

# ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO CAFÉ NO GANHO DE PESO DE ANIMAIS (RATOS) POR MEIO DE MODELO LINEAR MISTO

Wederson Leandro FERREIRA<sup>1</sup>

Augusto Ramalho de MORAIS<sup>2</sup>

- RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar, por meio da metodologia estatística de modelo linear misto, a influência do uso de café, da espécie *Coffea arabica*, no controle de pesos de animais (ratos), submetidos a diferentes dietas alimentares com e sem extrato aquoso de café. Foram utilizados dados de peso de ratos obtidos de experimento realizado no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, para avaliar seis dietas alimentares, utilizando o delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, tendo sido avaliados semanalmente, durante 15 semanas, após 4ª semana do nascimento. Após análise gráfica preliminar, procedeu-se ao ajuste de curvas polinomiais de crescimento através do software SAS, utilizando distintas estruturas de covariâncias para descrição do perfil de correlação entre medidas em uma mesma unidade experimental (rato). Verificou-se efeitos significativos dos tratamentos (dietas, semanas e interação entre dietas com semanas) sobre o peso dos animais. A estrutura de covariâncias não estruturada (UN) e a estrutura componente de variância (VC) foram as mais adequadas pelo critério de informação de Akaike. Somente na dieta (N), que recebeu ração de biotério enriquecida com ração para cães, o uso do café apresentou tendência a diminuir o peso médio dos animais (ratos) ao longo das semanas avaliadas.
- PALAVRAS-CHAVE: Dados longitudinais; modelo de coeficientes aleatórios; *Coffea arabica*.

## 1 Introdução

Muitos são os campos da pesquisa nos quais são realizadas observações sucessivas sobre a mesma unidade experimental, como ocorre, por exemplo, na avaliação do crescimento em peso de espécies animais. Planejamentos desse tipo permitem que se avaliem as mudanças que ocorrem ao longo do tempo.

Como as medidas são realizadas nas mesmas unidades experimentais e, em geral, de modo sistemático, é de se esperar que ocorra correlação não nula entre as medidas sucessivas no tempo, bem como exista certa heterogeneidade de variâncias (XAVIER e DIAS, 2001). Nesse caso, segundo Cecon et. Al (2008), é possível considerar que as respostas de tempos mais próximos sejam mais correlacionadas do que aquelas de tempos

---

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras – UFLA, Programa de Pós-graduação em Estatística e Experimentação Agropecuária-PPEEA, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras, MG, Brasil. E-mail: [wedelean@gmail.com](mailto:wedelean@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras – UFLA, Departamento de Ciências Exatas-DEX, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras, MG, Brasil. E-mail: [armorais@ufla.br](mailto:armorais@ufla.br)

mais distantes, tornando, quase sempre, característica comum a dados mensurados ao longo do tempo (LITTELL et al., 2006).

Tendo em vista este aspecto, é primordial uma abordagem apropriada à análise estatística dos dados, que leve em consideração essa correlação entre as observações em uma mesma unidade experimental, porque, caso contrário, as inferências realizadas podem ser inválidas ou distorcidas da realidade.

A análise estatística de dados com essa característica pode ser feita utilizando-se técnicas uni ou multivariadas que, geralmente, são direcionadas a dados obtidos nos mesmos instantes de tempo para todos os tratamentos e, também, com ausência de parcelas perdidas.

A análise estatística utilizando um modelo univariado de acordo com o esquema de parcelas subdivididas no tempo impõe forte restrição quanto à matriz de variâncias-covariâncias. Outra alternativa é o modelo multivariado, que utiliza uma matriz de variâncias-covariâncias sem restrições, chamada não-estruturada com o intuito de descrever a dependência existente entre os erros dos diferentes tempos. Entretanto, ao usar o modelo univariado, utilizando-se o esquema de parcela subdividida no tempo, há a pressuposição de homogeneidade de variâncias e correlações nulas quanto a estrutura da matriz de variâncias e covariâncias do erro experimental (GILL e HAFS, 1971; FREITAS et al., 2008). Fato este que contraria a correlação serial geralmente existente entre as observações obtidas longitudinalmente de uma mesma unidade experimental. Já o modelo multivariado, segundo Hair et al. (2009) e Johnson e Wichern (2007), apresenta a desvantagem de necessitar de perfis individuais completos, ausência de parcelas perdidas, e também o baixo poder dos testes clássicos multivariados devido ao excesso de parametrização ao realizar a análise de variância multivariada.

Portanto, outra metodologia estatística que considera essa característica dos dados e que pode ser utilizada é a metodologia dos modelos lineares mistos. Pinheiro e Bates (2000) relatam que modelo linear misto é aquele que apresenta fatores ou parâmetros de efeitos fixos e de efeitos aleatórios, além do erro experimental e da constante  $\mu$ .

Ao ajustar curvas polinomiais de crescimento, os coeficientes de regressão das curvas individuais (unidades experimentais) serão considerados efeitos aleatórios por variarem de acordo com a unidade utilizada e os coeficientes de regressão das curvas médias, efeitos fixos (HAUSER et al., 2009).

Esta metodologia permite a inclusão de efeitos aleatórios, tornando possível, desta forma, a modelagem da correlação intraindivíduo, presente, muitas vezes, em dados agrupados e aos quais se permite atribuir uma distribuição de probabilidade. Portanto, o modelo linear misto torna-se uma extensão do modelo linear geral e apresenta maior flexibilidade, porque permite a inclusão de estrutura de interdependência das observações e, com isso, acomoda a estrutura de correlação presente nas medidas repetidas (HAUSER et al., 2009).

Os modelos lineares mistos possuem as mais variadas aplicações e têm sido tema de grande relevância na área de estatística atualmente. Essa metodologia foi inicialmente estudada a partir da metade do século XX por Henderson (1949) e tornou-se mais conhecida nas últimas décadas devido ao advento de técnicas computacionais robustas, pois, devido a esse fato, até então se usavam, predominantemente, modelos de efeitos fixos.

Sendo assim, a utilização de modelos lineares mistos no intuito de estudar a influência das covariáveis presentes no modelo, torna-se uma técnica alternativa versátil, pois possibilita considerar distintas estruturas para a matriz de variâncias e covariâncias. Segundo Laird e Ware (1982), possui a vantagem de poder ser utilizado em conjunto de dados não balanceados em relação ao tempo e, ainda, permite a inclusão da matriz de covariância com número menor de parâmetros, comparado aos modelos multivariados.

Considerando como efeitos fixos: dietas, semanas e interação entre dietas  $\times$  semanas e que o comportamento da variável resposta para cada tratamento possa ser explicado por curvas polinomiais quadráticas, por exemplo, e considerando o intercepto, o coeficiente linear e o coeficiente quadrático das curvas individuais (unidades experimentais) como aleatórios, o modelo linear misto escrito na forma geral, conforme Laird e Ware (1982), para cada unidade experimental  $i$ , é:

$$y_i = X_i\beta + Z_i b_i + e_i \quad (1)$$

em que  $y_i$  é o vetor de valores na unidade experimental  $i$  e no tempo  $t$ , de dimensão  $t \times 1$ ;  $X_i$  é a matriz conhecida do planejamento experimental relativa aos parâmetros de efeitos fixos (tratamento, tempo, interação de tempo  $\times$  tratamento e interação de tratamento  $\times$  tempo<sup>2</sup>, sendo esse último efeito incluído após considerar um ajuste quadrático) ligando  $\beta$  a  $y_i$  de dimensão  $t \times p$ ;  $\beta$  é um vetor, de dimensão  $p \times 1$ , desconhecido, formado pelos efeitos fixos;  $Z_i$  é a matriz, de dimensão  $t \times q$ , relativa aos efeitos aleatórios (intercepto, coeficiente linear e o coeficiente quadrático das curvas individuais  $i$ , sendo cada componente expresso por  $b_{0i}$ ,  $b_{1i}$  e  $b_{2i}$  respectivamente) ligando  $b_i$  a  $y_i$ ;  $b_i$  é um vetor de efeitos aleatórios ( $b_{0i}$ ,  $b_{1i}$  e  $b_{2i}$ ) desconhecidos de dimensão  $q \times 1$  e  $e_i$  vetor de erros aleatórios não observáveis, de dimensão  $t \times 1$ .

Na descrição anterior, o vetor de erros aleatórios  $e_i$  associado à unidade experimental  $i$  é distribuído como  $N(0, R)$ , ou seja, normal multivariada com vetor de média 0 e matriz de covariância  $R$ , sendo a matriz  $R$  positiva definida de dimensão  $t \times t$ . Também, o vetor de efeitos aleatórios  $b_i = (b_{0i}, b_{1i}, b_{2i})$  distribuído como  $N(0, G)$ , ou seja, normal multivariada com vetor de média 0 e matriz de covariância  $G$ , positiva definida e de dimensão  $3 \times 3$ . Os autores Nobre e Singer (2007) ainda destacam que usualmente, além da normalidade assumida, pressupõe-se que  $b_i$  e  $e_i$  são independentes.

Henderson, Kempthorne e Searle (1959) provaram que a estimação dos efeitos fixos  $\hat{\beta}$ , dado pelo modelo (1), coincide com a solução obtida pelo método de mínimos quadrados generalizados, cuja expressão é:

$$\hat{\beta} = (X' V^{-1} X)^{-} X' V^{-1} y \quad (2)$$

em que,  $(X' V^{-1} X)^{-}$  é uma inversa generalizada, pois a matriz  $X' V^{-1} X$  não possui inversa simples. A predição dos efeitos aleatórios  $\hat{b}$ , segundo Henderson (1963), é dada por

$$\hat{b} = G Z V^{-1} (y - X \hat{\beta}) \quad (3)$$

em que

$$V^{-1} = R^{-1} - R^{-1} Z (Z' R^{-1} Z + G^{-1})^{-1} Z' R^{-1}.$$

Para a estimação e predição dos parâmetros  $\hat{\beta}$  e  $\hat{b}$ , respectivamente, do modelo (1), é necessário que se conheça a estrutura de  $V$ , porém, a mesma está condicionada às estruturas de  $R$  e  $G$ , que são desconhecidas na maioria das vezes. Sendo assim, para se obter  $V$ , é necessário estimar os parâmetros de  $R$  e  $G$ .

A estimação de  $G$  e  $R$  pode ser realizada por vários métodos, dentre os quais destaca-se o método de máxima verossimilhança restrita (REML) (SEARLE; CASELLA; MCCULLOCH, 1992). Os estimadores de máxima verossimilhança restrita são obtidos maximizando-se a parte da função de verossimilhança que é invariante ao parâmetro de locação, isto é, em termos do modelo misto, é invariante para  $X\beta$  (PERRI; IEMMA, 1999). Esse método é não viesado e permite também imposição de não negatividade.

Neste método são geradas equações cujas soluções fornecem estimativas para os parâmetros de  $G$  e  $R$ . Essas estimativas são obtidas por processos iterativos, uma vez que não é possível a obtenção de expressões analíticas para os parâmetros. Portanto, são utilizados algoritmos tais como o Newton-Raphson, dentre outros. O processo é repetido até que o critério de convergência seja atendido.

Para realizar inferências nos parâmetros de efeitos fixos  $\beta$  e aleatórios  $b$  no modelo misto, são consideradas funções lineares estimáveis da seguinte forma, segundo Littell et al. (2006):

$$\omega = L \begin{bmatrix} \beta \\ b \end{bmatrix}. \quad (4)$$

Funções dessa forma são chamadas de funções predizíveis se a parte fixa  $\beta$  da matriz  $L$  atender à exigência de estimabilidade. Como a inferência sobre os efeitos fixos é o foco principal, a parte de  $b$  associada a  $L$  assume valores nulos.

Inferências estatísticas podem ser obtidas por meio da formulação da seguinte hipótese nula:

$$H_0 = L \begin{bmatrix} \beta \\ b \end{bmatrix} = 0. \quad (5)$$

Quando  $L$  é composta por uma única linha, uma estatística  $t$  geral pode ser construída, como segue abaixo:

$$t = \frac{L \begin{bmatrix} \hat{\beta} \\ \hat{b} \end{bmatrix}}{\sqrt{L\hat{C}L'}} \quad (6)$$

em que

$$\hat{C} = \begin{bmatrix} X'\hat{R}^{-1}X & X'(\hat{R}^{-1})Z \\ Z'\hat{R}^{-1}X & Z'\hat{R}^{-1}Z + \hat{G}^{-1} \end{bmatrix}^{-1} \quad (7)$$

é uma inversa generalizada. Assumindo as pressuposições dos termos aleatórios  $b$  e  $e$  do modelo (1) serem distribuídos normalmente,  $t$  geralmente terá distribuição aproximada.

Denotando  $\nu$  como os números de graus de liberdade associado a  $\omega$ , o intervalo de confiança de  $\omega$  será o seguinte:

$$L \begin{bmatrix} \beta \\ b \end{bmatrix} \pm t_{(\nu, \alpha/2)} \sqrt{L\hat{C}L'}$$

sendo  $t_{(\nu, \alpha/2)}$  percentil  $(1 - \alpha/2)100\%$  da distribuição  $t_\nu$ .

Ocorre que o posto de  $L$  pode ser maior que 1 e, neste caso, deve-se considerar a estatística  $F$ :

$$F = \frac{\begin{bmatrix} \hat{\beta} \\ \hat{b} \end{bmatrix}' L'(L\hat{C}L')^{-1}L \begin{bmatrix} \hat{\beta} \\ \hat{b} \end{bmatrix}}{\text{posto}(L)}. \quad (8)$$

De forma semelhante à distribuição  $t$ , a distribuição  $F$ , em geral, tem distribuição aproximada com número de graus de liberdade do numerador igual ao  $\text{posto}(L)$  e  $\hat{v}$  como número de graus de liberdade do denominador. Portanto, as estatísticas  $t$  e  $F$  permitem fazer inferências sobre os efeitos fixos estimados para o modelo de covariância selecionado.

O café é uma bebida muito apreciada, especialmente por suas características de sabor e aroma. Além disso, algumas de suas propriedades relacionadas ao bem-estar e à manutenção do estado de alerta também são mencionados pelos autores (MACHADO; DÓREA; COSTA, 2011). No entanto, café desperta interesse devido aos seus aspectos funcionais associados à saúde. Ainda relatam que é um produto de complexa composição química, principalmente após sua torrefação, durante a qual compostos originais do grão são degradados e novos compostos são formados, garantindo a presença de substâncias nutritivas, bioativas e características de sabor e aroma.

Em pesquisa realizada na Universidade do Arizona com ingestão de café por pessoas idosas, Ryan, Hatfield e Hofstter (2002) mostraram forte ligação entre consumo de café e evolução na performance da memória ao longo do dia, sobretudo verbal e de raciocínio espacial. Já estudos realizados por Smith et al. (2003) indicam que a cafeína interfere no desempenho danoso produzido pela fadiga e aumenta o estado de alerta, com o aumento dos movimentos oculares sacádicos e a ansiedade, desde que ingeridos em pequenas doses.

Neste trabalho, propôs-se analisar um conjunto de dados em que um dos objetivos propostos no experimento foi analisar a influência do café no ganho de peso de animais (ratos) ao longo do tempo. Foi utilizado a metodologia de modelo linear misto para analisar este conjunto de dados, pois pela característica longitudinal com que os dados foram obtidos é uma técnica que possibilita captar com eficiência a correlação serial provavelmente existente nestes dados, sobretudo nos tempos mais próximos. Normalmente, devido as características peculiares deste conjunto de dados, estes seriam analisados utilizando técnicas uni ou multivariadas, entretanto, conforme já comentado anteriormente, foi utilizado a metodologia de modelo linear misto devido a sua versatilidade e superioridade desta em relação as outras duas técnicas citadas anteriormente.

Em síntese, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio da metodologia estatística de modelo linear misto, a influência do uso de café (extrato aquoso), da espécie *Coffea arabica*, no controle de pesos de animais (ratos) submetidos a seis diferentes dietas alimentares.

## 2 Material e métodos

Os dados utilizados neste trabalho foram provenientes de experimento conduzido no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais por Barbosa (2007). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo os tratamentos constituídos por diferentes tipos de dietas alimentares, sendo três sem extrato de café e três com extrato de café, cuja descrição foi adaptada de Barbosa (2007), como:

- i) (N) grupo normonutrido controle recebeu ração de biotério para ratos (Labina.) enriquecida com ração para cães (Bonzo);
- ii) (NC) grupo normonutrido café foi alimentado com dieta do grupo normonutrido controle acrescida de extrato aquoso de café;
- iii) (D60) grupo desnutrido controle foi alimentado com dieta correspondente a 60% da ração consumida pelo grupo normonutrido controle;
- iv) (D60C) grupo desnutrido café recebeu dieta do grupo desnutrido controle, acrescida de extrato aquoso de café;
- v) (D60R) grupo desnutrido com condição alimentar reconstituída controle foi alimentado com dieta correspondente a 60% da ração consumida pelo grupo normonutrido controle e, após 60 dias, foi alimentado *ad libitum* e
- vi) (D60RC) grupo desnutrido com condição alimentar reconstituída café recebeu dieta do grupo desnutrido acrescida de extrato aquoso de café e, após 60 dias, alimentado *ad libitum*.

Ratos da raça Wistar, da colônia do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG, foram acasalados e, por volta do 18º dia de prenhez, as fêmeas foram transferidas para gaiolas individuais e divididas aleatoriamente em seis grupos. Todas as dietas experimentais foram oferecidas a partir do nascimento dos filhotes. O número de filhotes por fêmea foi fixado em oito, tendo, posteriormente, somente os machos sido mantidos. Os animais tinham livre acesso à água e eram mantidos em sistema claro/escuro (12/12 horas). Após o desmame realizado aos 21 dias de vida, os filhotes foram separados, mantendo-se a mesma dieta oferecida para a respectiva fêmea matriz, sendo avaliados semanalmente, durante 15 semanas, o que ocorreu da quarta até a décima oitava semana. Os animais foram pesados em balança de precisão, sendo expressos em gramas.

Quanto à análise estatística dos dados, inicialmente procedeu-se a plotagem dos valores reais dos pesos dos animais em função do tempo, procurando caracterizar o comportamento de crescimento dos ratos para as seis dietas alimentares.

Ao ajustar as curvas polinomiais de crescimento, por meio da metodologia de modelo linear misto, os coeficientes de regressão das curvas individuais, ou seja, em cada unidade experimental, foram considerados de efeitos aleatórios e os coeficientes de regressão das curvas médias, efeitos fixos. Com essas características, o modelo linear misto recebe o nome especial de modelo de coeficientes aleatórios, que é simplesmente um caso especial de modelo linear misto, conforme relata Hauser et al. (2009).

Considerando que a tendência de crescimento dos animais foi a relação quadrática, entre o peso dos animais e o tempo, para todas as seis dietas alimentares, o peso dos animais, em gramas, foi estudado pelo modelo descrito da seguinte forma:

$$y_{ij} = (\beta_0 + \beta_1 D1_i + \beta_2 D2_i + \beta_3 D3_i + \beta_4 D4_i + \beta_5 D5_i + \beta_6 D6_i + b_{0i}) + (\beta_7 + \beta_8 D1_i + \beta_9 D2_i + \beta_{10} D3_i + \beta_{11} D4_i + \beta_{12} D5_i + \beta_{13} D6_i + b_{1i}) t_{ij} + (\beta_{14} D1_i + \beta_{15} D2_i + \beta_{16} D3_i + \beta_{17} D4_i + \beta_{18} D5_i + \beta_{19} D6_i + b_{2i}) t_{ij}^2 + e_{ij}. \quad (9)$$

Em que:

$y_{ij}$  é o peso do animal na unidade experimental  $i$ , observado no tempo de avaliação  $j$  com  $i = 1, 2, \dots, 60$  unidades experimentais (6 dietas, repetidas 10 vezes) e  $j = 1, 2, \dots, 15$  observações da unidade experimental  $i$ ;

$D1_i, D2_i, D3_i, D4_i, D5_i$  e  $D6_i$  são, respectivamente, as dietas D60C, D60, D60R, D60RC, N e NC utilizadas na unidade experimental  $i$ ;

$b_{0i}, b_{1i}$  e  $b_{2i}$  são os efeitos aleatórios associados as curvas quadráticas em cada unidade experimental  $i$ . Observa-se que  $b_{0i}$  mede o quanto o intercepto da curva quadrática da  $i$ -ésima unidade experimental se afasta do intercepto da curva quadrática média,  $b_{1i}$  mede este afastamento, em termos do coeficiente linear, da curva quadrática média e analogamente  $b_{2i}$  mede este afastamento em termos do coeficiente quadrático;

$t_{ij}$  é o tempo desde o início da avaliação dos pesos para a unidade experimental  $i$ , na avaliação  $j$  e

$e_{ij}$  é o erro aleatório.

Considerou-se que o vetor de erros aleatórios  $e_i$  associado à unidade experimental  $i$  possui distribuição normal multivariada com vetor de média 0 e matriz de covariância  $R$ , sendo a matriz  $R$  positiva definida de dimensão  $15 \times 15$ , ou  $e_{ij} \sim N(0, R)$ . O vetor de efeitos aleatórios  $b_i = (b_{0i}, b_{1i} \text{ e } b_{2i})$  distribuído como  $N(0, G)$ , sendo a matriz  $G$  positiva definida de dimensão  $3 \times 3$ . Conforme já comentado em tópicos anteriores, assume-se que  $b_i$  e  $e_{ij}$  são independentes.

Observa-se que o interesse está no ajuste da curva quadrática média para cada uma das 6 dietas. Ou seja, após análise exploratória a priori para cada uma das 6 dietas alimentares vê-se que o interesse está no valor esperado de  $y_{ij}$  do modelo (9), entretanto este deve ser obtido para cada uma das seis dietas. Com o intuito de obter o valor esperado para cada dieta, será definido a seguinte variável indicadora

$$Dl_i = \begin{cases} 1 & \text{se } y_{ij} \text{ pertence a dieta } l, \\ 0, & \text{caso contrário.} \end{cases} \quad \text{com } l = 1, 2, 3, 4, 5, 6.$$

Então, os valores esperados para a curva quadrática média para cada dieta alimentar foram:

$$\text{Dieta D60C: } E[y_{ij}] = (\beta_0 + \beta_1 D1_i) + (\beta_7 + \beta_8 D1_i) t_{ij} + (\beta_{14} D1_i) t_{ij}^2;$$

$$\text{Dieta D60: } E[y_{ij}] = (\beta_0 + \beta_2 D2_i) + (\beta_7 + \beta_9 D2_i) t_{ij} + (\beta_{15} D2_i) t_{ij}^2;$$

$$\text{Dieta D60R: } E[y_{ij}] = (\beta_0 + \beta_3 D3_i) + (\beta_7 + \beta_{10} D3_i) t_{ij} + (\beta_{16} D3_i) t_{ij}^2;$$

**Dieta D60RC:**  $E[y_{ij}] = (\beta_0 + \beta_4 D4_i) + (\beta_7 + \beta_{11} D4_i) t_{ij} + (\beta_{17} D4_i) t_{ij}^2;$

**Dieta N:**  $E[y_{ij}] = (\beta_0 + \beta_5 D5_i) + (\beta_7 + \beta_{12} D5_i) t_{ij} + (\beta_{18} D5_i) t_{ij}^2, e$

**Dieta NC:**  $E[y_{ij}] = (\beta_0 + \beta_6 D6_i) + (\beta_7 + \beta_{13} D6_i) t_{ij} + (\beta_{19} D6_i) t_{ij}^2.$

Em que:

$\beta_0$  é o intercepto da curva quadrática média das unidades experimentais;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5$  e  $\beta_6$  são, respectivamente, as variações entre o intercepto da curva quadrática média das unidades experimentais para cada uma das dietas D60C, D60, D60R, D60RC, N e NC;

$\beta_7$  é o coeficiente linear da curva quadrática média das unidades experimentais;

$\beta_8, \beta_9, \beta_{10}, \beta_{11}, \beta_{12}$  e  $\beta_{13}$  são, respectivamente, as variações entre o coeficiente linear da curva quadrática média das unidades experimentais para cada uma das dietas D60C, D60, D60R, D60RC, N e NC e

$\beta_{14}, \beta_{15}, \beta_{16}, \beta_{17}, \beta_{18}$  e  $\beta_{19}$  são, respectivamente, os coeficientes quadráticos das curvas para as dietas D60C, D60, D60R, D60RC, N e NC.

Para analisar o modelo (9), foi utilizado o procedimento Proc MIXED do software SAS (Statistical Analysis Software). É um procedimento bastante flexível para analisar modelos mistos, em que são levados em conta efeitos fixos e aleatórios, permitindo considerar interceptos, coeficientes lineares e coeficientes quadráticos como efeitos aleatórios e desta forma medindo a variabilidade existente dentro e entre unidades experimentais (HAUSER et al. (2009). Outra vantagem deste procedimento conforme Littell et al. (2006) é poder permitir desbalanceamento dos dados, bem como unidades experimentais incompletas, ou seja, com presença de parcelas perdidas.

Neste trabalho, foram consideradas as estruturas de variâncias-covariâncias componente de variância (VC), simetria composta (CS), não estruturada (UN), autorregressiva (AR), simetria composta heterogênea (CSH) e de Huynh e Feldt (HF), todas já implementadas no Proc MIXED. Maiores detalhes destas estruturas podem ser obtidos em Littell et al. (2006). O método de estimação dos parâmetros de covariância foi método de máxima verossimilhança restrita (REML) e para a solução numérica das equações geradas pelo método foi usado o algoritmo iterativo de Newton-Raphson, também implementado no proc MIXED. Para identificar qual foi a melhor matriz, utilizou-se o critério de informação de Akaike (AIC), conforme Littell et al. (2006), de forma que quanto menor o seu valor, melhor foi o ajuste do modelo em questão.

Após a seleção das melhores estruturas de covariâncias, foi realizado o diagnóstico da normalidade dos erros condicionais do modelo (9). Ao verificar a normalidade, deve-se ter em mente o confundimento presente no erro  $e$ , pois, usar o erro puro, erro que depende apenas das componentes fixas do modelo e sobre o erro que é devido a parte aleatória, pode não ser uma adequada alternativa devido a este confundimento causado justamente pela componente aleatória (COSTA et al., 2012). Em síntese, usar um resíduo confundido, ou seja, que depende de mais de uma fonte de erro, não é um procedimento



confiável para verificação da suposição de normalidade. Desta forma, Hilden-Minton (1995) propôs utilizar o resíduo com o confundimento mínimo. A verificação do pressuposto de normalidade dos erros condicionais menos confundidos pode ser efetuada por intermédio do gráfico de probabilidade normal com envelope ( NOBRE e SINGER, 2007). Detalhes sobre definição, modo de obter os resíduos com confundimento mínimo, assim como construir o gráfico, podem ser encontradas nas referências citadas anteriormente.

Para testar a significância dos efeitos de dieta, semanas e interação, foi utilizado a estatística  $F$ . Já a estatística  $t$  foi utilizada para comparar contrastes formados pelas dietas alimentares e que foram classificadas de interesse prático no intuito de verificar a influência da utilização do extrato aquoso de café nas dietas alimentares, ou seja, D60 versus D60C, D60R versus D60RC e N versus NC. Essa mesma estatística também foi utilizada para testar a significância dos parâmetros do modelo (9).

### 3 Resultados e discussão

Analisando os perfis de crescimento dos pesos dos animais, Figura 1, percebe-se que não há nenhum valor observado que se distingue dos demais de forma anormal, pois houve um comportamento similar em todos os valores observados com a evolução do tempo. Conclui-se, por conseguinte, ausência de valores observados atípicos. Outra observação relevante é a tendência de crescimento quadrático dos pesos dos animais, em função do tempo de avaliação.

Considerado o modelo maximal, com todos os parâmetros, em todos os casos, assim como foi considerada, inicialmente, a estrutura VC (componente de variância) para  $R$ , que está associada ao erro do modelo (9), variou-se apenas a escolha da matriz de covariâncias para a variação entre indivíduo, ou seja, a escolha da estrutura de  $G$ . Após a escolha da estrutura de  $G$ , fixou-se a estrutura selecionada, variando-se apenas a estrutura de  $R$ .

Conforme pode ser verificado na Tabela 1, o critério de AIC indicou como mais adequadas à estrutura UN (não estruturada) para  $G$  (associada aos parâmetros de efeitos aleatórios) e VC (componente da variância) para  $R$  (associada ao erro aleatório do modelo), por apresentarem os menores valores. Também, observa-se que não houve convergência do método iterativo utilizado para as estimativas dos parâmetros de covariância quando fixou-se a estrutura UN para  $G$  e usou-se UN e HF para  $R$ , algo ocorrido pela distinta estrutura de correlação exigida por estas estruturas e a real estrutura existente no conjunto de dados.

Após ter selecionado as estruturas de covariâncias, procede-se à estimação dos parâmetros das curvas polinomiais de crescimento do peso médio do animal ao longo das 15 semanas de avaliação.

A opção de poder selecionar as melhores estruturas de covariâncias nem sempre é levada em consideração ao ajustar curvas de crescimento, Hauser et al. (2009), por exemplo, ao ajustar curvas para descrever a progressão da doença de Machado-Joseph, pressupôs a estrutura de covariâncias UN, sem estrutura definida, para os parâmetros de efeitos aleatórios. Fato que pode influenciar os resultados quando ela não for indicada como a mais adequada.

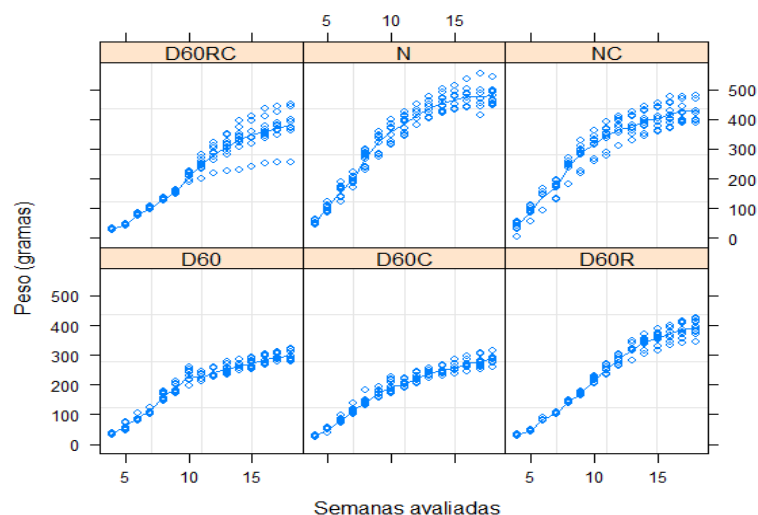


Figura 1 - Representação gráfica do perfil individual do peso dos animais, em gramas, em função das 15 semanas avaliadas (4ª à 18ª semana de vida), para as diferentes dietas alimentares.

Tabela 1 - Estimativas do critério de seleção das estruturas da matriz de covariâncias para  $G$ , variação entre indivíduos e  $R$ , variação intra indivíduo (entre as semanas), considerando o modelo maximal e o método de estimação da máxima verossimilhança restrita (REML).

Estruturas		Critério
$R$	$G$	AIC
VC	VC	7400,3
VC	CS	7550,9
VC	UN	<b>7343,7</b>
VC	AR	7550,9
VC	ARMA	7550,9
VC	TEOEP	7525,3
VC	CSH	7359,6
VC	HF	7362,0
CS	UN	7460,9
AR	UN	7550,9
VC	UN	7525,3
UN	UN	Não convergiu
HF	UN	Não convergiu

Utilizando-se a estrutura de covariâncias UN, sem estrutura definida, e VC, que se caracteriza por variâncias iguais e termos independentes, procede-se ao diagnóstico da normalidade dos resíduos gerados (Figura 2).

Quanto a normalidade do erro, Figura 2, não se percebe nenhum afastamento da suposição de normalidade por parte do resíduo com confundimento mínimo, indicando a plausibilidade da suposição de normalidade por parte do erro. Ainda na Figura 2, observa-se que não há quebra no ponto zero, pois os pontos oscilam ao redor da linha central da cauda inferior até a calda superior, estando sempre nos limites estabelecidos pelas bandas de confiança. Por conseguinte, mantém-se a indicação de não afastamento da suposição de normalidade.

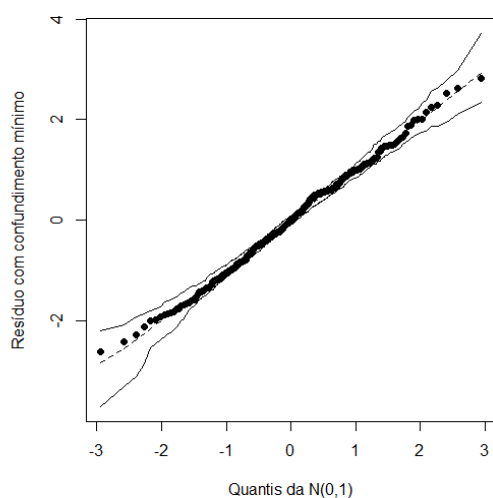


Figura 2 - Gráfico de probabilidade normal com envelope para o resíduo com confundimento mínimo com grau de confiança de 95%.

Após ter confirmado a normalidade dos resíduos, aplica-se o teste nos efeitos fixos do modelo, conforme mostrado na Tabela 2, em que todas as fontes de variação são significativas e, conseqüentemente, devem permanecer no modelo.

Tabela 2 - Número de graus de liberdade do numerador (G.L.Num.), do denominador (G.L.Den.), valor calculado do teste *F* e respectivo valor-p das fontes de variação dos efeitos fixos para o ajuste do modelo selecionado dos pesos dos animais.

Fontes de variação	G.L. Num.	G.L. Den.	F	Valor - p
Dietas	5	54	60,61	<0,0001
Semanas	1	54	4241,92	<0,0001
Dietas ×Semanas	5	54	74,60	<0,0001
Dietas ×Semanas <sup>2</sup>	6	54	327,13	<0,0001

As comparações entre alguns contrastes de interesse prático (Tabela 3) sugerem que a inclusão do extrato aquoso de café foi significativa apenas na comparação dos tratamentos NC *vs* N. Apesar do fato de não ter sido diagnosticada diferença significativa entre os efeitos médios dos pesos dos animais presentes nas comparações das dietas D60C *vs* D60 e D60RC *vs* D60R, as dietas D60C e D60RC, que receberam a inclusão do extrato aquoso de café, tiveram menor valor médio, observando a grandeza numérica dos pesos em ambas as comparações.

Tabela 3 - Estimativas, erro padrão, número de graus de liberdade, valor calculado do teste *t* e respectivo valor- *p* para os contrastes entre dietas com e sem café e médias ajustadas dos tratamentos das dietas.

Contraste	Estimativas	Erro padrão	Graus de liberdade	Valor <i>t</i>	Valor - <i>p</i>
D60C <i>vs</i> D60	-14,44	10,38	54	- 1,39	0,1698
D60RC <i>vs</i> D60R	8,96	10,38	54	0,86	0,3900
NC <i>vs</i> N	40,67	10,38	54	3,92	0,0005

Médias: D60C = 185,99; D60=200,43; D60RC 225,34; D60R =234,30; NC = 296,46 e N = 337,13.

Como na comparação das dietas N *vs* NC foi diagnosticada diferença significativa entre os valores médios das respectivas dietas e como a dieta que recebeu inclusão do extrato aquoso de café na dieta alimentar dos animais apresentou menor valor referente aos pesos médios dos animais é razoável afirmar que, neste caso, a inclusão do café influenciou a diminuição dos pesos médios dos animais.

Na Tabela 4 apresenta-se o teste referente aos parâmetros das curvas médias de crescimento dos pesos dos grupos de animais ao longo das 15 semanas. Observa-se que  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$  e  $\beta_6$  que são, respectivamente, as variações entre o intercepto da curva quadrática média das unidades experimentais e o intercepto para cada uma das dietas D60C, D60, D60R, D60RC, N e NC foram todas significativas, assim como os demais parâmetros, indicando curvas médias distintas entre as dietas alimentares.

Na Figura 3, encontram-se a representação gráfica e as estimativas das equações polinomiais de segundo grau para as seis dietas. Observa-se que a dieta N tem o maior peso médio dos grupos de animais; e a dieta D60C, o menor peso médio, a partir da 7ª semana, aproximadamente. Também é perceptível que se comparar as dietas NC, D60RC e D60C, que receberam a inclusão do extrato aquoso de café na dieta alimentar, dois a dois, na ordem respectiva, com as dietas de animais N, D60R e D60, vê-se que as dietas que receberam o café tenderam a diminuir o ganho médio de peso ao longo das 15 semanas e esse comportamento tendeu a aumentar ao longo do tempo. O ganho de peso médio foi mais evidente na dieta N sobre a dieta NC e não significativo na dieta D60 sobre D60C, assim como na dieta D60R sobre D60RC.

Tabela 4 - Estimativas e teste para os parâmetros do modelo das curvas polinomiais ajustadas pelo modelo linear misto para pesos dos animais, em gramas, aferidos no período de 15 semanas, a partir da 4ª semana de vida, para as 6 dietas alimentares.

Efeitos	Parâmetros	Estimativas	Erro padrão	Graus de liberdade	Valor t	Valor - p
Intercepto	$\beta_0$	-225,8700	6,7797	54	-33,32	<0,0001
D60C	$\beta_1$	97,7263	9,5879	54	10,19	<0,0001
D60	$\beta_2$	82,7454	9,5879	54	8,63	<0,0001
D60R	$\beta_3$	57,8478	9,5879	54	6,03	<0,0001
D60RC	$\beta_4$	63,8091	9,5879	54	6,66	<0,0001
N	$\beta_5$	-39,7914	9,5879	54	-4,15	<0,0001
NC	$\beta_6$	0				
Semanas	$\beta_7$	74,7188	2,1627	54	34,55	<0,0001
Sem × D60C	$\beta_8$	-32,4753	3,0585	54	-10,62	<0,0001
Sem × D60	$\beta_9$	-26,6379	3,0585	54	-8,71	<0,0001
Sem × D60R	$\beta_{10}$	-27,3381	3,0585	54	-8,94	<0,0001
Sem × D60RC	$\beta_{11}$	-29,2699	3,0585	54	-9,57	<0,0001
Sem × N	$\beta_{12}$	12,4285	3,0585	54	4,06	<0,0002
Sem × NC	$\beta_{13}$	0				
Sem <sup>2</sup> × D60C	$\beta_{14}$	-1,0779	0,0885	54	-12,17	<0,0001
Sem <sup>2</sup> × D60	$\beta_{15}$	-1,3269	0,0885	54	-14,99	<0,0001
Sem <sup>2</sup> × D60R	$\beta_{16}$	-0,8511	0,0885	54	-9,61	<0,0001
Sem <sup>2</sup> × D60RC	$\beta_{17}$	-0,8057	0,0885	54	-9,10	<0,0001
Sem <sup>2</sup> × N	$\beta_{18}$	-2,5477	0,0885	54	-28,77	<0,0001
Sem <sup>2</sup> × NC	$\beta_{19}$	-2,1449	0,0885	54	-24,22	<0,0001

As curvas polinomiais ajustadas para cada dieta alimentar foram as seguintes:

$$\begin{aligned} \text{N, } \hat{y} &= -265,6614 + 87,1473 t - 2,5477 t^2; \\ \text{NC, } \hat{y} &= -225,8700 + 74,7188 t - 2,1449 t^2; \\ \text{D60R, } \hat{y} &= -168,0222 + 47,3807 t - 0,8511 t^2; \\ \text{D60RC, } \hat{y} &= -162,0609 + 45,4549 t - 0,8057 t^2; \\ \text{D60, } \hat{y} &= -143,1246 + 48,0809 t - 1,3269 t^2 \text{ e} \\ \text{D60C, } \hat{y} &= -128,1437 + 42,2435 t - 1,0779 t^2. \end{aligned}$$

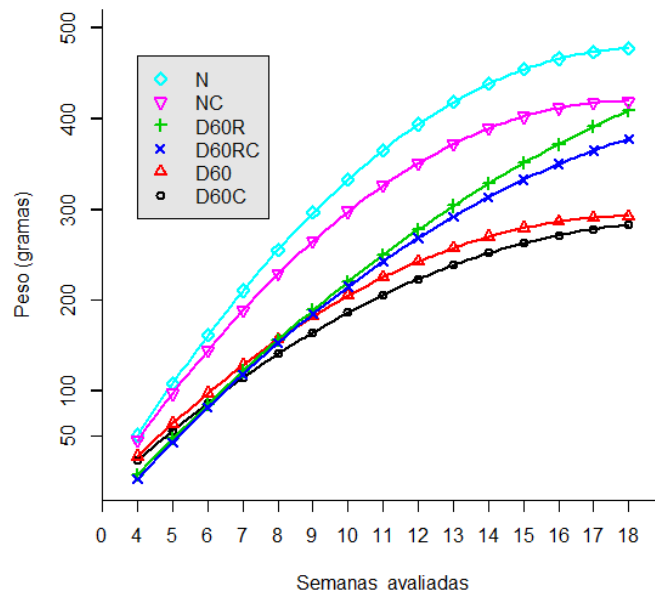


Figura 3 - Descrição gráfica do crescimento de ratos por meio de curvas polinomiais ajustadas ao peso médio por animal (em gramas), durante o período de 15 semanas (4ª à 18ª semana de vida), para cada dieta alimentar.

## Conclusões

O uso do modelo linear misto para estudar dados provenientes de medidas repetidas no tempo mostrou-se versátil ao ser possível explorar e captar, de forma eficiente, informações presentes nos dados, por meio de seleção das estruturas mais adequadas para as matrizes de variâncias e covariâncias do modelo proposto.

Os resultados evidenciaram que os resíduos do modelo ajustado apresentaram distribuição normal, indicando que houve bom ajuste do modelo considerado.

A inclusão do extrato aquoso do café da espécie *Coffea arabica* nas dietas alimentares tendeu a diminuir o peso médio dos animais (ratos) somente na dieta (N) que recebeu ração de biotério enriquecida com ração para cães. As curvas polinomiais ajustadas para as dietas mostraram que a diferença entre o ganho médio de peso dos animais, quando comparados entre as dietas com e sem a presença do extrato aquoso de café, tendeu a aumentar no decorrer das semanas avaliadas.

FERREIRA, W.L; MORAIS, A.R. Analysis of the influence of coffee on weight gains animals (in rats) through linear mixed model. *Rev. Bras. Biom.*, São Paulo, v.31, n.4, p.485-500, 2013.

- **ABSTRACT:** The purpose of the present work was evaluating by means of the statistical methodology of linear mixed model, the influence of the use of coffee, of the species *Coffea arabica*, upon the control of animals' weight (rats) submitted to the different diets either with or

without aqueous coffee extract. Data of rats' weight obtained from an experiment carried out in the Pharmacy Department of the Minas Gerais Federal University (Universidade Federal de Minas Gerais), to evaluate six diets, utilizing the completely randomized design with com 10 replicates, their being evaluated weekly for a 15 weeks period, from the 4th to the 18th week after birth. After the preliminary graphical analysis, the adjustment of polynomial growth was conducted through the SAS software by using distinct covariance structures for the description of the correlation profile among measures in a same experimental unit (rat). Significant effect of the treatments (diets, weeks and interaction between diets weeks) on the animals' weight was found. The structure of unstructured covariances (UN) and the variance component structure (VC) were the most adequate by the Aikake information criterion. Only in the diet (N) which received dog feed-enriched laboratory animal house food, the use of coffee presented tendency to decrease the animals' mean weight (rats) along the weeks evaluated.

- **KEYWORDS:** Longitudinal dat;.random coefficient model. Coffea Arabica.

## Referências

BARBOSA, W. M. *Efeito da ingestão de café sobre a liberação de glutamato sinaptossomal, estimulada por toxina escorpiônica, em ratos*. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

CECON, P. R. et al. Análise de medidas repetidas na avaliação de clones de café 'Conilon'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.43, n.9, p.1171-1176, set. 2008.

COSTA, T. R. et al. Modelos lineares mistos: uma aplicação na curva de lactação de vacas da raça Sindi. *Revista Brasileira de Biometria.*, São Paulo, v.30, n.1, p.23-49, 2012.

FREITAS, E. G. et al. Modelo univariado aplicado a dados longitudinais. *Revista Brasileira de Biometria*, São Paulo, v.26, n.2, p.93-106, 2008.

GILL, J. L.; HAFS, H. D. Analysis of repeated measurements of animals. *Journal of Animal Science*, v.33, p.331-336, 1971.

HAIR, J. J. F. et al. *Análise multivariada de dados*. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688 p.

HAUSER, L. et al. Curva de crescimento usando modelo misto: uma aplicação na progressão da doença de Machado-Joseph. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Porto Alegre, v.29, n.1, p.5-17, 2009.

HENDERSON, C. R. Estimation of changes in herd environment. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.32, p.706-711, 1949.

HENDERSON, C. R.. Selection index and expected genetic advance. In: HANSON, W. D.; ROBINSON, A. F. (Ed.). *Statistical genetics and plant breeding*. Washington: NAS-NRC, p.141-163, 1963.

HENDERSON, C. R.; KEMPTHORNE, O.; SEARLE, S. R. The estimation of environmental and genetic trends from records subject to culling. *Biometrics*, Bethesda, v.15, p.192-193, 1959.

- HILDEN-MINTON, J. A. *Multilevel diagnostics for mixed and hierarchical linear models*. Thesis (Ph.D.) - University of California, Los Angeles, 1995.
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. *Applied multivariate statistical analysis*. New York: Prentice Hall, 2007. 773p.
- LAIRD, N. M.; WARE, J. H. Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics*, Washington, v.38, p.963-974, 1982.
- LITTELL, R. C. et al. *SAS mixed models*. 2<sup>nd</sup> ed. Cary: SAS Institute, 2006. 814 p.
- MACHADO, L. M. M.; DÓREA, J. G.; COSTA, T. H. M. *Aspectos econômicos, nutricionais e funcionais do café*. Disponível em: <[http://www.nutricaoempauta.com.br/lista\\_artigo.php?cod=497](http://www.nutricaoempauta.com.br/lista_artigo.php?cod=497)>. Acesso: 10 nov. 2011.
- NOBRE, J. S.; SINGER, J. M. Residual Analysis for Linear Mixed Models. *Biometrical Journal*, v.49, n.6, p.863-875, 2007.
- PERRI, S. H. V.; IEMMA, A. F. Procedimento "MIXED" do SAS® para análise de modelos mistos. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.56, n.4, p.959-967, 1999.
- PINHEIRO, J. C.; BATES, D. M. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. New York: Springer-Verlag, 2000. 528p.
- RYAN, L.; HATFIELD, C.; HOFSTTER, M. Caffeine reduces time-of-day effects on memory performance in older adults. *American Psychological Association, Washington*, v.13, n.1, p.68-71, 2002.
- SEARLE, S. R.; CASELLA, G.; MCCULLOCH, C. E. *Variance components*. New York: J. Wiley, 1992. 501p.
- SMITH, A. et al. Caffeine and central Noradrenaline: effects on mood, cognitive performance, eye movements and cardiovascular function. *Journal of Psychopharmacology*, Lausanne, v.17, n.3, p.283-292, 2003.
- XAVIER, L. H.; DIAS, C. T. S. Acurácia do modelo univariado para análise de medidas repetidas por simulação multidimensional. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.58, n.2, p.241-250, 2001.

Recebido em 14.10.2013

Aprovado após revisão em 27.01.2014