APLICAÇÕES DOS EXPERIMENTOS FATORIAIS NAS PESQUISAS DE LABORATÓRIO

A. CONAGIN

Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo

Um dos princípios fundamentais do método científico estabelece que o experimentador deve investigar a ação de um fator de cada vez; êste é submetido à variação enquanto todos os outros que podem atuar sôbre o fenômeno são mantidos constantes. É de todos conhecida a lei física que estabelece que "para a mesma temperatura, o volume dos gazes é inversamente proporcional à pressão".

Se usarmos o método clássico no caso da avaliação da ação de certos antibióticos no combate a um novo tipo de infecção, iremos aquilatar a ação dos mesmos para umas tantas combinações prefixadas de dosagens. Saberemos, no fim da pesquisa, qual o melhor antibiótico para as condições experimentadas. Não teremos nenhuma informação sôbre qual seria a ação do mesmo, se a quantidade do princípio ativo fôsse aumentada ou a mesma quantidade total fosse aplicada em períodos diferentes.

Os fenômenos biológicos são sujeitos à ação de vários fatôres; sua manifestação pode ser diferente se as condições variarem. Os conhecimentos provindos de experimentação em que varia sòmente um fator, são de estreita base indutiva.

A experimentação fatorial implica na variação simultânea dos diferentes fatôres, cada um dêles, em vários níveis. Com um esquema fatorial poderemos, no caso que estamos considerando, estudar não só um certo número p de antibióticos, mas ainda q quantidades totais de princípio ativo em cada um, em t intervalos diferentes de aplicação. Precisaremos, nesse caso, de $p \times q \times t$ tratamentos; são experimentadas tôdas as combinações possíveis entre fatôres e níveis. Agindo dessa forma, poderemos, no fim do experimento, chegar à conclusão de que um dado antibiótico *A* foi superior a todos os outros em todos os níveis experimentados, ou que a eficiência de dois dos antibióticos, por exemplo, foi diferente para os diferentes níveis utilizados (presença de interações).

Vamos supor que queremos avaliar a influência de duas vitaminas ou proteínas diferentes no ganho em pêso de ratos. Sejam êsses fatôres *a* e *b* respectivamente; para simplificar, vamos estudar só dois níveis de cada um dêsses elementos: um teor que chamariamos *0* (ausência) e outro, supostamente satisfatório para o crescimento, que chamariamos *1*. Estaríamos na presença de um plano fatorial 2 x 2 ou 2^2 com os quatro tratamentos seguintes, abaixo representados, em três notações.

ausência dos dois fatôres *a* e *b*	—— a0b0	—— 00	—— (1)
ausência de *a* e presença de *b*	—— a0b1	—— 01	—— b
presença de *a* e ausência de *b*	—— a1b0	—— 10	—— a
presença de *a* e presença de *b*	—— a1b1	—— 11	—— ab

Estas quatro combinações poderiam ser dispostas num delineamento em blocos ao acaso com 8 repetições (8 x 4 = 32 unidades experimentais) ou ainda usando dois quadrados latinos 4 x 4 (4 x 4 x 2 = 32 unidades). Vemos, portanto, que o esquema fatorial nada tem a ver com o delineamento adotado.

A análise da variância do delineamento em blocos ao acaso seria:

Fonte de Variação	G. L.	Q. M.	Valor de F
Total	31		
Tratamentos	3	T	F = T/E
Blocos	7	B	
Êrro experimental	21	E	

As diferenças entre os vários tratamentos seriam postas em prova por um teste apropriado para a comparação de médias (testes de Tukey, Scheffé ou Duncan) se F = *Q. M. tratamentos / Q. M. êrro* fosse significativo para os graus de liberdade 3 e 21.

Entretanto, como o experimento é fatorial, poderemos tirar ainda outras informações através do cálculo dos efeitos principais e interações.

Fator a \ Fator b	0	1
0	(1)	b
1	a	ab

A comparação b — (1) nos dará uma idéia da ação do fator *b* (em ausência de *a*). Por outro lado, ab — a avaliará a resposta ao fator *b* em presença de *a*.

A média dessas duas comparações é designada por efeito principal do fator *b* e é assim definida :

$$B = \frac{1}{2} [b - 1 + ab - a] = \frac{1}{2} (b - 1) (a + 1)$$

De forma semelhante

$$A = \frac{1}{2} [a - 1 + ab - b] = \frac{1}{2} (a - 1) (b + 1)$$

Quando a reação ao fator b é a mesma na presença ou na ausência do outro fator, dizemos que não há interação. Caso contrário haverá interação. Esta é definida como

$$BA = \frac{1}{2} [(ab - a) - (b - 1)] = \frac{1}{2} (b - 1) (a - 1)$$

A interação de *a* com *b* seria

$$AB = \frac{1}{2}\,[(ab - b) - (a - 1)] = \frac{1}{2}\,(a - 1)\;(b - 1)$$

Mas é fácil verificar que as duas definições são idênticas, já que

$$\frac{1}{2}\,(b - 1)\;(a - 1) = \frac{1}{2}\,(a - 1)\;(b - 1),\ \text{isto é,}$$

$$AB = BA$$

Se em vez de médias, lidarmos com totais as somas de quadrados de *r* repetições para os efeitos principais e interações passam a ser definidas do seguinte modo:

$$\text{S. Quadrados A} = \left[\ \Sigma\ (ab + a - b - 1)\right]^2 / \ (1^2 + 1^2 + 1^2 + 1^2)\ r$$

$$\text{S. Quadrados B} = \left[\ \Sigma\ (ab + b - a - 1)\right]^2 / \ (1^2 + 1^2 + 1^2 + 1^2)\ r$$

$$\text{S. Quadrados AB} = \left[\ \Sigma\ (ab - b \quad a + 1)\right]^2 / \ (1^2 + 1^2 + 1^2 + 1^2)\ r$$

No fatorial 2^2 cada efeito principal e interação tem um grau de liberdade. Dessa forma

$$(\text{S. Quadrados A})\ /\ 1 = \text{Quadrados médios A}.$$

Êste é posto em prova pelo teste de F = Q. M. A / Q. M. Êrro Experimental. Os outros efeitos principais e interações são postos em prova de forma semelhante.

EXEMPLO I

BLISS & CALHOURN (1954) nos relatam a análise de um ensaio bioquímico, o qual constou da determinação da potência em vitamina A de certos alimentos que tinham uma mesma quantidade total de elementos nutritivos, mas que diferiam nos seguintes atributos: a) 20% de óleo de soja em contraste com 20% de farinha de peixe; b) 15% de trigo integral versus 15% de feno de alfafa.

$y_i = 10$ (unidades — 10) de vitamina A segundo análise da Tab. n.º

Mistura	1	2	4	7	8	9	11	15	16	18	19	21	23	24	Tt
ab	70	24	52	55	71	73	50	68	41	41	46	58	60	56	765
a	68	39	32	62	42	66	24	44	62	20	28	55	63	23	628
b	70	44	41	48	29	64	46	39	63	74	74	44	85	48	769
(1)	65	46	37	58	32	70	59	42	68	29	34	54	39	48	681
Total	273	153	162	223	174	273	179	193	234	164	182	211	247	175	2843

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Fonte de Variação	G. L	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F
E. Repetições	13	5 401,23	415,48	
E. Tratamentos	3	1 004,91	334,97	1,83
A	1	58,02	58,02	
B	1	904,02	904,02	4,95 *
AB	1	42,88	42,88	
Êrro	39	7 119,84	182,56	—
Total	55	13 525,98		

$$C.\ V. = \frac{\sqrt{182{,}56}}{50{,}8} \cdot 100 = 26{,}6\%$$

Decomposição

$$A = \frac{(ab + a - b - (1))^2}{4 \times 14} = \frac{(-57)^2}{56} = 58{,}02$$

$$B = \frac{(ab + b - a - (1))^2}{4 \times 14} = \frac{(225)^2}{56} = 904{,}02$$

$$AB = \frac{(ab + (1) - b - a)^2}{4 \times 14} = \frac{(49)^2}{56} = 42{,}88$$

As conclusões suplementares fornecidas pelo uso do esquema fatorial nesse experimento são as seguintes: o efeito principal B foi positivo e significativo a 5%. O fator *b* aumentou, portanto, a potência em vitamina A na ausência e na presença do fator *a*. No caso específico considerado, o trigo integral é o fator responsável pelo aumento; a combinação dêste com óleo de soja ou farinha de peixe em nada afetou sua eficiência.

VANTAGENS DA EXPERIMENTAÇÃO FATORIAL

As seguintes vantagens podem ser apontadas: a) a eficiência da mesma é aumentada, cada observação fornecendo informações sôbre a ação de dois ou mais fatôres; b) as inferências com relação a cada um dos fatôres tem uma base indutiva mais ampla neste sistema que no clássico; c) o experimento é mais compreensivo, pois mede não sòmente os efeitos principais, como as interações entre os fatôres; d) fatôres que irão provàvelmente, apresentar pequena importância, podem ser introduzidos no experimento e sua ação aquilatada; caso revelem ação ponderável (efeitos principais significativos), sua intensidade fica estimada. Ainda mais, êsses itens irão funcionar como repetições para os fatôres mais importantes aumentando dessa forma a precisão das estimativas (caso haja ausência de interações).

FUSÃO DE INTERAÇÕES VISANDO A REDUÇÃO NO TAMANHO DO BLOCO

Suponhamos que queremos esclarecer algum ponto obscuro da nutrição animal: estamos interessados no estudo da influência de três aminoácidos distintos sôbre o crescimento de ratos. Êsses três ácidos serão os fatôres a estudar, os quais, designaremos por a, b e c; suponhamos, ainda, que vamos experimentar duas doses de cada um dêles — ausência e presença: teremos as doses a0 e a1, b0 e b1 e c0 e c1. O estudo das mesmas, segundo um esquema fatorial, nos daria as combinações:

$a_0b_0c_0$	ou	(1)
$a_1b_0c_0$		a
$a_0b_1c_0$		b
$a_1b_1c_0$		ab
$a_0b_0c_1$		c
$a_1b_0c_1$		ac
$a_0b_1c_1$		bc
$a_1b_1c_1$		abc

Os fatôres principais e interações passam a ser definidos da forma seguinte:

$$A = (a-1)\ (b+1)\ (c+1) = abc+ab+ac+a-bc-b-c-(1)$$
$$B = (a+1)\ (b-1)\ (c+1) = abc+ab+bc+b-ac-a-c-(1)$$
$$AB = (a-1)\ (b-1)\ (c-1) = abc+ab+c+(1)-bc-ac-a-b$$
$$ABC = (a-1)\ (b-1)\ (c-1) = abc+a+b+c-bc-ab-ac-(1)$$

etc.

A análise da variância de um experimento como êsse em blocos ao acaso com 4 repetições seria:

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F
Total	31		
Tratamentos	7	T	F = T/E
Efeito A	1	A	
Efeito B	1	B	
Interação AB	1	AB	
Efeito C	1	C	
Interação AC	1	AC	
Interação BC	1	BC	
Interação ABC	1	ABC	
Repetições	3	R	
Êrro experim.	21	E	

Caso só um animal venha a ser a nossa unidade experimental, precisaremos de oito animais para cada repetição completa. Sabemos que o crescimento é desigual para machos e fêmeas e que irmãos da mesma ninhada e sexo apresentarão maior uniformidade de comportamento. Se quizermos que as unidades dentro do bloco sejam as mais homogêneas possível, precisaremos de oito ratinhos do mesmo sexo e ninhada. E' pràticamente impossível obter ninhadas dêsse tipo.

Em certas condições podemos reduzir o tamanho do bloco de oito para quatro. Para isso, usaremos a técnica da *fusão de interações de ordem elevada* (YATES, 1937). Sabemos que as interações de três ou mais fatôres são de pouca importância, em geral. Vamos admitir ser pouco provável que a interação ABC venha a ser significativa no experimento. Fazendo ABC = 0 e lembrando a definição dessa interação poderemos dividir ABC em dois grupos de quatro, colocando em cada grupo, aquêles tratamentos que têm o mesmo sinal (positivo ou negativo).

A repetição completa que abrangia oito tratamentos fica assim, partida em dois blocos de quatro: ABC ficará completamente fundida com blocos; entretanto, as comparações entre os tratamentos individuais ou os efeitos principais e interações de dois fatôres, não ficam prejudicados por essa fusão.

Isso é fácil de verificar pela tabela abaixo em que a primeira repetição é considerada.

	bloco 1				bloco 2			
ABC	+abc	+a	+b	+c	—ab	—ac	—bc	—(1)
A	+	+	—	—	+	+	—	—
B	+	—	+	—	+	—	+	—
AB	+	—	—	+	+	—	—	+
C	+	—	—	+	—	+	+	—
AC	+	—	+	—	—	+	—	+
BC	+	+	—	—	—	—	+	+

O efeito principal A, está isento dos efeitos do bloco 1; dois dos tratamentos dêsse bloco são adicionados e dois deduzidos : isso também acontece com o outro bloco dessa repetição. Os outros efeitos e interações de dois fatôres nessa e nas outras repetições, apresentam situação idêntica.

Os tratamentos poderão, dessa forma, ser atribuídos por sorteio, aos ratinhos, os quais são prèviamente agrupados de quatro em quatro segundo sexo e ninhada. A análise dessa experiência com oito blocos constituindo quatro repetições completas, seria :

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F
Total	31		
Tratamentos	6	T	F = T/E
Efeito A	1		
Efeito B	1		
Interação AB	1		
Efeito C	1		
Interação AC	1		
Interação BC	1		
Blocos	7		
ABC	1		
Blocos	6		
Êrro experim.	18		

Nem tôda a informação com relação à interação ABC está perdida. Se as ninhadas tivessem sido distribuídas ao acaso e os dois sexôs estivessem equilibrados com os dois tipos de blocos de ABC, esta últíma poderia ser testada em relação aos seis graus de liberdade para blocos.

Os efeitos principais A, B, C e interações de dois fatôres, seriam postos em prova em relação ao êrro experimental (êste teria no caso presente, dezoito graus de liberdade).

Normalmente os fatôres a estudar são vários, o que leva à existência de repetições completas com um número muito grande de tratamentos. Por exemplo, cinco fatôres com dois níveis cada, totalizam 32 tratamentos. E' possível, usando a fusão de algumas interações de ordem mais alta, reduzir o tamanho do bloco de 32 para 8.

Caso o experimento seja fatorial 2^5 com duas repetições ou 64 unidades experimentais poderemos agrupar os tratamentos em oito blocos de oito. As interações de ordem elevada, fundidas com blocos, podem ser escolhidas com antecedência, por exemplo, ABCDE, ABC e DE para as duas repetições. Nesse caso vamos sacrificar tôda a informação sôbre DE, a qual pode apresentar certa importância. Para evitar isso, poderemos em uma das repetições usar êsse tipo de fusão e na outra usar outra diferente, por exemplo, ABCDE, ADE e BC. Teremos o que chamamos de *fusão parcial de interações*. Nesse caso, DE e BC poderão ser estimadas na repetição em que não estão fundidas com blocos (a partir de 32 unidades que estão livres de fusão). Todos os outros efeitos e interações serão estimados normalmente, exceto ABCDE, que foi totalmente sacrificada.

Existe um outro processo chamado *fatorial fracionado* (fractional replication) (COCHRAN & COX, 1950), que usa parte de uma repetição para estimar os efeitos principais e interações de dois fatôres. E' apropriado para esquemas fatoriais que abrangem um número muito grande de fatôres.

Por exemplo, com 6 fatôres teríamos $2^6 = 64$ unidades experimentais por repetição completa dos tratamentos. Admitindo que a interação ABCDEF $=0$, podemos dividir essa interação em 2 grupos de tratamentos de acôrdo com o sinal $(+)$ e $(-)$. Tomaremos então, só os 32 tratamentos que apresentam o sinal $(+)$, por exemplo. A partir dêsses, poderemos estimar os efeitos principais e interações de dois elementos. Nesse caso, não temos uma repetição completa, e sim só 1/2 repetição. E' possível verificar que o efeito principal A está fundido com a interação BCDEF. Do mesmo modo, B estará fundido com ACDEF, AB com CDEF, etc. Admitindo que as interações de ordem elevada são nulas é possível atribuir o valor obtido sòmente a A (BCDEF = 0), etc.

Usando as interações de terceira ordem como estimativas do êrro (pois estas só muito raramente apresentam alguma importância), teremos a seguinte análise da variância :

	G. L.
Efeitos principais	6
Interações de 2 fatôres	15
Êrro experimental	10
Total	31

Êsse esquema que usa só uma parte da repetição de um fatorial, está tomando grande incremento nas pesquisas modernas dos mais variados setôres (medicina, biologia, química, tecnologia, etc).

EXEMPLO II

Efeito da intensidade luminosa e do período de subtração à luz (0, 1 e 3 dias) sôbre o quociente respiratório de *Chlorella* (Dados adaptados do livro de C. I. BLISS & W. CALHOURN — "An Outline of Biometry").

	40 W (a1)			600 W (a2)		
	0 (b1)	1 (b2)	3 (b3)	0 (b1)	1 (b2)	3 (b3)
Quociente respiratório 100 x C02 / 02	76	82	89	86	90	95
	68	81	88	87	93	97
	67	87	96	90	87	93
	71	86	91	88	85	92
	60	85	92	83	92	99
	64	89	94	85	90	91
	406	510	550	519	537	567

		a1 40	a2 600	
b1	0 — —	406	519	925
b2	1 — —	510	537	1047
b3	3 — —	550	567	1117
		1466	1623	3089

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	5	2 722,47	545,49	44,56 **
Dias	2	1 573,56	786,78	64,28 **
Int. lum.	1	684,70	684,70	55,94 **
Dias x Int. lum.	2	464,21	232,10	18,96 **
Dentro	30	367,17	12,24	
Total	35	3 089,64		

$$C.\ V. = \frac{\sqrt{12,24}}{85,8} \cdot 100 = 4\%$$

Os dois graus de liberdade para dias podem ser decompostos em dois componentes ortogonais

(b3 — b1) (a1 + a2) e (b3 + b1 — 2b2) (a1 + a2), como segue :

CÁLCULO DO EFEITO LINEAR

$$\frac{(3-0)^2}{2 \times 12} = \frac{(1117-925)^2}{24} = \frac{192^2}{24} = 1\ 536,0 \qquad F = \frac{1\ 536,0}{12,24} = 125,49^{**}$$

CÁLCULO DO EFEITO QUADRÁTICO

$$\frac{[3+0-2(1)]^2}{(2+4)\ 12} = \frac{[925+1117-2(1047)]^2}{72} = \frac{(-52)^2}{72} = 37,55$$

$$F = \frac{37,55}{12,24} = 3,07$$

CALCULO DAS INTERAÇÕES

Da mesma forma, os dois graus de liberdade das interações dias x int. luminosa podem ser decompostos nos dois componentes (b3 — b1) (a2 — a1) e (b3 + b1 — 2b2) (a2 — a1).

a) *Linear*

$$\frac{[(3-0)(600-40)]^2}{4 \times 6} = \frac{(a_2b_3+a_1b_1-a_1b_3-a_2b_1)^2}{4 \times 6} = \frac{(567+406-550-519)^2}{24} =$$

$$= \frac{(-96{,}0)^2}{24} = 384{,}0 \qquad F = \frac{384{,}0}{12{,}24} = 31{,}37^{**}$$

b) *Quadrático*

$$\frac{[(3+0-2(1))(600-40)]^2}{12 \times 6} = \frac{(a_2b_3+a_2b_1-2a_2b_2-a_1b_3-a_1b_1+2a_1b_2)^2}{72} =$$

$$= \frac{[567+519-2(537)-550-406+2(510)]^2}{72} = \frac{(+76)^2}{72} = 80{,}22$$

$$F = \frac{80{,}22}{12{,}24} = 6{,}55^{*}$$

Como as interações foram significativas devemos estudar os efeitos principais de B para cada nível de *a*. Um estudo gráfico ajudará a esclarecer bem o que sucede no exemplo que estamos discutindo. Os dois acréscimos b3 — b1 são diferentes para os níveis a2 e a1 do fator a : houve resposta mais intensa para o nível a1.

A interação (b3 + b1 — 2b2) (a2 — a1) é significativa também, o que indica que as parábolas do segundo grau apresentam falta de paralelismo e mesmo curvaturas em diferentes sentidos, para os níveis a2 e a1, a curvatura sendo mais acentuada para o nível a1 que para a2. Essa é a razão porque o efeito quadrático (b3 + b1 — 2b2) (a2 + a1) não foi significativo.

CONCLUSÕES

O quociente respiratório da *Chlorella* foi influênciado pelos diferentes períodos de subtração à luz e pelas diferenças de intensidade luminosa. As respostas para os períodos de subtração à ação da luz foram diferentes para as duas intensidades luminosas consideradas.

SUMMARY

In this paper some applications of factorial experiments for biological researches performed in laboratory are presented and advantages of this procedure are pointed out. The use of confounding and fractional replication in order to decrease the size of blocks and the size of the experiment is emphasized.

LITERATURA

BLISS, C. I. & D. W. CALHOURN, 1954 — An outline of Biometry. Yale Co-operative Corporation, New Haven, Connecticut.

COCHRAN, W. G. & G. M. COX, 1950 — Experimental designs. John Wiley & Sons, Inc., New York.

YATES, F., 1937 — The design and analysis of factorial experiments. Imperial Bureau of Soil Science. Technical Communication n. 35.