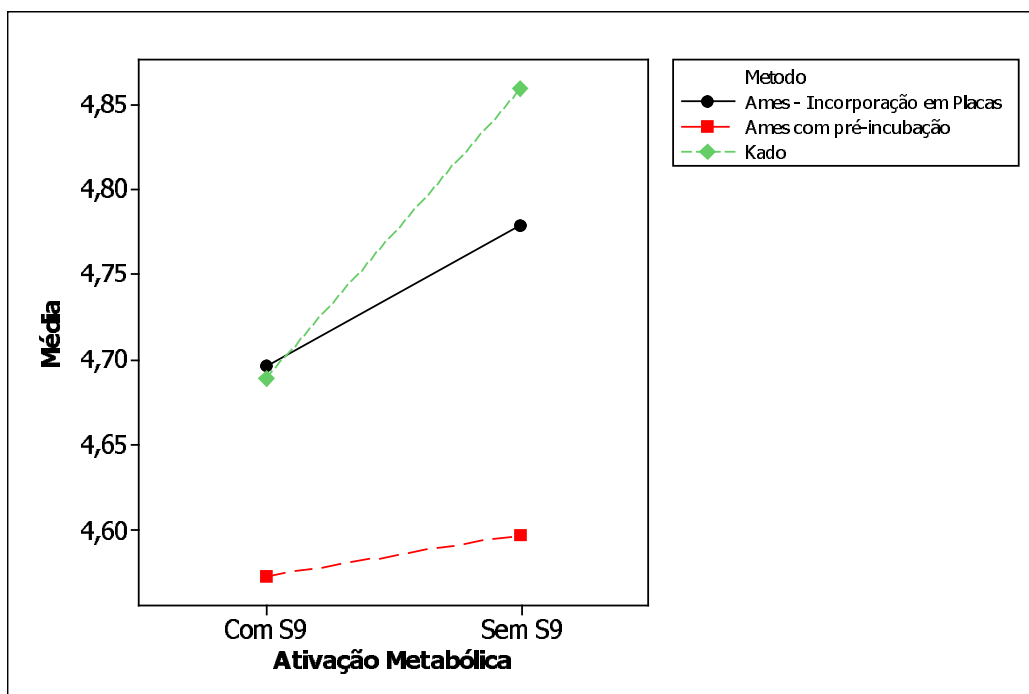
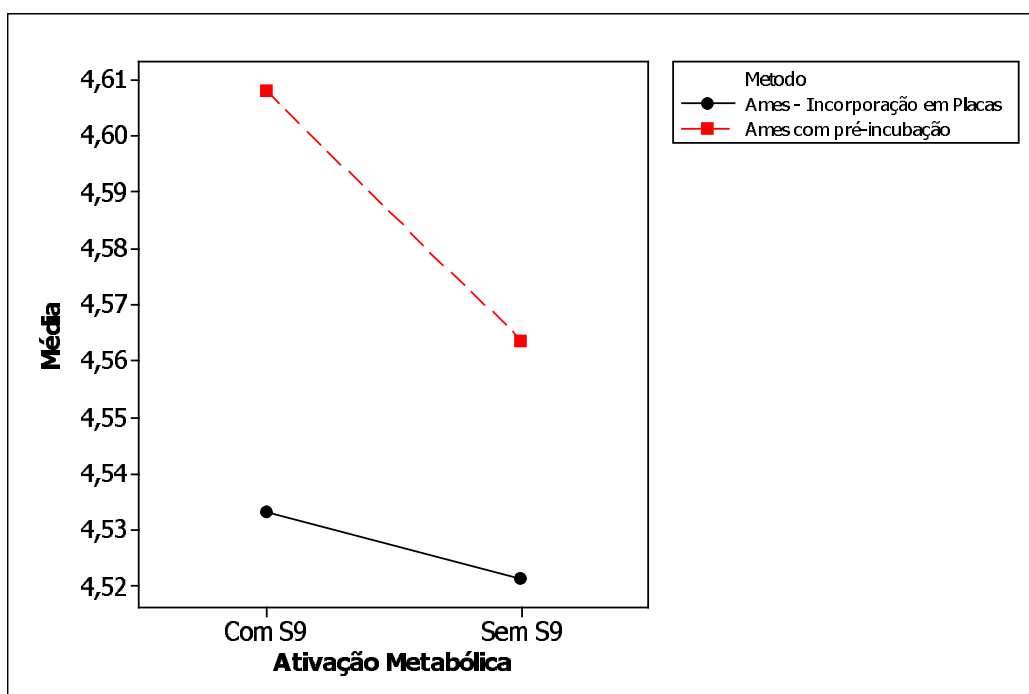


Figura 65. Gráfico de interação do log da média do número de colônias, para as variáveis Método e Ativação Metabólica (YG1042)



APÊNDICE C

Programas

Saída 1. Saída do modelo de regressão não linear para a linhagem TA 100.

Iterative Phase				
Iter	B	S	T	Sum of Squares
0	122.8	2.0000	0.00100	336784
1	101.8	1.1529	0.00269	17658.0
2	101.5	1.4526	0.00529	3927.8
3	101.6	1.5517	0.00581	3763.3
4	101.7	1.5445	0.00579	3763.2
5	101.7	1.5449	0.00579	3763.2
6	101.7	1.5449	0.00579	3763.2

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary	
Method	Gauss-Newton
Iterations	6

NOTE: An intercept was not specified for this model.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	202292	67430.6	179.18	<.0001
Residual	10	3763.2	376.3		
Uncorrected Total	13	206055			
Corrected Total	12	6414.9			

Programa. Software desenvolvido que indica se existe mutação.

```

%let LINHAGEM = TA100;
%let CAMINHO = %nrstr(C:\);
%LET X = 0;
%LET X1 = 5;
%LET X2 = 10;
%LET X3 = 50;
%LET X4 = 100;
%LET X5 = 200;
%LET X6 = 000;
%LET X7 = 000;
%let b1 = 0;
%let b2 = 0;
%let b3 = 0;
%let b4 = 0;
%let b5 = 0;
%let R11 = 0;
%let R12 = 0;
%let R13 = 0;
%let R21 = 0;
%let R22 = 0;
%let R23 = 0;
%let R31 = 0;
%let R32 = 0;
%let R33 = 0;
%let R41 = 0;
%let R42 = 0;
%let R43 = 0;
%let R51 = 0;
%let R52 = 0;
%let R53 = 0;
%let R61 = 0;
%let R62 = 0;
%let R63 = 0;
%let R71 = 0;
%let R72 = 0;
%let R73 = 0;
%LET ARQUIVO = AMES.XLS;

%WINDOW CONVERSOR COLOR=WHITE COLUMNS=80 ROWS=60

#05    @38 'CETESB'   COLOR=BLUE   ATTR=REV_VIDEO
#07    @35 'TESTE DE AMES'   COLOR=BLUE   ATTR=UNDERLINE
#12    @6  'DIRETÓRIO' @20 CAMINHO  50 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
/*    #14    @6  'ARQUIVO EXCEL:' @20 ARQUIVO  15 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
        @40 'ARQUIVO COM A EXTENSÃO XLS' COLOR=ORANGE
#16    @6  'NOME DA MACRO' @20 NOME_MACRO 15 COLOR = BLACK ATTR=REV_VIDEO
        @40 'NOME DA MACRO NO EXCEL' COLOR = ORANGE */
#18    @6  'LINHAGEM:' @20 LINHAGEM 15 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
        @40 'ENTRE COM A LINHAGEM DO ESTUDO' COLOR = ORANGE
#20    @20 'DOSE' @27 'R1' @33 'R2' @39 'R3' @45 'R4' @51 'R5'

```

```

#21 @20 X 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @26 B1 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @32 B2 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @38 B3 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @44 B4 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @50 B5 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO

#22 @20 X1 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @26 R11 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @32 R12 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @38 R13 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO

#23 @20 X2 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @26 R21 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @32 R22 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @38 R23 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO

#24 @20 X3 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @26 R31 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @32 R32 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @38 R33 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO

#25 @20 X4 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @26 R41 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @32 R42 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @38 R43 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO

#26 @20 X5 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @26 R51 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @32 R52 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @38 R53 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO

#27 @20 X6 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @26 R61 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @32 R62 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @38 R63 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO

#28 @20 X7 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @26 R71 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @32 R72 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO
    @38 R73 4 COLOR=BLACK ATTR=REV_VIDEO

#29 @10 'NO CASO DO VALOR NÃO EXISTIR, PREENCHA COM O VALOR ZERO'
COLOR=GREEN
#32 @10 'PRESSIONE ENTER PARA EXECUTAR, OU CTRL+BREAK PARA TERMINAR.'
COLOR=GREEN;

%DISPLAY conversor;

%MACRO RODA;
%LET CAMINHO = %UNQUOTE(&CAMINHO);
%let b1 = &b1;
%let b2 = &b2;
%let b3 = &b3;
%let b4 = &b4;
%let b5 = &b5;
%let R11 = &R11;

```

```

%let R12 = &R12;
%let R13 = &R13;
%let R21 = &R21;
%let R22 = &R22;
%let R23 = &R23;
%let R31 = &R31;
%let R32 = &R32;
%let R33 = &R33;
%let R41 = &R41;
%let R42 = &R42;
%let R43 = &R43;
%let R51 = &R51;
%let R52 = &R52;
%let R53 = &R53;
%let R61 = &R61;
%let R62 = &R62;
%let R63 = &R63;
%let R71 = &R71;
%let R72 = &R72;
%let R73 = &R73;
%let x = &x;
%let x1 = &x1;
%let x2 = &x2;
%let x3 = &x3;
%let x4 = &x4;
%let x5 = &x5;
%let x6 = &x6;
%let x7 = &x7;
%MEND RODA;
%RODA;
data amostral;
dose = &x;
r1 = &b1;
r2 = &b2;
r3 = &b3;
r4 = &b4;
r5 = &b5;
run;

data amostra2;
dose = &x1;
r1 = &R11;
r2 = &R12;
r3 = &R13;
run;

data amostra3;
dose = &x2;
r1 = &R21;
r2 = &R22;
r3 = &R23;
run;

data amostra4;
dose = &x3;
r1 = &R31;
r2 = &R32;

```

```

r3 = &R33;
run;

data amostra5;
dose = &x4;
r1 = &R41;
r2 = &R42;
r3 = &R43;
run;

data amostra6;
dose = &x5;
r1 = &R51;
r2 = &R52;
r3 = &R53;
run;

data amostra7;
dose = &x6;
r1 = &R61;
r2 = &R62;
r3 = &R63;
run;

data amostra8;
dose = &x7;
r1 = &R71;
r2 = &R72;
r3 = &R73;
run;
data amostra;
    merge
    if r1 = r2 = r3 = r4 = r5 = . then delete;
run;
proc delete data = amostra1;
proc delete data = amostra2;
proc delete data = amostra3;
proc delete data = amostra4;
proc delete data = amostra5;
proc delete data = amostra6;
proc delete data = amostra7;
proc delete data = amostra8;quit;

proc print data = amostra;
var dose r1 r2 r3 r4 r5;
run;

data amostra;
    set amostra;
    y = mean (r1, r2, r3, r4, r5);
run;

Proc nlin data = amostra
    MAXITER = 30;
    parms B = 100 S= 2 T =0.001;
    Bounds B > 0, S > 0, T > 0;

```

```

        Model Y = mean;
        Output out = amostra Predicted = PHat Parm = B S T;
Run;

proc sort data = amostra;by s;run;

/*      Cria a variável macro s com o valor observado no ensaio realizado */
data _null_;
set amostra;by s;
if first.s;
call symput("S",s);
run;

PROC IMPORT OUT= DADOS
            DATAFILE= "&caminho.\&linhagem.xls"
            DBMS=EXCEL2000 REPLACE;
            GETNAMES=YES;
RUN;

/*      Cria os percentis a partir do histórico*/

proc univariate data = dados ;
    var s;
output out = saida pctlpts=1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
                        20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
40 41 42 43
                        44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63
64 65 66 67
                        68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87
88 89 90 91
                        92 93 94 95 96 97 98 99 100 pctlpre=p1 p2 p3 p4 p5 p6 p7 p8
p9 p10 p11
                        p12 p13 p14 p15 p16 p17 p18 p19 p20 p21 p22 p23 p24 p25 p26
p27 p28 p29
                        p30 p31 p32 p33 p34 p35 p36 p37 p38 p39 p40 p41 p42 p43 p44
p45 p46 p47
                        p48 p49 p50 p51 p52 p53 p54 p55 p56 p57 p58 p59 p60 p61 p62
p63 p64 p65
                        p66 p67 p68 p69 p70 p71 p72 p73 p74 p75 p76 p77 p78 p79 p80
p81 p82 p83
                        p84 p85 p86 p87 p88 p89 p90 p91 p92 p93 p94 p95 p96 p97 p98
p99 p100;
run;

options mprint symbolgen;

data saida;
    set saida;
    retain title p;
    array p[100];
    do i = 1 to 99;
        if (p[i] < &s) then
            aux = (p[i] + p[i+1])/2;
            p = (&s - P[i])/(p[i+1] - p[i]);
        end;
        p = 1 - (p + aux);
    end;

```

```
title = "A probabilidade de se observar valores mais extremos ao  
observado no ensaio é:";  
call symput("p",p);  
keep p;  
run;
```

```
title " A potência de mutagenicidade é: &s";  
proc print data = saida;  
var title p;  
run;
```

LINHAGEM TA100

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
B	101.7	10.2825	78.7431	124.6
S	1.5449	0.5634	0.2896	2.8002
T	0.00579	0.00151	0.00242	0.00915

Approximate Correlation Matrix

	B	S	T
B	1.0000000	-0.6335671	-0.5136416
S	-0.6335671	1.0000000	0.9591495
T	-0.5136416	0.9591495	1.0000000