

**RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA SOBRE O PROJETO “AVALIAÇÃO
DA TOXICIDADE E DO TRATAMENTO DE UM EFLUENTE TÊXTIL POR
IRRADIAÇÃO IONIZANTE”**

Alexandre Galvão Patriota

Daniel Vasconcellos Figueiredo Falbel

Felipe Pires Martins

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA**RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA**

TÍTULO: Relatório de análise estatística sobre o projeto “Avaliação da toxicidade e do tratamento de um efluente têxtil por irradiação ionizante”.

PESQUISADORA: Aline Viana de Moraes

ORIENTADOR: Prof. ^a Dra. Sueli Ivone Borrely

INSTITUIÇÃO: IPEN/USP

FINALIDADE: Mestrado

RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE: Prof. Dr. Alexandre Galvão Patriota

Daniel Vasconcellos Figueiredo Falbel

Felipe Pires Martins

REFERÊNCIA DESTE TRABALHO:

Patriota, A. G., Falbel, D. V. F., Martins, F. **Relatório de análise estatística sobre o projeto “Avaliação da toxicidade e do tratamento de um efluente têxtil por irradiação ionizante”**. São Paulo, IME – USP, 2014. (RAE – CEA – 14P15).

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP

FICHA TÉCNICA

REFERÊNCIAS:

- Paula, A. G. **Modelos de Regressão com apoio computacional**. 2013.
- Rapado L.N. , Pinheiro A. S. , Lopes P. O. M. V. , Fokoue H. H. , Scotti M. T. , et al. 2013. **Schistosomiasis Control Using Piplartine against Biomphalaria glabrata at Different Developmental Stages**. PLoS Negl Trop Dis 7(6): e2251. doi:10.1371/journal.pntd.0002251
- Draper, N.R., Smith, H., 1998. **Applied Regression Analysis**. New York, John Wiley & Sons, Inc., 706 p.
- Oehlert, G. W. 1992. **A note on the delta method**. American Statistician 46(1).

PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS:

- Microsoft Word for Windows ®, versão 2007
- Microsoft Excel for Windows ®, versão 2007
- R (versão 3.1.1)

TÉCNICAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS:

- (Entre parênteses a classificação ISI)
- Análise Descritiva Unidimensional (03:010)
- Análise Descritiva Multidimensional (03:020)
- Estimação Paramétrica Unidimensional (04:010)
- Análise de Regressão Clássica (07:020)
- Regressão Logística (07:090)

ÁREAS DE APLICAÇÃO: Ciências do Ambiente e Ecologia (14:060)

Sumário

1. Introdução	5
2. Descrição do Estudo	6
2.1. Ensaio Ecotoxicológico	7
2.1.1. <i>Vibrio Fisher</i>	7
2.1.2. <i>Daphnia Similis</i> e <i>Brachionus Plicatilis</i>	8
2.2. Leituras de cor	8
3. Análise Estatística	8
3.1. Ensaio Ecotoxicológico	9
3.2. <i>Daphnia Similis</i>	9
3.3. <i>Vibrio Fischer</i>	15
3.4. <i>Brachionus Plicatilis</i>	22
3.4.1. Análise Exploratória	22
4. Conclusão	27
Apêndice 1 - Modelo testado	29

Resumo

A indústria têxtil descarta cerca de 35 litros de efluente (resíduo líquido resultante de processos industriais) para cada quilo de roupa tingida. O efluente descartado no meio ambiente tem um impacto ambiental negativo. Foi proposto um método de tratamento do efluente têxtil por meio de irradiação ionizante, e este método têm obtido bastante sucesso na desintoxicação dos produtos industriais. Para avaliar a eficácia do tratamento foram feitos ensaios ecotoxicológicos com o efluente. Neste relatório propomos uma análise estatística dos dados obtidos nos ensaios afim de concluir se o tratamento foi eficaz na redução da toxicidade do efluente.

1. Introdução

A indústria têxtil descarta cerca de 35 litros de efluente (resíduo líquido resultante de processos industriais) para cada quilo de roupa tingida que devido à sua toxicidade e coloração intensa, tem impacto ambiental negativo. Diante deste cenário foi proposto o tratamento do efluente por radiação ionizante (acelerador de elétrons), procedimento que, de acordo com a literatura, tem apresentado resultados positivos na remoção da cor e toxicidade.

Neste relatório, a eficiência do tratamento será avaliada por meio da análise estatística dos dados de ensaios ecotoxicológicos e de leituras de cor feitas com o efluente tratado. A partir destes dados pretende-se verificar a capacidade da irradiação ionizante em reduzir a toxicidade do efluente, validar a redução da coloração provocada pelo tratamento proposto e também identificar a dose de tratamento com melhor custo-benefício.

2. Descrição do Estudo

A etapa inicial para a obtenção dos dados consiste em alvejar e tingir um tecido de algodão cru obtendo assim o efluente e em seguida tratá-lo por irradiação ionizante. Este processo foi realizado 4 vezes, cada uma delas é chamada de **campanha**. O tratamento do efluente foi feito com as doses de 0,5 kGy; 1,0 kGy; 2,5 kGy; 5,0 kGy; 10,0 kGy; 15,0 kGy e 20,0 kGy; porém, nem todas elas estão presentes nas 4 campanhas. A unidade de medida kGy (quilogray) representa a dose de radiação em função da energia absorvida pelo material.

A avaliação do tratamento foi realizada de duas formas:

- **Ensaio ecotoxicológicos:** trata-se da coleta dos dados para a análise da toxicidade.

- **Leituras de cor do efluente:** trata-se da coleta dos dados para análise da coloração.

2.1. Ensaio Ecotoxicológicos

Um ensaio ecotoxicológico é uma técnica que permite medir a toxicidade de uma amostra de efluente por meio da exposição do micro-organismo a essa substância durante um tempo determinado. Após este tempo, algum indicador do número de sobreviventes é avaliado, assim é possível determinar o quão prejudicial é a substância. Neste estudo, os ensaios ecotoxicológicos foram realizados com três organismos diferentes: *Vibrio Fischeri*, *Daphnia Similis* e *Brachionus Plicatilis*. Todo o procedimento foi realizado seguindo as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Depois da coleta e tratamento do efluente os seguintes passos foram realizados:

- Em algumas cubetas foram depositados os organismos-teste.
- Em uma delas (controle) não houve exposição ao efluente.
- Para as demais, quantidades diferentes do efluente foram aplicadas.
- Após o tempo determinado, foi observado o indicador do número de sobreviventes.

O procedimento descrito acima foi feito para cada organismo separadamente e repetido com efluentes tratados com diferentes intensidades de radiação. A cada ensaio uma nova porção de organismos foi utilizada.

2.1.1. *Vibrio Fisheri*

O teste de toxicidade aguda com bactéria luminescente de origem marinha *Vibrio fischeri* é também conhecido comercialmente como Sistema Microtox®. A luz emitida naturalmente pela bactéria diminui proporcionalmente à toxicidade da amostra de efluente a qual foi exposta. Para testar o efeito tóxico, foram coletadas medidas da luminescência antes e depois de expor as bactérias ao efluente(tratado e bruto).

2.1.2. *Daphnia Similis* e *Brachionus Plicatilis*

Para a *Daphnia Similis* e *Brachionus Plicatilis*, a toxicidade da amostra é determinada por meio de uma contagem dos organismos vivos antes e depois de expô-los ao efluente. O número inicial de organismos foi fixado em 20 para todos os ensaios.

2.2. Leituras de cor

As leituras de cor foram realizadas por meio de espectrofotômetro em amostras brutas e tratadas. A unidade utilizada é o nanômetro (nm), que quantifica a intensidade por comprimento de onda da fonte de luz.



Figura 1: Exemplo de espectrofotômetro utilizado nas medições

3. Análise Estatística

A análise estatística foi dividida em duas etapas:

- Análise exploratória: tem como objetivo encontrar possíveis inconsistências nos dados e também auxiliar na escolha da técnica estatística adequada para a análise inferencial. Com essa análise não são obtidas conclusões finais, mas é importante para entender o comportamento dos dados.
- Análise inferencial: propõe um modelo estatístico por meio do qual é possível testar hipóteses e expor conclusões estatisticamente significativas a respeito das variáveis envolvidas na análise.

3.1. Ensaios Ecotoxicológicos

Neste trabalho, por conta da diferença de comportamento de cada organismo ao ser exposto ao efluente têxtil, a análise foi feita separadamente. Entretanto o leitor verificará que a abordagem é similar para todos os seres vivos testados. Inicialmente a quantidade de medições é apresentada para em seguida o efeito da concentração do efluente na vida dos organismos-teste ser estudado.

3.2. *Daphnia Similis*

3.2.1. Análise Exploratória

Foram realizados 53 ensaios ecotoxicológicos, cada um com sete cubetas(concentrações) diferentes utilizando o *Daphnia Similis*. Na Tabela 1 é apresentada a quantidade de ensaios feita com cada dose do tratamento.

Tratamento (kGy)	0	0,5	1	2,5	5	10	15	20
Freq	16	3	1	15	14	2	1	1

Tabela 1: Quantidade de ensaios ecotoxicológicos por dose do tratamento

As doses de radiação em que foram obtidos mais dados foram 2,5kGy e 5,0 kGy além do controle. Para as demais temos poucas observações, inclusive para algumas temos apenas um ensaio.

O Gráfico 1 mostra a proporção de mortes por cubeta pela concentração de efluente utilizada, para cada dose de radiação. O estudo foi realizado diluindo o efluente em água pura, variando assim a concentração de efluente a qual os organismos foram expostos. Ou seja, para a concentração de 0,5 temos 50% de água pura e 50% de efluente.

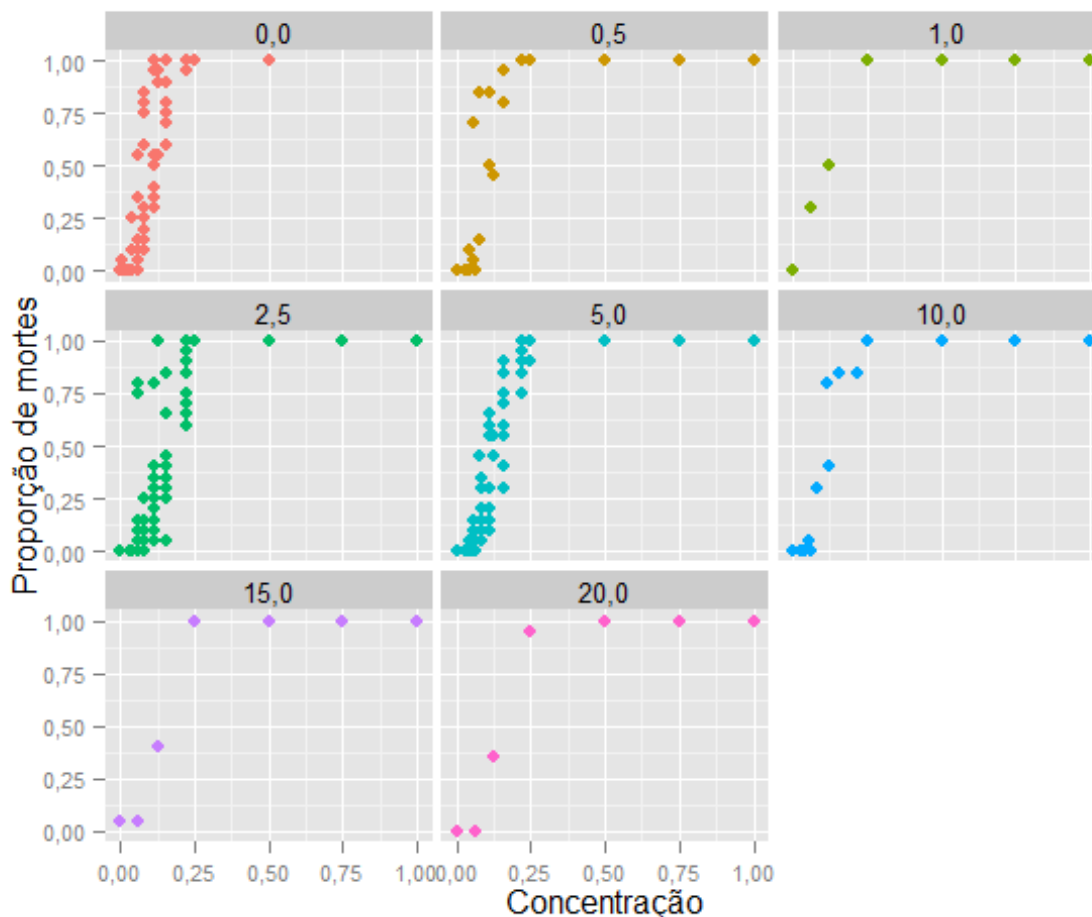


Gráfico 1: Proporção de mortes por cubeta pela concentração do efluente e por dose do tratamento.

A coordenada no eixo horizontal (Concentração) do ponto com valor 0,50 para o eixo vertical (Proporção de mortes) é chamado de CE50: é a concentração efetiva que causa letalidade ou morte a pelo menos 50% dos organismos-teste. Podemos dizer então que quanto maior o valor da CE50, melhor foi o tratamento, isto é, o efluente ficou menos tóxico. Essa medida é muito utilizada nos estudos na área ecotoxicológica para comparação de toxicidade de amostras. O mesmo conceito pode ser aplicado para qualquer concentração efetiva: CE10, CE20, etc.

Pelo Gráfico 1 é possível observar que os pontos dos tratamentos com maior dose de radiação estão deslocados para a direita, indicando que possivelmente a toxicidade do efluente diminuiu após o tratamento, uma vez que

foi necessária uma concentração maior de efluente para causar a mesma proporção de mortes nos microorganismos.

Curiosamente, os valores de CE50 para o tratamento com 2,5kGy são maiores do que os para 5kGy, o que indica que não necessariamente quanto mais intensa a radiação maior o efeito na desintoxicação.

3.2.2. Análise Inferencial

Para esta análise consideramos apenas as observações feitas para o efluente bruto e para os tratamentos com doses 2,5kGy e 5kGy por conta da baixa quantidade de medições nos demais e principalmente porque o interesse da pesquisadora era estudar especificamente estes efeitos.

De acordo com a descrição do estudo e a observação do processo foi proposto inicialmente um modelo linear generalizado de regressão com distribuição binomial e ligação logito, porém o ajuste desse modelo não se mostrou adequado. A análise indicou que existe uma variabilidade na amostra que não pode ser explicada pelas variáveis envolvidas (ver Apêndice 1).

Paula, Gilberto A. (2013) apresenta um caso semelhante ao encontrado nessa ocasião, onde os dados se comportam da mesma forma. Como solução é proposto um modelo linear generalizado com efeito aleatório, este é um modelo de sobredispersão, pois consegue incorporar a variabilidade extra apresentada pelos dados observados. As variáveis explicativas utilizadas no modelo são a concentração da amostra usada na cubeta bem como a dose do tratamento.

$$y_{ij}|\gamma_{ij} \sim \text{Binomial}(20, \mu_{ij}), \quad \gamma_{ij} \sim \text{Normal}(0, \sigma^2)$$

com

$$\log \frac{\mu_{ij}}{1 - \mu_{ij}} = \alpha + \beta_i(\text{concentração})_{ij} + \gamma_{ij}$$

em que o índice i assume um dos valores 0; 2,5; ou 5 e o j pode ser $1, 2, \dots, n_i$ em que n_i é o número de cubetas que usaram o efluente tratado com i kGy.

O parâmetro μ_{ij} é a probabilidade de um organismo que estiver na cubeta j tratado com a dose i morrer. Por fim, γ_{ij} é uma variável aleatória que afeta a probabilidade de morrer de um organismo que estiver na cubeta j em que foi usado o tratamento com i kGy. O modelo propõe que quando não há adição de efluente, ou seja a concentração é zero, não importa o tratamento a probabilidade do organismo morrer é a mesma e está relacionada ao parâmetro α . A outra suposição é que, dependendo do tratamento utilizado no efluente (sem tratamento, 2,5kGy e 5kGy), a variação na probabilidade de morte com o aumento da concentração é diferente e está relacionada ao parâmetro β_i .

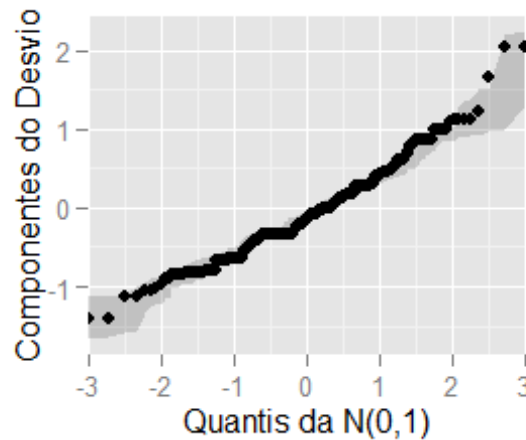


Gráfico 2: Quantil-Quantil dos resíduos do modelo com efeitos aleatórios

Pelo Gráfico 2 é possível observar que os pontos apresentam o comportamento esperado, estando em sua grande maioria dentro da banda de confiança. Além disso, como diagnóstico de ajuste do modelo utilizamos o gráfico dos resíduos pelos valores ajustados (Gráfico 3), neste esperamos que a maior parte dos pontos esteja entre -2 e 2, o que acontece neste caso indicando que o modelo está bem ajustado.

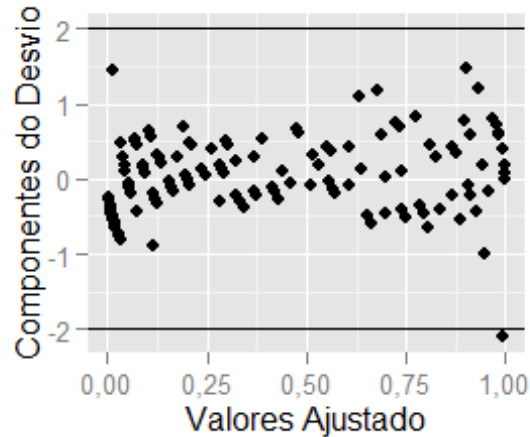


Gráfico 3: Valores Ajustados pelos Componentes do desvio

As estimativas dos parâmetros podem ser encontradas na Tabela 2:

Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	Estat. Z	Valor-p
α	-5,79	0,25	-23,35	< 0,0001*
β_0	0,55	0,03	20,00	< 0,0001*
$\beta_{2,5}$	0,37	0,02	17,92	< 0,0001*
β_5	0,42	0,02	18,97	< 0,0001*

Tabela 2: Estimativas dos parâmetros do modelo (* $p \approx 10^{-15}$)

Temos também que a estimativa de σ^2 , variância de $\gamma_{ij\cdot}$, é 1,7.

A interpretação do modelo pode ser feita a partir da exponenciação dos parâmetros. Assim temos:

- $e^{-5,79} = 0,003$ é a chance de um organismo que não foi submetido ao efluente morrer.
- $e^{0,55} = 1,733$ indica que para cada 1 ponto percentual de aumento na concentração do efluente bruto a chance do organismo morrer aumenta em aproximadamente 73%.
- $e^{0,37} = 1,448$ indica que para cada 1 ponto percentual de aumento na concentração do efluente tratado com 2,5kGy a chance do organismo morrer aumenta aproximadamente 45%.

- $e^{0,42} = 1,522$ indica que para cada 1 ponto percentual de aumento na concentração do efluente tratado com 5kGy a chance do organismo morrer aumenta aproximadamente 52%.

A partir das estimativas do modelo podemos construir uma equação para a proporção esperada de organismos mortos para cada tratamento. Essas equações podem ser obtidas isolando o parâmetro μ_{ij} na fórmula do modelo. Assim obtem-se:

- Sem tratamento (Efluente bruto):

$$\mu_{0j} = \frac{e^{-5,79+0,55*(concentração)_{0j}}}{1 + e^{-5,79+0,55*(concentração)_{0j}}}$$

- Tratamento com 2,5 kGy:

$$\mu_{2,5j} = \frac{e^{-5,79+0,37*(concentração)_{2,5j}}}{1 + e^{-5,79+0,37*(concentração)_{2,5j}}}$$

- Tratamento com 5 kGy:

$$\mu_{5j} = \frac{e^{-5,79+0,42*(concentração)_{5j}}}{1 + e^{-5,79+0,42*(concentração)_{5j}}}$$

Como não estamos prevendo a probabilidade para um organismo específico, utilizamos o valor esperado do termo γ_{ij} que é zero. O Gráfico 4 apresenta as probabilidades estimadas de morte e seus intervalos com 95% de confiança para cada tratamento e concentração.

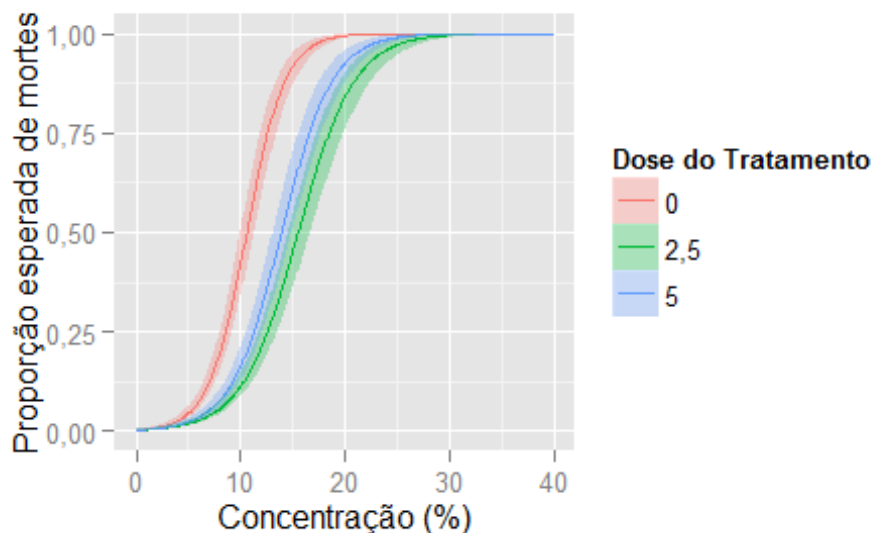


Gráfico 4: Probabilidades de morte para cada tratamento e concentração.

O principal índice utilizado para comparar os tratamentos é a CE50. Os intervalos de confiança para a CE50, apresentados na Tabela 3, foram obtidos por meio do método Delta (Oehlert, 1992).

Tratamento	CE50	Limite Inferior	Limite Superior
0,0	10,61	9,93	11,23
2,5	15,52	14,47	16,56
5,0	13,91	13,01	14,83

Tabela 3: CE50 e intervalos com 95% de confiança

Os intervalos de confiança sugerem que tratar o efluente por irradiação ionizante gera um aumento estatisticamente significativo na CE50. Por outro lado, sugerem que aumentar a dose de 2,5kGy para 5kGy não tem efeito significativo na CE50. O teste de Wald (Draper, 1998) é uma maneira mais indicada para obter essas conclusões, pois leva em conta a covariância dos parâmetros.

A partir do teste de Wald, obteve-se, ao nível de significância de 5%, que tratar o efluente diminui significativamente as probabilidades de morte pois os valores-p são menores do que 0,0001. Já o tratamento com 2,5kGy foi significativamente melhor do que o com 5kGy, com valor-p de 0,02. (ver Tabela 4)

Comparação	Estimativa	Erro Padrão	χ^2	Valor-p
$CE50_0 - CE50_{2,5}$	-4,93	0,63	61,8	$< 0,0001^*$
$CE50_0 - CE50_5$	-3,33	0,57	34,6	$< 0,0001^*$
$CE50_{2,5} - CE50_5$	1,59	0,71	5,1	0,0240

Tabela 4: Valores-p das comparações dos tratamentos (* $p \approx 10^{-15}$)

3.3. *Vibrio Fischeri*

3.3.1. Análise Exploratória

Para este organismo o número de ensaios realizados com cada dose do tratamento está na Tabela 5. Assim como para a *Daphnia Similis*, o número de ensaios foi maior para o controle e para os tratamentos com 2,5 e 5 kGy.

Tratamento (kGy)	0	0,5	1	2,5	5	10	15	20
Freq	18	4	1	18	21	5	1	1

Tabela 5: Quantidade de ensaios ecotoxicológicos por dose do tratamento

As medições do *Vibrio Fischeri* têm uma característica ligeiramente diferente da dos outros organismos. Como o indicador de efeito não é o número de sobreviventes e sim a variação da intensidade de luz emitida pelas bactérias, é possível que a medida depois de expor os organismos ao efluente aumente. Além disso, os seres podem se reproduzir durante o período do estudo, aumentando assim a medida, mesmo depois de expô-los às substâncias tóxicas. Por isso não é possível analisar os dados considerando a proporção de mortes e nem mesmo a proporção de redução da luminosidade.

A saída para este problema é considerar a seguinte transformação nas medidas, que visa relativizar cada uma pelo seu grupo controle. Em um ensaio e , dos organismos do grupo controle, calcula-se a razão dos brancos (R_e), que é taxa de crescimento. Para facilitar a escrita, denota-se que a leitura inicial, que é a leitura antes de submeter os organismos ao efluente é chamada LI e analogamente a leitura final é chamada LF . O índice representará a concentração do efluente. Então:

$$R_e = \frac{LF_{Controle}}{LI_{Controle}}$$

Em seguida, para cada concentração k usada no ensaio, é calculado coeficiente γ que é uma medida do quanto a luminosidade variou para aquela concentração em relação à concentração controle. Seu cálculo pode ser realizado usando a fórmula abaixo:

$$\gamma = \frac{LI_k * R_e}{LF_k} - 1$$

É possível verificar que quando o valor de γ é 0 a variação da luminosidade ao expor as bactérias ao efluente em concentração k foi igual ao ocorrido com o grupo controle. Analogamente, quando $\gamma = 1$ temos que a luminosidade emitida após a exposição ao efluente com concentração k foi metade da emitida pelo controle, ou seja a CE50. O próximo passo é converter o coeficiente γ para o que chamamos de percentual de inibição segundo o cálculo abaixo:

$$inibição = \frac{\gamma}{1 + \gamma}$$

Esse percentual é mais intuitivo uma vez que, como dito anteriormente, quando $\gamma = 1$ temos a CE50. Logo pela fórmula o percentual de inibição é 50%, ou seja, podemos entender a inibição como a proporção de mortes.

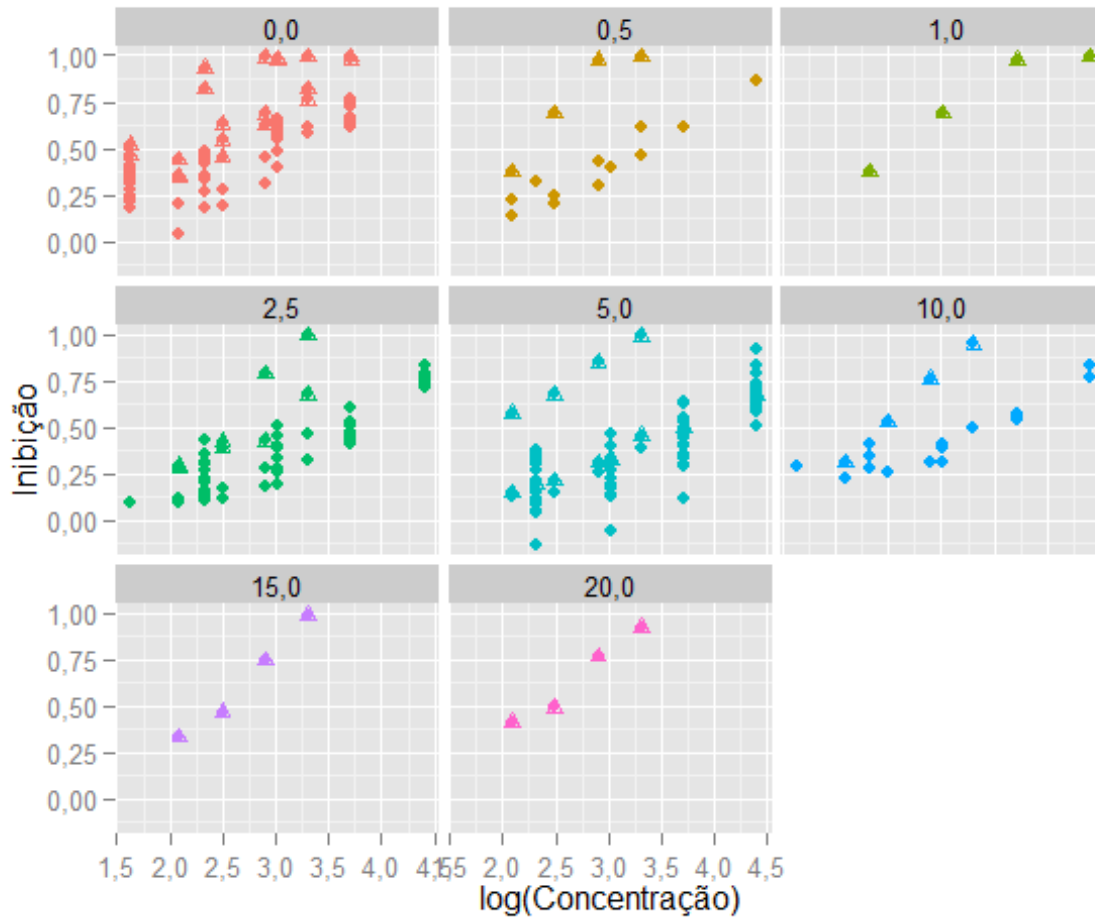


Gráfico 5: Inibição pelo logaritmo da concentração. (O formato triangular indica que a observação pertence à primeira campanha)

No Gráfico 5 nota-se que os pontos da campanha 1 (em formato triangular) possuem valores distantes de inibição das demais observações. Isso não deveria acontecer dado que o procedimento realizado foi o mesmo em todas as campanhas. Comparando os tratamentos, observa-se que os pontos do efluente tratado com maior intensidade de irradiação ionizante estão deslocados para a direita indicando que houve maior redução de toxicidade.

3.3.2. Análise Inferencial

Foi proposto um modelo de regressão linear simples da seguinte forma:

$$y_{ijk} = \alpha_i + \beta_j * [\log(\text{concentração})]_{ijk} + e_{ijk}$$

com i sendo 0 ou 1: 0 quando a observação foi realizada nas campanhas 2, 3 ou 4 e 1 quando foi realizada na primeira campanha. O índice j assume os valores 0 ,

2,5 e 5 dependendo do tratamento aplicado no efluente. Já k assume os valores $1, 2, 3, \dots, n_{ij}$ em que n_{ij} é o número total de observações feitas para cada combinação de i e j . A resposta y_{ijk} é a inibição observada para a k -ésima observação feita nas campanhas i e submetida ao efluente com tratamento j , e e_{ijk} tem distribuição Normal com média zero e variância σ^2 .

Inicialmente foi ajustado um modelo com um intercepto diferente para cada campanha, no entanto foi identificado que apenas a campanha 1 era significativamente diferente das outras, como foi indicado na análise descritiva. Por isso, o índice i pode assumir apenas dois valores, um quando a observação foi feita na campanha 1 e 0 caso tenha sido feita em qualquer uma das demais.

Após o ajuste do modelo proposto obteve-se o Gráfico 6.

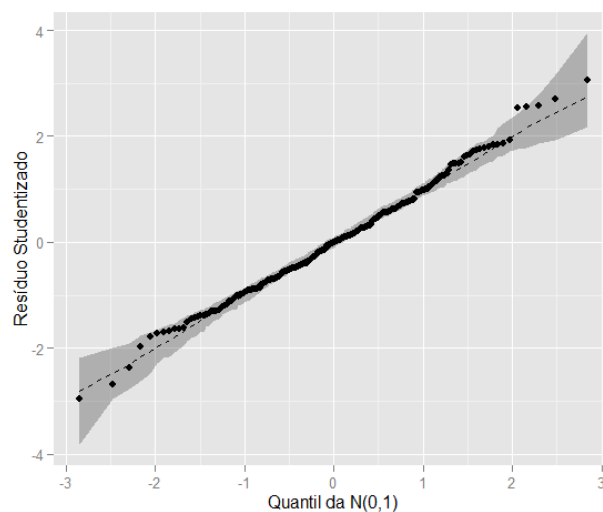


Gráfico 6: qqplot dos resíduos do modelo ajustado

Observamos que todos os pontos estão dentro da banda de confiança, indicando que a distribuição normal é adequada aos dados. O Gráfico 7 também indica um bom ajuste, pois a maior parte dos pontos está dentro do intervalo -2 e 2 distribuídos de forma aleatória.

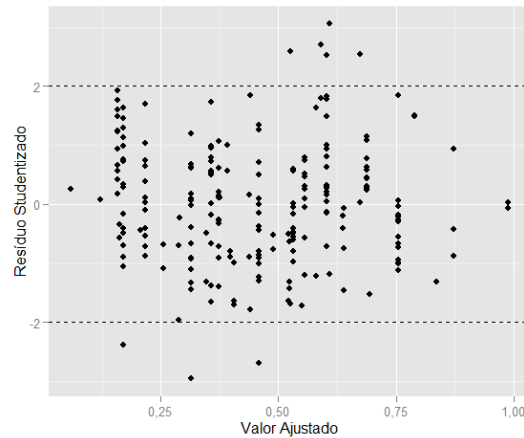


Gráfico 7: Dispersão dos valores ajustados pelos resíduos studentizados

As estimativas dos parâmetros do modelo são dadas pela tabela 6:

	Estimativa	Erro Padrão	Estat t	Valor-p
α_0	-0,31	0,0368	-8,4579	< 0,0001*
α_1	-0,08	0,0389	-1,9838	0,0425
β_0	0,29	0,0137	20,9490	< 0,0001*
$\beta_{2,5}$	0,23	0,0118	19,2778	< 0,0001*
β_5	0,21	0,0113	18,3352	< 0,0001*

Tabela 6: Estimativas dos parâmetros (* $p \approx 10^{-15}$)

Os parâmetros podem ser interpretados da seguinte forma:

- $\hat{\alpha}_0 = -0,31$ é a inibição esperada para uma observação da campanha 2, 3 ou 4 que não foi submetida a nenhum efluente.
- não foi submetida a nenhum efluente.
- $\hat{\beta}_0 = 0,29$ é o acréscimo esperado na inibição com o aumento de uma unidade do log da concentração de efluente bruto.
- $\hat{\beta}_{2,5} = 0,23$ é o acréscimo esperado na inibição com o aumento de uma unidade do log da concentração de efluente tratado a 2,5kGy.
- $\hat{\beta}_5 = 0,21$ é o acréscimo esperado na inibição com o aumento de uma unidade do log da concentração de efluente tratado a 5kGy.

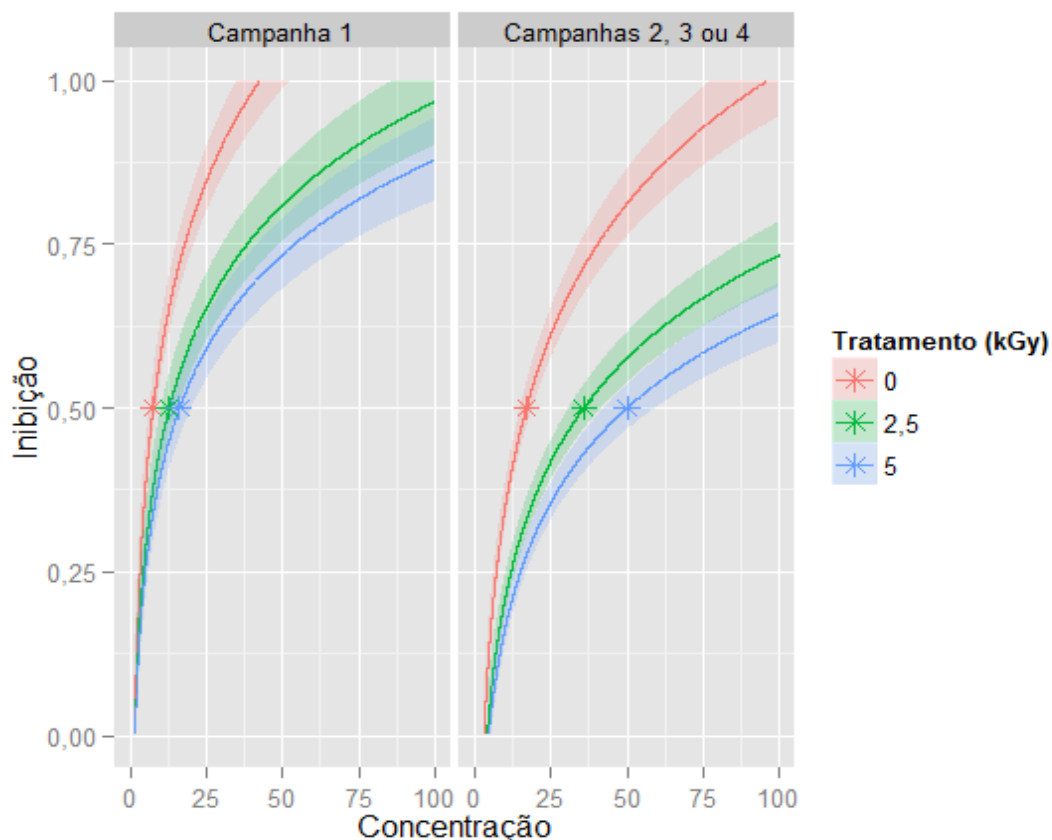


Gráfico 8: Inibição esperada e intervalos de confiança pelas concentrações, tratamentos e campanhas

A abcissa dos pontos das curvas com ordenada 0,5 é chamada de CE50 (pontos destacados no Gráfico 8). No modelo ajustado temos as seguintes estimativas com intervalos de confiança, obtidas por meio do método Delta. São apresentadas apenas as estimativas para as campanhas 2, 3 e 4, pois o comportamento dos dados da campanha 1 foi muito diferente das demais e há indícios de que algum outro fator pode ter influenciado os resultados.

Tratamento	CE50	Limite Inferior	Limite Superior
0,0	16,85	15,05	19,01
2,5	35,70	31,01	41,73
5,0	49,92	42,73	59,54

Tabela 7: Estimativas pontuais e intervalares (95% de confiança) para a CE50.

Usando testes de Wald é possível concluir que todos os tratamentos são significativamente diferentes. No caso, tratar o efluente com qualquer dose de irradiação ionizante aumenta a CE50, pois os valores-p são menores do que 0,001. Para a *Vibrio Fischeri*, aumentar a dose de 2,5kGy para 5kGy também aumenta a CE50, este teste teve valor-p 0,002.(ver Tabela 8)

Comparação	Estimativa	Erro padrão	χ^2	Valor-p
$CE50_0 - CE50_{2,5}$	-18,71	1,69	37,12	< 0,001*
$CE50_0 - CE50_5$	-33,48	2,38	62,76	< 0,001*
$CE50_{2,5} - CE50_5$	-13,57	3,42	1,13	0,0023

Tabela 8: Valores-p das comparações dos tratamentos (* $p \approx 10^{-15}$)

Da Tabela 8 conclui-se que existe aumento significativo de aproximadamente 18 pontos percentuais, ao nível de confiança de 95%, na CE50 quando o efluente é tratado com 2,5kGy em relação ao efluente bruto. Também, há aumento de 14 pontos percentuais quando o efluente é tratado com 5kGy em relação ao tratado com 2,5kGy.

3.4. *Brachionus Plicatilis*

3.4.1. Análise Exploratória

O estudo realizado foi análogo ao do *Daphnia Similis*, porém aqui foram feitos 14 ensaios apenas, conforme a Tabela 9.

Tratamento (kGy)	0	0,5	2,5	5	10
Freq	4	2	3	3	2

Tabela 9: Quantidade de ensaios ecotoxicológicos por dose do tratamento

O Gráfico 9 mostra a proporção de mortes pela concentração de efluente utilizada na cubeta. É possível ver que os pontos submetidos ao efluente tratado parecem estar deslocados para a direita, indicando que o tratamento reduziu efetivamente a toxicidade do efluente. Ainda, nota-se que os pontos submetidos ao efluente tratado com 2,5kGy parecem estar mais a direita do que os

submetidos ao tratado com 5kGy ou 10kGy, indicando que este tratamento parece ter sido mais eficiente.

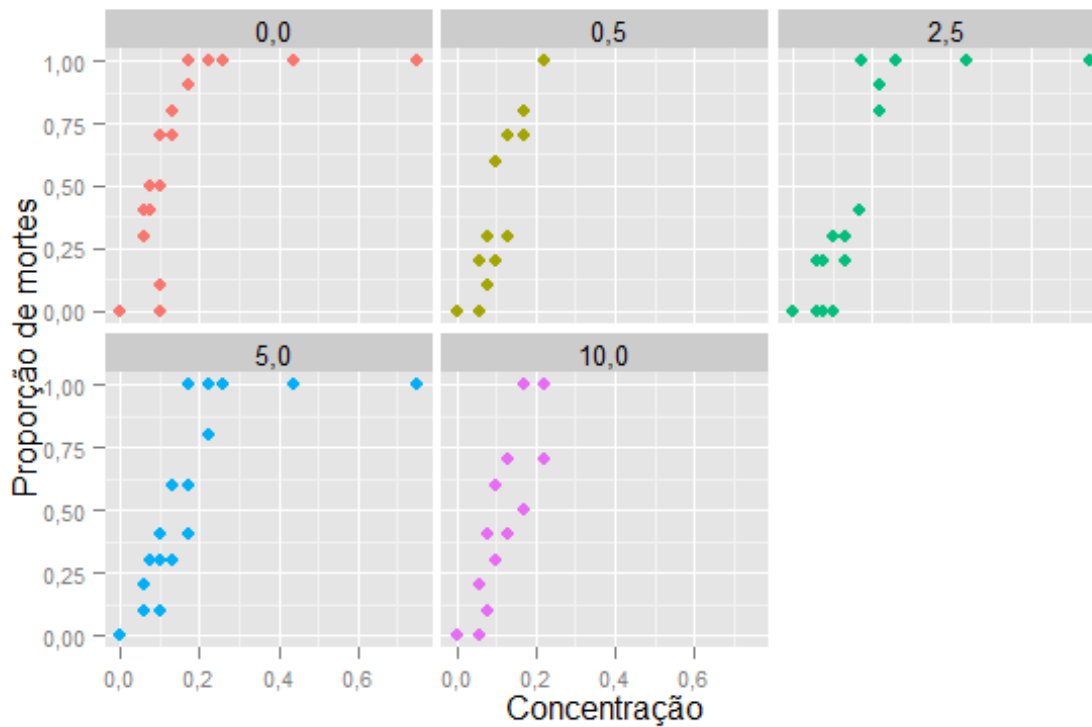


Gráfico 9: Proporção de mortes por cubeta pela concentração do efluente e por dose do tratamento.

3.4.2. Análise Inferencial

Analogamente ao encontrado com a *Daphnia Similis*, foi observado o efeito da sobredispersão nos dados do rotífero. Mais uma vez, esse efeito foi corrigido utilizando o modelo linear generalizado com distribuição binomial e com efeito aleatório, especificado da mesma maneira que o modelo proposto para o organismo *Daphnia Similis*.

As equações a seguir especificam o modelo:

$$y_{ij} | \gamma_{ij} \sim \text{Binomial}(10, \mu_{ij}), \quad \gamma_{ij} \sim \text{Normal}(0, \sigma^2)$$

e

$$\log \frac{\mu_{ij}}{1-\mu_{ij}} = \alpha + \beta_i(\text{concentração})_{ij} + \gamma_{ij},$$

em que y_{ij} é o número de organismos mortos submetidos ao tratamento i na cubeta j . O parâmetro μ_{ij} é a probabilidade de um organismo submetido ao tratamento i e que está na cubeta j morrer. Este parâmetro está ligado ao preditor linear por meio da ligação logito. Temos no modelo especificado, um intercepto α igual para todas as observações somado ao termo aleatório diferente para cada uma das cubetas utilizadas no estudo. Os efeitos dos tratamentos estão expressos pelos parâmetros β_i , isto é, dependendo do tratamento o aumento da concentração afeta diferentemente a probabilidade de morte de um organismo.

Da mesma forma que para os estudos feitos para os outros organismos, foram consideradas as observações submetidas apenas ao efluente bruto e tratado com 2,5kGy e 5kGy, pois são tratamentos com os maiores números de observações, além de serem o principal objetivo do estudo. Portanto o índice j no modelo assume apenas os valores 0, 2,5 e 5.

Após o ajuste do modelo foi feito o Gráfico 9. Era esperado que todos os pontos estivessem dentro da banda de confiança, o que aconteceu.

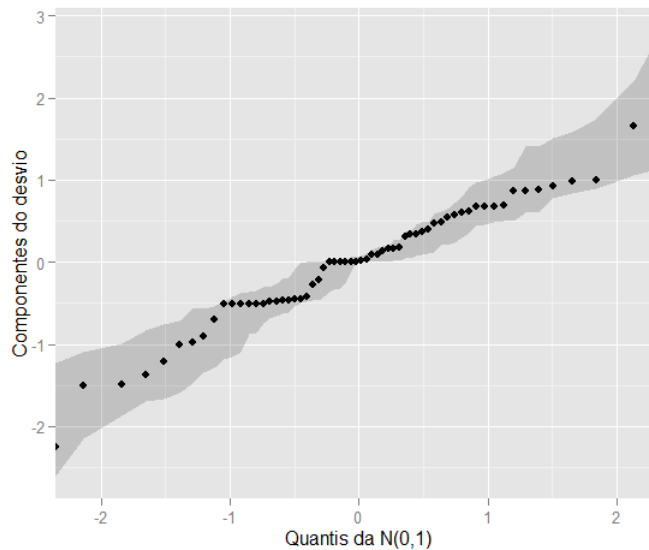


Gráfico 9: Qqplot dos resíduos do modelo ajustado e banda de confiança

Também foi feito o gráfico dos valores ajustados pelos resíduos do modelo (Gráfico 10), para verificar a existência de pontos aberrantes que poderiam causar problemas nas estimativas dos parâmetros.

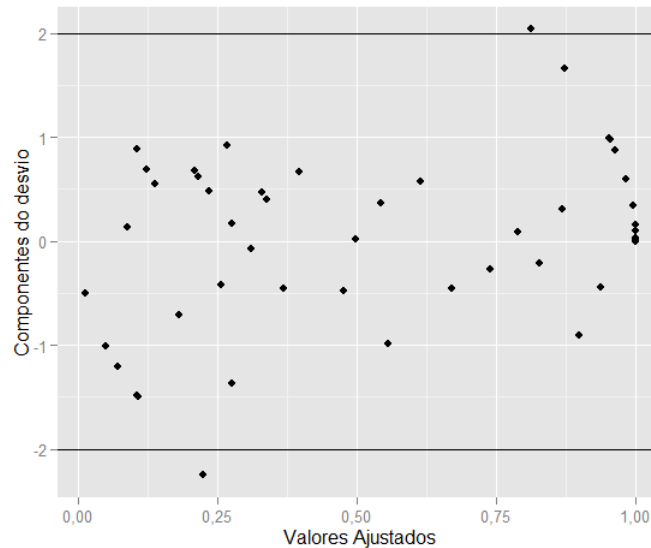


Gráfico 10: Dispersão dos valores ajustados pelos resíduos

Como apenas um ponto está fora do intervalo esperado, é possível concluir que o ajuste do modelo está adequado. A seguir, é apresentada a Tabela 10 com a estimativa dos parâmetros.

	Estimativa	Erro Padrão	Estat z	Valor-p
α_0	-4,29	0,4871	-8,8129	< 0,0001*
β_0	0,42	0,0495	8,5672	< 0,0001*
$\beta_{2,5}$	0,27	0,0367	7,4064	< 0,0001*
β_5	0,32	0,0405	7,8319	< 0,0001*

*Tabela 10: Estimativas dos parâmetros do modelo ajustado * ($p \approx 10^{-15}$)*

Temos também que a estimativa de σ^2 , a variância de γ_{ij} , é 0,56.

A interpretação do modelo pode ser feita a partir da exponenciação dos parâmetros. Assim temos:

- $e^{-4,29} = 0,01$ é a chance de um organismo que não foi submetido ao efluente morrer.
- $e^{0,42} = 1,53$ indica que para cada 1 ponto percentual de aumento na concentração do efluente bruto a chance do organismo morrer aumenta em aproximadamente 53%.
- $e^{0,27} = 1,31$ indica que para cada 1 ponto percentual de aumento na concentração do efluente tratado com 2,5kGy a chance do organismo morrer aumenta aproximadamente 31%.
- $e^{0,32} = 1,37$ indica que para cada 1 ponto percentual de aumento na concentração do efluente tratado com 5kGy a chance do organismo morrer aumenta aproximadamente 37%.

A partir do modelo ajustado foram construídas as curvas da proporção esperada de organismos mortos por tratamento e por concentração do efluente. As curvas estão apresentadas no Gráfico 11.

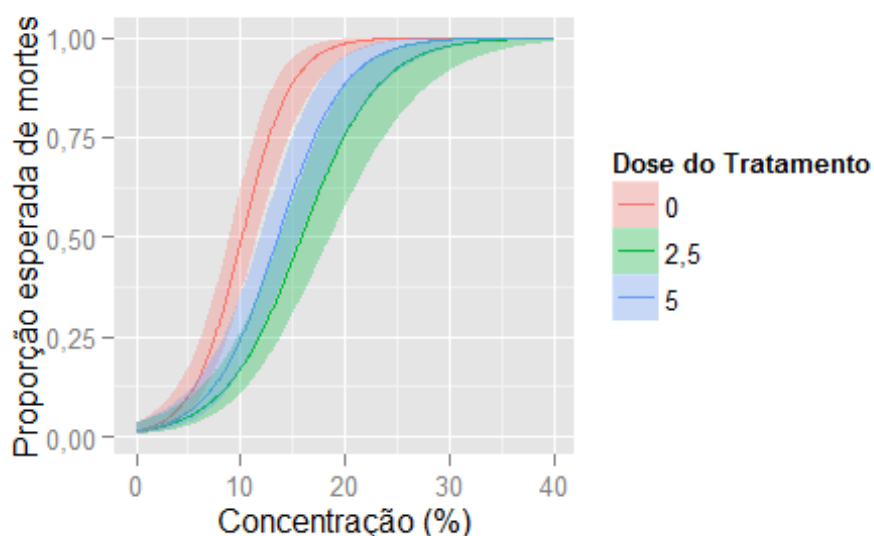


Gráfico 11: Probabilidades de morte para cada tratamento e concentração.

Pelo método Delta, é possível obter intervalos de confiança para a CE50, que é o valor da abscissa do ponto com ordenada 0,5 nas curvas. A Tabela 11 apresenta os intervalos.

Tratamento	CE50	Limite Inferior	Limite Superior
0,0	10,11	9,29	11,87
2,5	15,82	13,20	17,82
5,0	13,51	12,09	15,75

Tabela 11: CE50 e intervalos com 95% de confiança para cada tratamento.

Por meio de testes de Wald, é possível concluir, ao nível de significância de 5%, que o tratamento por irradiação é estatisticamente eficaz para a redução da toxicidade do efluente, os valores-p obtidos são menores do que 0,0025. No entanto, não foi possível concluir qual dose de tratamento é mais eficaz, valor-p 0,13.(ver Tabela 12)

Comparação	Estimativa	Erro Padrão	χ^2	Valor-p
$CE50_0 - CE50_{2,5}$	-5,67	1,35	17,8	< 0,0001*
$CE50_0 - CE50_5$	-3,41	1,12	9,2	0,0024
$CE50_{2,5} - CE50_5$	2,26	1,50	2,3	0,1305

Tabela 12: Valores-p das comparações dos tratamentos ($p \approx 10^{-12}$)*

4. Conclusão

Neste trabalho foram analisados ensaios ecotoxicológicos feitos com três organismos para verificar se o tratamento do efluente têxtil por irradiação ionizante foi capaz de reduzir a toxicidade dos efluentes.

Observou-se na análise exploratória que os tratamentos pareciam ter efeito, pois aumentaram a CE50 da amostra estudada. Com o ajuste de modelos estatísticos apropriados, foi possível concluir ao nível de significância de 5% que o tratamento do efluente com doses de 2,5kGy e 5kGy de irradiação ionizante teve resultados positivos no aumento da CE50 (redução da toxicidade). No entanto, não foi possível concluir estatisticamente se alguma das doses teve resultados

melhores, embora para os organismos *Daphnia* e *Brachionus* o tratamento com 2,5kGy tenha mostrado melhores resultados na amostra quando comparado ao tratamento com 5,0kGy.

Apêndice 1 - Modelo testado

Após a análise exploratória e avaliação do problema, o primeiro modelo proposto foi um linear generalizado de regressão com distribuição binomial e ligação logito que também foi utilizado em trabalhos semelhantes como em Bragança et al. (2013). Essa sugestão também partiu do fato de que os dados tem origem de contagem, isto é, a variável resposta é o número de organismos mortos em cada cubeta.

O modelo segue a seguinte regra:

$$y_{ij} \sim \text{Binomial}(\mu_{ij}, 20)$$

com

$$\log \frac{\mu_{ij}}{1 - \mu_{ij}} = \alpha + \beta_i(\text{concentração})_{ij}$$

Note que a única diferença para o modelo anterior (ver Análise Inferencial) é a ausência da variável aleatória γ_{ij} .

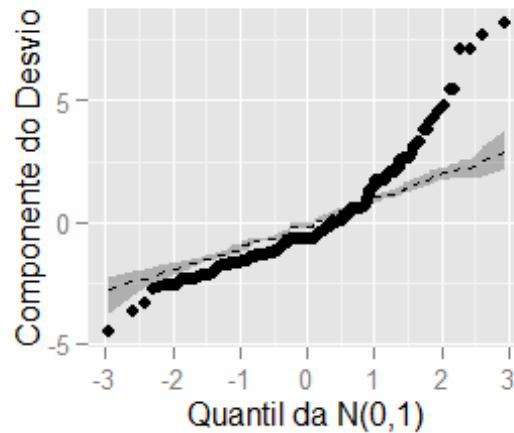


Gráfico 9: Quantil-Quantil com banda de 95% de confiança

Apesar dos indícios de que este seria um modelo adequado, o Gráfico 9 evidenciou que os dados não se adequam à distribuição binomial. Isto porque esperávamos, se o modelo estivesse bem ajustado, que todos os pontos estivessem dentro da banda de confiança. Os pontos estarem fora da banda de confiança indicam que existe uma variabilidade na amostra que não pode ser explicada pelas variáveis utilizadas no modelo.