INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO DIETILTOLUAMIDA (DEET)
EM MEXILHÕES *Perna perna* (Linnaeus, 1758) IRRADIADOS E
NÃO IRRADIADOS COM RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co**

GI SELA DE ASSIS MARTINI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Aplicações**

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Rogero

Versão Corrigida

Versão Original se encontra no IPEN

SÃO PAULO

2013

*Dedico este trabalho aos meus
pais, amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela confiança em mim depositada, pelo apoio de todas as maneiras possíveis, e por todo o amor! Vocês são minha referência de vida, obrigada por tudo!!!

Às minhas irmãs, que acreditaram no meu potencial e sempre estiveram ao lado, amo vocês! Aos meus queridos avós e padrinhos, que sempre estiveram me apoiando e acompanhando toda a minha trajetória!

Ao meu orientador Dr. José Roberto Rogero, pela oportunidade de realizar esse projeto, pela confiança, paciência, por toda a contribuição, aprendizado e amizade! À Msc. Sizue Ota Rogero minha “co-orientadora” muito obrigada pelo apoio, amizade, por todas as contribuições e ajuda nos momentos difíceis no decorrer desse projeto!

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e ao Centro de Química e Meio Ambiente pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

À Marina Victoretti, por toda a ajuda na parte experimental, pelo apoio e bom convívio, muito obrigada!

À Edgar França por toda a ajuda nas coletas, grande apoio em todo o projeto, pelo carinho e amizade!

À Renan Azevedo, por toda a ajuda, amizade, paciência, carinho e parceria!

À Fabio Pusceddu, por todas as contribuições e amizade!

À Thiago Gomes, pela ajuda, amizade e companhia!

À Rodrigo Viana, por todas as contribuições, carinho, atenção e companhia!

À Giovanna Gimiliani e Vanessa Lameira, por toda a ajuda, contribuições e amizade.

Agradeço às minhas queridas amigas: Camila, Bia, Laís, Rafa, Carol, Isa e Bárbara, por todo carinho, amizade, parceria e por sempre apoiarem meus sonhos e estarem presentes na minha vida!

Aos funcionários do Centro de Tecnologia das Radiações – CTR: Beth, Carlos e Hélio, pela realização das irradiações no GammaCell, por todo o interesse e ajuda.

À todos os funcionários do CQMA que contribuíram para o desenvolvimento desse projeto, um especial agradecimento à Lurdinha, que me auxiliou em muitas limpezas após as quedas de energia!

Aos funcionários do transporte do IPEN, sem os quais as minhas coletas não seriam possíveis! E o meu obrigada especial ao Eduardo, Fábio e Marcelo, por toda a colaboração!

Aos amigos “pós-graduandos”: Flávia Junqueira, Juliana Cristina, Bruna Rafaela, Tharcilla Collachite, Gustavo Gobatto obrigada pela amizade e apoio!

À Lucilena Rebelo Monteiro, por toda a ajuda e pelas trocas de ideias!

À Bruna Roque e Fernanda Oliveira, por toda a ajuda e pelas boas conversas!

À CNEN pelo apoio financeiro.

Somos um grande barco navegando ao redor de um sol incandescente no universo. Mas cada um de nós é um barco em si mesmo, um barco carregado de genes navegando pela vida. Se conseguirmos levar esta carga ao porto mais próximo, nossa vida não terá sido em vão. (Jostein Gaarder)

Avaliação da citotoxicidade do Dietiltoluamida (DEET) em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) irradiados e não irradiados com radiação gama de ^{60}Co

Gisela de Assis Martini

RESUMO

Estudos recentes têm identificado a presença de diversos poluentes emergentes em ambientes aquáticos. A ocorrência em diferentes matrizes ambientais tem sido continuamente relatada, o que evidencia a necessidade de estudos de toxicidade. O DEET (*N,N*-dietil-*meta*-toluamida) é o princípio ativo mais utilizado em repelentes de insetos e está presente em diversas formulações comercialmente disponíveis. Além dos poluentes químicos, os organismos aquáticos estão sujeitos à exposição da radiação ionizante proveniente de fontes naturais ou em proximidades de instalações de usinas nucleares. O presente estudo avaliou a toxicidade do DEET em organismos irradiados e não irradiados com radiação gama de ^{60}Co , e os efeitos que a radiação causa sob os lisossomos de hemócitos do mexilhão *Perna perna*. Para isso, foram realizados ensaios de toxicidade aguda para identificar a concentração de DEET e a dose de radiação gama passíveis de causar mortalidade, e posteriormente ensaios de citotoxicidade avaliando a estabilidade da membrana lisossômica em organismos expostos ao DEET e radiação ionizante. De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda, a concentração de DEET que causa mortalidade em 50% dos organismos expostos (CL50) é de 114,27 mg L⁻¹, e a dose de radiação que causa mortalidade (DL50) é de 1068 Gy. Nos os ensaios de citotoxicidade obteve-se a concentração de efeito não observado (CENO) para organismos irradiados e não irradiados de 0,0001 mg L⁻¹ e a concentração de efeito observado (CEO) em concentrações acima desta. A CI25_(72h) para organismos não irradiados foi de 0,0003 mg L⁻¹ e a CI50_(72h) foi de 0,0008 mg L⁻¹ para organismos irradiados e não irradiados. Apesar das concentrações de efeito encontradas no presente estudo terem sido mais altas que as ambientais, estão na mesma ordem de grandeza e também deve-se levar em consideração os possíveis efeitos sinérgicos do DEET com outros contaminantes presentes em ambiente aquático.

Palavras-chave: Ecotoxicidade; Dietiltoluamida; Radiação gama; Mexilhão *Perna perna*.

Cytotoxicity evaluation of Diethyltoluamide (DEET) in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) mussels non-irradiated and irradiated with ^{60}Co gamma radiation

Gisela de Assis Martini

ABSTRACT

Recent studies have identified the presence of several emerging pollutants in aquatic environments. The occurrence in different environmental matrices has been continuously reported, highlighting the need for toxicity studies. The DEET (N,N-diethyl-meta-toluamide) is the active ingredient used in most insect repellents, and is present in many commercially available formulations. Apart from chemical pollutants, aquatic organisms are subject to exposure of ionizing radiation from natural sources or in the vicinity of nuclear power plants. The present study evaluated the toxicity of DEET in organisms irradiated and non-irradiated with ^{60}Co gamma radiation, and the effects that radiation causes in lysosomes of hemocytes of *Perna perna* mussel. For this purpose, assays were performed to identify the acute toxicity of DEET concentration and the dose of gamma radiation able to cause mortality. Subsequently, cytotoxicity assays were carried out to assess the stability of the lysosomal membrane in organisms exposed to ionizing radiation and DEET. According to the results obtained in acute toxicity tests, the concentration of DEET that causes mortality of 50% exposed organisms (LC50) is 114,27 mg L⁻¹, and the radiation dose that causes mortality (LD50) is 1068 Gy. In the cytotoxicity assays, the concentration of the non-observed effect (NOEC) for irradiated and non-irradiated organisms 0.0001 mg L⁻¹ and observed effect concentration (LOEC) at concentrations above this. The IC25 (72h) for non-irradiated organisms was 0.0003 mg L⁻¹ and IC50 (72h) was 0.0008 mg L⁻¹ for irradiated and non-irradiated organisms. Despite of the concentrations of effect found in this study were higher than in the environment, both measurements are in the same order of magnitude and should be also take into account the possible synergistic effects of DEET with other contaminants in the aquatic environment.

Key words: Ecotoxicity; Diethyltoluamide; Gamma radiation; *Perna perna* mussel.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Ecotoxicologia	5
3.1.1 Ecotoxicologia aquática.....	6
3.1.2 Ensaio ecotoxicológicos	7
3.1.3 Ensaio de toxicidade com organismos marinhos	8
3.1.4 Organismo teste.....	8
3.2 Biomarcadores	10
3.3 DEET (<i>N,N</i> -dietil- <i>m</i> -toluamida).....	13
3.3.1 Histórico	13
3.3.2 Informações físico-químicas.....	15
3.3.3 Avaliação ambiental do DEET	16
3.4 Radiação ionizante.....	18
3.4.1 Radioecologia	20
3.4.2 Exposição dos organismos aquáticos às fontes de radiação ionizante.....	21
3.5 Legislação Ambiental	22
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Coleta de água.....	24
4.3 Substância teste.....	26

4.4 Irradiação dos organismos	27
4.5 Ensaios ecotoxicológicos	28
4.5.1 Ensaios de toxicidade aguda	28
4.5.1.1 Ensaios de toxicidade aguda com DEET	29
4.5.1.2 Ensaios de toxicidade aguda em organismos irradiados com radiação gama de ^{60}Co	30
4.5.2 Ensaios <i>in vivo</i> de citotoxicidade	31
4.5.2.1 Ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro	32
4.5.2.2 Ensaio de citotoxicidade com DEET	37
4.5.2.3 Ensaios de citotoxicidade do DEET em organismos irradiados	38
4.5.2.4 Ensaios de citotoxicidade em organismos irradiados	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Ensaios de Ecotoxicidade aguda	44
5.1.1 Dietiltoluidina	44
5.1.2 Radiação gama de ^{60}Co	48
5.2 Ensaios de citotoxicidade com <i>Perna perna</i> (Mollusca, Bivalvia)	53
5.2.1 Ensaios preliminares de citotoxicidade do DEET com organismos não irradiados	53
5.2.2 Ensaios definitivos de citotoxicidade do DEET em organismos não irradiados	60
5.2.3 Ensaios preliminares de citotoxicidade do DEET em organismos irradiados	67
5.2.4 Ensaios definitivos de citotoxicidade do DEET em organismos irradiados ..	71
5.2.5 Exposição dos organismos à radiação ionizante	77

5.2.6 Comparação dos resultados dos ensaios de citotoxicidade do DEET com organismos irradiados e não irradiados com radiação gama de ^{60}Co	78
6. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
APÊNDICES	98

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Associação dos efeitos de poluentes em organismos e seus habitats (baseado em Blaise, 1984)	5
FIGURA 2 - Esquematização externa (a) e interna (b) de um mexilhão <i>Perna perna</i> com identificação de algumas características morfológicas (FERREIRA, J. F., 1987).....	9
FIGURA 3 - Tipos de biomarcadores. Adaptado de Schlenk (1999).....	10
FIGURA 4 – Representação de uma célula com ampliação à direita do lisossomo	11
FIGURA 5 – Representação esquemática de um lisossomo, com ampliação da bicamada lipídica (http://educacaoalemdaescola.blogspot.com.br)	11
FIGURA 6 – Ação direta e indireta da radiação ionizante na molécula de ácido nucleico.....	19
FIGURA 7 – Localização da Praia da Cocanha, Caraguatatuba – SP.....	24
FIGURA 8 - Fazenda de Mexilhões na Ilha da Cocanha, Caraguatatuba – SP. Identificação também da Praia da Cocanha e da Sede da MAPEC.....	25
FIGURA 9 - (a) Mexilhões <i>Perna perna</i> recém retirados do cultivo, (b) Mexilhões <i>Perna perna</i> limpos, (c) Mexilhões <i>Perna perna</i> no processo de lavagem no laboratório	26
FIGURA 10 - Representação da cadeia química do <i>Dietiltoluamida</i> DEET	27
FIGURA 11 - (a) Irradiador Gamma-Cell 200, (b) Mexilhões <i>Perna perna</i> em frascos de polipropileno	28
FIGURA 12 – Etapas realizadas no ensaio de tempo de retenção do corante vermelho neutro descrito por Lowe (1995).....	33
FIGURA 13 – Extração da hemolinfa	34
FIGURA 14 – Incubação do conjunto de lâminas em câmara escura e úmida	35

FIGURA 15 – Observação das lâminas em microscópio	35
FIGURA 16 – (a) Células saudáveis, (b) Células estressadas.....	36
FIGURA 17 – Ensaio de Citotoxicidade com DEET	38
FIGURA 18 – Mexilhões <i>Perna perna</i> acondicionados nos frascos de polipropileno para irradiação	39
FIGURA 19 – Fluxograma com as etapas para análise estatística e determinação dos valores de CE ou CL50 e intervalo de confiança a 95%	40
FIGURA 20 – Fluxograma com as etapas para análise estatística e determinação dos valores de CENO, CEO e CI (adaptado USEPA, 2002).....	41
FIGURA 21 – Fluxograma das etapas realizadas no presente estudo.	43
FIGURA 22 – Taxa de mortalidade em função das concentrações de DEET a que os organismos foram expostos.	45
FIGURA 23 – Taxa de mortalidade em função das doses de radiação gama de ⁶⁰ Co a que os organismos foram expostos	49
FIGURA 24 – Representação gráfica do tempo de retenção do corante VN em função das concentrações de DEET para o mexilhão <i>Perna perna</i>	54
FIGURA 25 – Representação gráfica do tempo de retenção do corante VN em função das concentrações de DEET para o mexilhão <i>Perna perna</i>	55
FIGURA 26 – Representação gráfica do tempo de retenção do corante VN em função das concentrações de DEET para o mexilhão <i>Perna perna</i>	57
FIGURA 27 – (a, b) Representação gráfica do tempo de retenção do corante VN em função das concentrações de DEET para o mexilhão <i>Perna perna</i>	58
FIGURA 28 – Toxicidade do DEET em hemócitos do molusco bivalve <i>Perna perna</i> (Ensaio I).....	60
FIGURA 29 – Toxicidade do DEET em hemócitos do molusco bivalve <i>Perna perna</i> (Ensaio II).....	61

FIGURA 30 – Toxicidade do DEET em hemócitos do molusco bivalve <i>Perna perna</i> (Ensaio II).....	62
FIGURA 31 – Toxicidade do DEET em hemócitos de <i>Perna perna</i> irradiados (3Gy)	68
FIGURA 32 – Toxicidade do DEET em hemócitos de <i>Perna perna</i> irradiados	69
FIGURA 33 – Toxicidade do DEET em hemócitos de <i>Perna perna</i> irradiados	70
FIGURA 34 – Toxicidade do DEET em hemócitos de <i>Perna perna</i> irradiados (Ensaio I).....	72
FIGURA 35 – Toxicidade do DEET em hemócitos de <i>Perna perna</i> irradiados (Ensaio II).....	73
FIGURA 36 – Toxicidade do DEET em hemócitos de <i>Perna perna</i> irradiados (Ensaio III).....	74
FIGURA 37 – Tempo de retenção do corante vermelho neutro do molusco bivalve <i>Perna perna</i> irradiados em comparação com o controle.....	77
FIGURA 38 – Tempo de retenção do corante VN em função da concentração de DEET para organismos irradiados e não irradiados (24h).	79
FIGURA 39 – Tempo de retenção do corante VN em função da concentração de DEET para organismos irradiados e não irradiados (48h)	80
FIGURA 40 – Tempo de retenção do corante VN em função da concentração de DEET para organismos irradiados e não irradiados (72h)	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características físico-químicas do DEET	16
TABELA 2 – Parâmetros e condições dos ensaios de toxicidade aguda com o mexilhão <i>Perna perna</i>	30
TABELA 3 – Parâmetros e condições dos ensaios de toxicidade aguda com mexilhão <i>Perna perna</i> irradiados	31
TABELA 4 – Parâmetros e condições dos ensaios de citotoxicidade com mexilhão <i>Perna perna</i>	32
TABELA 5 – Critérios de avaliação de hemócitos	36
TABELA 6 – Percentual de mortalidade obtido nos ensaios de toxicidade aguda de DEET para o mexilhão <i>Perna perna</i>	44
TABELA 7 – Valores da CL50, intervalos de confiança, média, desvio padrão e coeficiente de variação para os ensaios de ecotoxicidade aguda do DEET para mexilhões <i>Perna perna</i>	45
TABELA 8 – Toxicidade aguda do DEET para diversas espécies em diferentes ensaios (Adaptado de RAND e BRAUSCH, 2011).....	46
TABELA 12 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para as leituras do 1º ensaio de citotoxicidade	55
TABELA 13 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para as leituras do 2º ensaio de citotoxicidade	56
TABELA 15 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para as leituras do 4º ensaio de citotoxicidade	58

TABELA 16 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para as leituras do 5º ensaio de citotoxicidade	59
TABELA 15 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)	61
TABELA 16 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)	62
TABELA 17 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)	63
TABELA 18 – Valores calculados para a CI25 _(48h)	63
TABELA 19 – Valores calculados para a CI25 _(72h)	64
TABELA 20 – Valores calculados para a CI50 _(24h)	64
TABELA 21 – Valores calculados para a CI50 _(48h)	64
TABELA 22 – Valores calculados para a CI50 _(72h)	65
TABELA 23 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão* e coeficiente de variação**	68
TABELA 24 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão* e coeficiente de variação**	69
TABELA 25 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvios padrão* e coeficientes de variação**	71
TABELA 26 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão* e coeficiente de variação** em organismos irradiados com 11 Gy	72
TABELA 27 – Valores da média, desvio padrão* e coeficiente de variação** em organismos irradiados com 11 Gy	73
TABELA 28 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão* e coeficiente de variação** em organismos irradiados com 11 Gy	74

TABELA 29 – Valores calculados para a $CI_{50(24h)}$ em organismos irradiados	75
TABELA 30 – Valores calculados para a $CI_{50(48h)}$ em organismos irradiados	75
TABELA 31 – Valores calculados para a $CI_{50(72h)}$ em organismos irradiados	75
TABELA 32 – Valores médios do tempo de retenção do corante, desvio padrão* e coeficiente de variação** de organismos irradiados com 11 Gy e controle.....	78
TABELA 33 – Valores médios do tempo de retenção do corante, desvio padrão* e coeficiente de variação** de organismos irradiados e não irradiados (24h).....	79
TABELA 34 – Valores médios do tempo de retenção do corante, desvio padrão* e coeficiente de variação** de organismos irradiados e não irradiados (48h).....	80
TABELA 35 – Valores médios do tempo de retenção do corante, desvio padrão* e coeficiente de variação** de organismos irradiados e não irradiados (72h).....	81

1. INTRODUÇÃO

Anualmente novas substâncias químicas são sintetizadas e a maioria atinge direta ou indiretamente os ecossistemas aquáticos (SOUSA, 2000). A introdução desses compostos em concentrações acima das naturais e a presença de compostos sintéticos podem causar alterações no meio ambiente, podendo configurar eventos de contaminação. Visando à proteção da biota aquática, torna-se desejável progredir na identificação e quantificação da presença desses contaminantes para uma avaliação de sua biodisponibilidade e efeitos nocivos ao ecossistema aquático.

A identificação e ocorrência desses compostos em diferentes matrizes ambientais têm sido continuamente relatadas, o que evidencia a necessidade de avaliações de risco ambiental. Mesmo que presentes em baixas concentrações, esses compostos podem causar efeitos adversos sobre a biota, agindo de forma isolada ou a partir da interação com outras substâncias.

Dentre os compostos mundialmente utilizados destaca-se o DEET (N,N-diethyl-meta-toluamide – $C_{12}H_{17}NO$) que é o princípio ativo mais utilizado na formulação de repelentes de insetos, e está sendo comercializado há mais de 50 anos (USEPA, 1998). Já foi evidenciada a presença do DEET em diversas matrizes ambientais, mostrando que este composto apresenta característica persistente (SINGH, 2010).

Além disso, no meio ambiente em regiões próximas as instalações nucleares, na maioria das vezes litoral, e em regiões com maior nível de radiação de fundo, muitos organismos aquáticos podem estar sujeitos a níveis elevados de radiação, ficando mais suscetíveis à exposição a outros contaminantes.

Diversos organismos marinhos podem bioacumular radioisótopos em concentrações milhares de vezes superiores aos níveis encontrados no ambiente (FOWLER, 2003). Portanto, é de extrema importância verificar o comportamento destes compostos no ambiente, bem como, avaliar os efeitos da radiação sobre sistemas biológicos.

Após submissão à doses de radiação os organismos podem apresentar efeitos biológicos que desencadeiam mudanças desde o nível molecular até altos níveis de organização biológica, podendo afetar toda uma comunidade, ou até mesmo um nicho ecológico.

Estudos ecotoxicológicos podem ser utilizados para estimar os efeitos de substâncias desde níveis bioquímicos e moleculares até níveis mais elevados de organização, como comunidades e ecossistemas (WALKER, 1996).

Diferentes métodos podem ser utilizados para estimar os efeitos causados pelos contaminantes, tais como testes de toxicidade, determinação de anomalias genéticas, utilização de biomarcadores, entre outros (PEDROSA *et al.*, 2001; ZARONI *et al.*, 2001).

No presente estudo optou-se pela utilização de biomarcadores que, de acordo com Walker (1996), são indicadores bioquímicos, fisiológicos ou histológicos de exposição ou efeito de xenobióticos presentes no ambiente, em nível de organismo ou de “sub-organismo”.

Dentre as diversas técnicas, foi escolhida a integridade da membrana lisossômica, avaliada por meio do ensaio de tempo de retenção do corante vermelho neutro, devido à sua alta sensibilidade à maioria dos grupos de contaminantes e extrapolação dos danos lisossomais em níveis de maior organização biológica, tais como indivíduo e população.

Esta técnica foi considerada confiável e recomendada para avaliação da qualidade da água, de acordo com os resultados de um programa internacional de monitoramento ambiental (UNEP, 1997).

Mexilhões e outros organismos bivalves têm sido amplamente utilizados como organismos sentinelas no monitoramento da qualidade ambiental em regiões costeiras (IMWC, 1995). No presente estudo o organismo utilizado foi o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758).

Nesse contexto, o presente estudo avaliou os efeitos ecotoxicológicos do Dietiltoluamida (DEET) em hemócitos de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) irradiados e não irradiados com radiação gama de fonte de ^{60}Co por meio do

ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro. Com os resultados obtidos, espera-se contribuir para uma melhor avaliação do risco ecológico do composto e para conhecimento dos efeitos da radiação ionizante em invertebrados marinhos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é avaliar a citotoxicidade do Dietiltoluamida (DEET) por meio da avaliação dos possíveis efeitos adversos causados nos lisossomos de hemócitos de mexilhões *Perna perna* irradiados e não irradiados com radiação gama de ^{60}Co empregando-se o ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro.

A fim de se contribuir para a avaliação do risco ecológico desse composto, para conhecimento do possível efeito causado pela radiação ionizante nos mexilhões, bem como o possível efeito sinérgico entre a radiação e o DEET, gerando subsídios para futura regulação de seus descartes no ambiente aquático.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a sensibilidade do organismo teste à radiação e exposição ao DEET;
- ✓ Determinar a CL50 (concentração letal 50%) de DEET e DL50 (dose letal 50%) de radiação gama de ^{60}Co para mexilhões *Perna perna*;
- ✓ Determinar a CENO (concentração de efeito não observada) e CEO (concentração de efeito observada) após exposição dos organismos ao DEET;
- ✓ Avaliar os efeitos da radiação gama de ^{60}Co sobre a integridade da membrana lisossômica em organismos irradiados e expostos ao DEET;
- ✓ Comparar os efeitos citotóxicos do DEET em organismos irradiados e não irradiados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ecotoxicologia

O termo Ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em 1969 na reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU) por René Truhaut (TRUHAUT, 1977).

Desde então, o conceito foi muito discutido, até que em 1976 definiu-se ecotoxicologia como sendo: *a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado* (PLAA, 1982; CAIRNS & NIEDERLEHNER, 1995).

A associação dos efeitos dos poluentes aos organismos e a interação desses em seus habitats foi descrita por Blaise (1984) (FIG. 1), e é mostrado no fluxograma abaixo:

FIGURA 1 – Associação dos efeitos de poluentes em organismos e seus habitats (baseado em Blaise, 1984)

De acordo com Rand (1995) o objetivo da ecotoxicologia é proteger populações e comunidades, porém não é possível a utilização de todas as espécies existentes pois o número de organismos é maior e conseqüentemente, o grau de incerteza na extrapolação dos dados também. Além do que a extrapolação dos dados de toxicidade são mais difíceis devido às variações dos fatores ambientais.

A toxicologia ambiental é uma ciência altamente eclética e multidisciplinar que envolve diversas áreas de estudo como biologia, química (orgânica, analítica e bioquímica), anatomia, genética, fisiologia, microbiologia, ecologia, ciências do solo, água e atmosfera, epidemiologia, estatística, legislação e a ecotoxicologia (HODGSON, E., 2004; YU, M.H., 2005).

3.1.1 Ecotoxicologia aquática

A ecotoxicologia aquática tem como objetivo avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático, e a concentração, transporte, transformação e disposição final dos contaminantes dependem de suas características e das propriedades do ambiente a que foi introduzido (RAND, 1995).

A toxicidade de uma substância química depende das propriedades, concentração e do tempo de exposição à que o organismo está sendo exposto.

Os efeitos tóxicos causados pela exposição à diversos contaminantes pode se manifestar em diferentes níveis de organização biológica, desde estruturas celulares até populações e comunidades (ADAMS, W. J., 2003).

Visando a proteção dos ecossistemas aquáticos, testes de toxicidade aquática são bastante utilizados, pois os mesmos constituem os principais receptáculos de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água, emitidos no ar ou depositados nos solos (GHERARDI-GOLDSTEIN, E., *et al.*, 1990; KENDALL, R. J., *et al.*, 2001).

3.1.2 Ensaios ecotoxicológicos

A utilização de ensaios ecotoxicológicos integra os conceitos da ecologia, na diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico, e da toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre comunidades biológicas (PLAA, 1982).

O emprego dos ensaios ecotoxicológicos apresenta diversas finalidades, das quais, de acordo com Abessa (2002), destacam-se:

- 1) o conhecimento da qualidade de águas, sedimentos, solos e do ar;
- 2) os fins de regulação e a definição de limites máximos permissíveis para o lançamento de efluentes e substâncias químicas;
- 3) as estimativas do efeito de descargas de contaminantes sobre as populações naturais;
- 4) a definição de áreas críticas;
- 5) análises de risco ecológico;
- 6) como integrantes em programas de monitoramento ambiental;
- 7) a detecção dos primeiros sinais de impacto devido a compostos químicos (“early warning”);
- 8) o fornecimento do significado biológico para dados de contaminação;

Atualmente, cada vez mais os ensaios de toxicidade e estudos de monitoramento ambiental têm sido empregados com a finalidade de se avaliar e conhecer os efeitos da introdução direta e/ou indireta de compostos químicos emergentes no meio ambiente.

As informações obtidas fornecem dados para comparação da toxicidade entre substâncias, para comparar a sensibilidade de diferentes organismos expostos às mesmas, informações para registros químicos bem como, comparar os valores obtidos com os padrões já estabelecidos.

A avaliação da toxicidade por meio de ensaios ecotoxicológicos se dá com organismos representativos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha.

3.1.3 Ensaios de toxicidade com organismos marinhos

O uso de testes de toxicidade como ferramenta em análises de impacto ambiental vêm sendo utilizados no Brasil desde a década de 70, mas somente a partir da década de 80 foram realizados os primeiros ensaios com espécies marinhas e estuarinas, e ainda são necessários estudos que definam quais são os organismos mais indicados a serem utilizados, bem como sua sensibilidade aos distintos agentes impactantes (RESGALLA *et al.*, 2002)

De acordo com Domingues & Bertoletti (2006) os organismos utilizados em ensaios de toxicidade podem ser coletados em ambientes naturais, obtidos através de produtores especializados ou cultivados em laboratório.

Recomenda-se que os testes de toxicidade sejam realizados com organismos de três diferentes níveis tróficos, porém por razões práticas e econômicas, muitas vezes os testes de toxicidade são realizados com uma única espécie de organismo teste (RIBO, 1997).

Para ser utilizado como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos, é de extrema importância que os mesmos apresentem características como: seletividade constante e elevada aos contaminantes, disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade de seu nível trófico, ampla distribuição e importância comercial, facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório (RAND, 1995).

3.1.4 Organismo teste

A importância da utilização de invertebrados em estudos de monitoramento ambiental se dá pelo fato de que essas espécies constituem 95% do total de espécies viventes no planeta, e estão presentes em praticamente todos os

ecossistemas e apresentam-se geralmente em grande abundância populacional, o que faz com que a coleta dos organismos para análises e experimentos não afetem significativamente sua dinâmica populacional (FOSSI *et al.*, 1998).

De acordo com International Mussel Watch Committee (1995), mexilhões e outros bivalves vêm sendo empregados como organismos sentinelas apropriados para estudos de monitoramento da qualidade ambiental em áreas costeiras, em função de apresentarem hábitos sedentários, valor comercial e habilidade de bioconcentrar poluentes presentes na água e sedimento (PEREIRA *et al.*, 2007).

Mexilhão é o termo utilizado para denominar as diversas espécies de moluscos bivalves da família *Mytilidae*, sendo os gêneros mais comuns *Mytilus*, *Perna* e *Mytella*. São muito abundantes no litoral brasileiro, vivendo principalmente fixos aos costões rochosos, na região de variação das marés e início do infralitoral (MAGALHÃES & FERREIRA, 1997).

A espécie *Perna perna* (FIG. 2) tem a capacidade de resistir a uma ampla variação de salinidade (SALOMÃO *et al.*, 1980) sendo sua faixa ótima entre 34‰ a 36‰, e é também considerada euritérmica, podendo suportar grande variação de temperatura tendo a faixa ótima entre 21 e 28°C.

FIGURA 2 - Esquematisação externa (a) e interna (b) de um mexilhão *Perna perna* com identificação de algumas características morfológicas (FERREIRA, J. F., 1987)

3.2 Biomarcadores

Para se avaliar os efeitos causados pelos contaminantes em menores níveis de organização biológica os biomarcadores tem sido muito utilizados.

São respostas a perturbações de processos bioquímicos e moleculares que ocorrem no interior das células causados pela ação dos xenobioticos dando origem aos efeitos em maiores níveis de organização (CHEUNG *et al.*, 1997).

Biomarcadores são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciados como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DEPLEDGE, 1993).

Leonzio & Fossi (1993) ampliaram a definição proposta pela National Academy of Sciences, definindo biomarcadores ecotoxicologicos como variações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que possam ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos orgânicos, em organismos ou populações, que possam evidenciar exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos ou radiações. Foram propostas definições para três classes de biomarcadores: exposição, efeito, suscetibilidade (FIG. 3).

FIGURA 3 - Tipos de biomarcadores. Adaptado de Schlenk (1999).

Considerando os danos em nível sub-celular uma técnica de avaliação amplamente empregada é o ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro em hemócitos de bivalves descrito por Lowe (1995).

Essa técnica detecta alterações na permeabilidade da membrana lisossômica, que podem ocorrer em função da exposição a contaminantes ou fatores ambientais, tais como: temperatura, salinidade, hipóxia e depleção alimentar (MOORE *et al.*, 1985; NICHOLSON *et al.*, 2001).

O lisossomo (FIGURA 4, 5) é a organela responsável pelo seqüestro e acumulação de xenobióticos orgânicos e inorgânicos e exerce um papel chave no processo de detoxificação e posterior excreção desses compostos em mexilhões (MOORE, 1985; VIARENGO *et al.*, 1987).

FIGURA 4 – Representação de uma célula com ampliação à direita do lisossomo

FIGURA 5 – Representação esquemática de um lisossomo, com ampliação da bicamada lipídica (<http://educacaoalemdaescola.blogspot.com.br>)

Lisossomos são organelas que desempenham importante função em diversos processos fisiológicos, e possuem importante papel na absorção de substâncias orgânicas e inorgânicas e, devido a capacidade de acumular compostos, essa estrutura tem sido identificada como “organela alvo” dos efeitos causados por diversos contaminantes (Hwang et al, 2002).

Baseia-se no princípio de que lisossomos de células saudáveis conseguem reter o corante por mais tempo, uma vez que membranas lisossômicas são desestabilizadas devido à ação de substâncias citotóxicas.

O corante é seqüestrado pelo lisossomo quando as células vivas são pré-incubadas com vermelho neutro. Na visualização por microscópio pode ser avaliado o extravasamento do corante para o citosol da célula, e uma diminuição do tempo de retenção do corante em relação aos organismos saudáveis ou não expostos, caracteriza dano nas membranas lisossomais (FREIRE *et al.*, 2008).

O tempo de extravasamento do corante para o citosol é relacionado com o grau de dano nas membranas (LOWE & PIPE, 1994).

As reações lisossômicas resultantes de exposição a contaminantes são basicamente: alteração no conteúdo lisossomal, alteração nos processos de fusão do sistema lisossomo-vacuolar e alteração na permeabilidade da membrana lisossômica (MOORE *et al.*, 1987). De acordo com Lowe (1992), as alterações na permeabilidade da membrana lisossômica se devem a perturbações na estrutura da membrana associada a alterações na bomba de próton dependente de ATP (ATPase).

Como resposta ao estresse químico Lowe (1988) sugeriu que os efeitos da desestabilização da membrana lisossômica envolve o aumento de processos autofágicos seguido de degeneração celular. Como consequência dos danos lisossomais a relação entre a ruptura celular e consequente extravasamento de enzimas digestivas está diretamente relacionada à redução da taxa de crescimento em mexilhões (BAYNE *et al.*, 1976). Por esses fatores a integridade da membrana lisossômica tem sido amplamente empregada com biomarcador de estresse químico.

3.3 DEET (*N,N*-dietil-*m*-toluamida)

3.3.1 Histórico

Dietiltoluamida é o princípio ativo mais utilizado em repelente para a prevenção de picadas de insetos, como mosquitos, moscas, pulgas e outros pequenos insetos voadores.

O princípio ativo foi desenvolvido pelo exercito dos Estados Unidos em 1946 com a finalidade de proteger soldados nas áreas infestadas por insetos.

Desde 1957, repelentes de insetos contendo DEET foram amplamente utilizados pelo público em geral nos Estados Unidos. E sugere-se que anualmente cerca de 30% da população utiliza um ou mais produtos repelentes que contenham DEET (USEPA, 1998).

Este composto é considerado até hoje um repelente de padrão ouro devido à sua eficácia contra vários ectoparasitas (BISSINGER & ROE, 2010).

O DEET é disponível em vários tipos de formulações de produtos com ação de repelência, incluindo loções, líquidos e aerossóis. Também comercializa-se sabonete contendo DEET como ingrediente ativo em algumas regiões do mundo (ROWLAND *et al.*, 2004). Atualmente existem cerca de 225 produtos disponíveis no mercado tendo o DEET como princípio ativo (WEEKS *et al.*, 2011)

Alguns estudos e revisões de literatura têm sugerido que o DEET tem melhor eficácia repelente em comparação com outros ingredientes ativos (FRADIN and DAY, 2002).

O mecanismo de ação do DEET não é completamente confirmado. Existem hipóteses que sugerem diferentes tipos de funcionamento. Alguns estudos têm sugerido que o DEET funciona, formando uma barreira de vapor com um odor e sabor que é ofensivo aos insetos (BROWN and HEBERT, 1997).

Dogan (1999) concluiu que os insetos são atraídos para o ácido láctico na pele humana, e o vapor de DEET interfere com sua capacidade de localizar o ácido. Outros estudos têm desafiado esta explicação, encontrando um efeito

repelente de DEET apenas com dióxido de carbono como o atrativo (HOFFMANN and MILLER, 2003).

Um estudo mais recente forneceu evidências comportamentais que sustentam que a eficácia de repelente do DEET é um resultado de detecção direta do composto em fase vapor por mosquitos (SYED & LEAL, 2008).

Um repelente de uso tópico ideal deve ser eficiente contra os artrópodes hematófagos em geral, deve possuir as seguintes características: não ser tóxico e nem irritante para o homem, não ser plastificante, isto é, não deve ficar aderido à pele dando um aspecto oclusivo, e possuir um tempo de proteção o mais prolongado possível (HALL, GREEN & BEROZA, 1957; SHERMAN, 1966).

Os princípios ativos de repelência mais utilizados atualmente são o DEET e a Permetrina. Young & Evans (1998) relataram que estudos realizados com voluntários das Forças Armadas dos Estados Unidos da América demonstraram que as formulações associando DEET e Permetrina, são bastante eficazes.

Os repelentes podem ser associados a substâncias que têm função sinérgica. Estas substâncias geralmente não são tóxicas para os insetos, mas podem contribuir com a atividade inseticida dos piretróides sintéticos ou facilitar a volatilização do repelente, aumentando o seu raio de ação (MIRANDA, M. C., 2005).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC), a concentração indicada é de 50% (ANVISA, 2010).

O DEET tem se mostrado muito eficiente na prevenção à picadas de insetos, porém há registros na ANVISA (2010) de que quando usado incorretamente ou em excesso, os repelentes contendo DEET podem apresentar toxicidade para adultos e crianças, tais como toxicidade cutânea, quadros de hipotensão, crises convulsivas, coma, podendo até mesmo atingir o sistema nervoso.

Estudos com esses compostos, ou contaminantes emergentes como diversos autores denominam, são cada vez mais freqüentes nessas últimas

décadas (BIDWEL *et al.*, 2010; CORDY *et al.*, COSTANZO *et al.*, 2007; 2004; KOLPIN *et al.*, 2004; LAWRENCE, 2009; SINGH *et al.*, 2010; WEIGEL *et al.*, 2004).

Resíduos de DEET têm sido encontrados em águas subterrâneas, águas residuais, continentais e marinhas e até mesmo em águas que já passaram por tratamento convencional, o que mostra sua propriedade persistente (CORDY *et al.*, 2004; COSTANZO *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2010; TAY *et al.*, 2009).

Estes fatos implicam na necessidade de estudos complementares sobre a toxicidade do composto.

3.3.2 Informações físico-químicas

O DEET é uma substância orgânica líquida, volátil sob pressão normal e à temperatura ambiente, sendo praticamente insolúvel em água, embora solúvel em solventes orgânicos.

O composto é membro da família química das N,N-dialquilamidas, sua fórmula empírica é $C_{12}H_{17}NO$. O DEET é um líquido com odor fraco, distinto e é quase incolor, é praticamente insolúvel em água ($> 1,0 \text{ g L}^{-1}$ a 25°C). É muito solúvel em etanol e isopropanol, que são solventes comuns em formulações de repelentes contendo DEET.

Possui algumas características que são consideradas indesejáveis para o seu uso como repelente: polimerizável (efeito plastificante) e está associado a alguns efeitos tóxicos, quando empregado em concentrações superiores às recomendadas e/ou aplicações sucessivas (GRYBOSKI-WEINSTEIN & ORDWAY, 1961; MILLER, 1982). Algumas características físico-químicas do DEET estão apresentadas na TAB. 1.

Tabela 1 – Características físico-químicas do DEET

	Líquido incolor
Aparência	(Merck, 2010)
	300
Coeficiente de partição de adsorção do solo (Koc)	(Handbook of Pesticide Toxicology, 2010)
	2.02
Coeficiente de partição Octanol/Água (log Kow)	(Hansch, C., 1995)
	$2.1 \times 10^{-8} \text{ atm}\cdot\text{m}^3 / \text{mol}$
Constante de Henry	(Handbook of Pesticide Toxicology, 2010)
	0,997-1,000 g/cm ³
Densidade (20°)	(Merck, 2010)
	191,27 g mol ⁻¹
Peso molecular	(Budavari, S., 1996)
	$5.6 \times 10^{-3} \text{ mmHg em } 20^\circ\text{C}$
Pressão de Vapor	(Little, A. D., 1982)

3.3.3 Avaliação ambiental do DEET

Desde o registro do composto em produtos comercialmente disponíveis, o DEET não foi submetido a uma avaliação de risco ecológico, pois acreditava-se que o composto jamais atingiria os corpos hídricos e a biota aquática (USEPA, 1998).

A necessidade de monitoramento ambiental para o composto começou quando DEET foi encontrado em amostras de áreas urbanas e agrícolas, efluentes de estações de tratamento de esgoto, sistemas de águas subterrâneas e até mesmo em água potável, mostrando-se persistente aos processos convencionais de tratamento de água (SINGH *et al.*, 2010; TAY *et al.*, 2009; GLASSMEYER *et al.*, 2005; CORDY *et al.*, 2004; WEIGEL *et al.*, 2004; KOLPIN *et al.*, 2002).

A entrada de DEET no ambiente se dá por diversas vias, tais como: diretamente para o ar durante a aplicação de aerossóis, para a água superficial através de pulverizações e indiretamente a partir de efluentes das estações de tratamento de esgoto, e para o solo, também a partir de pulverizações ou por aplicação de efluente tratado em agricultura; no solo e das águas superficiais, o DEET degrada a uma moderada taxa, e sua meia-vida é medida em dias ou semanas, sendo o DEET um composto facilmente biodegradável (WEEKS *et al.*, 2011). A USEPA (2000) sugere que a meia-vida do DEET em água seja de 5 dias.

A EU GUIDANCE considera que compostos facilmente biodegradáveis tem meia-vida no ambiente aquático em torno de 15 dias (ECHA, 2010).

Weeks e colaboradores (2011) realizaram uma modelagem matemática para o destino do DEET no ambiente e concluíram que o composto é encontrado em água na proporção de 79%, em solo de 20,7% e traços no ar (0,1%) e no sedimento (0,2%); e com base em suas propriedades físico-químicas, o DEET é moderadamente móvel na coluna de solo.

As preocupações ambientais sobre DEET, têm foco em seu potencial de acumulação em águas superficiais e sedimentos e os possíveis perigos para a vida aquática (WEEKS *et al.*, 2011).

O ambiente marinho também recebe aporte de DEET, em menores concentrações que as demais matrizes ambientais citadas. Porém o estudo da ocorrência e distribuição de contaminantes em ecossistemas marinhos é importante principalmente por dois motivos:

- (i) a sua presença no mar indica que são suficientemente persistentes para suportar a transformação em seu caminho até os oceanos;

- (ii) condições físico-químicos e biológicas em sistemas aquáticos marinhos são significativamente diferentes por exemplo, salinidade, pH, temperatura, concentrações de compostos orgânicos e atividade biológica (WEIGEL *et al.*, 2002).

3.4 Radiação ionizante

A radiação ionizante é definida como a energia propagada capaz de deslocar um ou mais elétrons da molécula (FAJARDO *et al.*, 2001). A incidência dessa radiação em organismos vivos promove danos às células por mecanismos específicos, podendo ser por ação direta e indireta com o meio celular (FIG. 6) (DOWD E TILSON, 1999)

A ação direta consiste na incidência da radiação ionizante diretamente nas macromoléculas biológicas. Na ação indireta ocorrem sucessivas interações da radiação com as moléculas presentes no interior da célula, é o tipo de ação que mais ocorre já que as células possuem em média 75% de água na sua composição.

O processo da radiólise da água é onde são gerados espécies reativas primárias e produtos moleculares (produtos primários da radiólise da água).

Altamente reativos, os produtos primários interagem com as moléculas presentes no meio ou sofrem recombinações, desencadeando uma série de reações tóxicas para as células que promovem alterações químicas e biológicas (FAJARDO *et al.*, 2001; GETOFF, 1996).

De acordo com Mettler Junior e Upton (1995) a ação indireta é mais frequente devido à abundância de água presente no meio celular, e a radiação gama (radiação ionizante do tipo eletromagnética) possui elevada energia de penetração, e interage mais frequentemente com os organismos vivos pela ação indireta. A radiólise da água pode ser representado pela equação:

FIGURA 6 – Ação direta e indireta da radiação ionizante na molécula de ácido nucleico.

De acordo com a lei de Bergonie e Tribondeau as células exibem considerável variação na radiosensibilidade (BERGONIE e TRIBONDEAU, 1906; ROSE, 1992). As células são mais radiosensíveis, se forem ativas na mitose e funcionalmente indiferenciadas.

Além disso, os mecanismos celulares de radiação ionizante são complexos, incluindo instabilidade genômica, efeito "bystander" (quando células não irradiadas exibem efeitos de células irradiadas por estarem localizadas próximas umas das outras), respostas adaptativas e processos epigenéticos (BROOKS, 2003; KOTURBASH *et al.*, 2006; MOTHERSILL *et al.*, 2006; HIGLEY, 2007; BIRD, 2007).

3.4.1 Radioecologia

O monitoramento ambiental na área nuclear surgiu para fornecer informações de atividades não declaradas à Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), com o propósito de controlar a utilização de energia nuclear para fins não-pacíficos (DONOHUE, 1998).

E passou a ser considerada uma importante ferramenta a partir da obtenção de dados bastante precisos sobre atividades nucleares em geral, além do que dependendo da dose, da taxa de dose e do tipo, a radiação pode diminuir a tolerância à toxicidade de compostos químicos presentes no ambiente.

A preocupação com a proteção ambiental de substâncias radioativas tem sido muito discutida por organizações internacionais IAEA (International Atomic Energy Agency), ICRP (International Commission on Radiological Protection), OCDE-NEA (Organisation for Economic Co-Operation and Development – Nuclear Energy Agency), órgãos reguladores Environment Canada, USDOE (United States Department of Energy) e cientistas da IUR (International Union of Radioecology) (ANDERSON *et al.*, 2009).

Os impactos das instalações nucleares sobre o ambiente podem incluir: liberação acidental de radionuclídeos nos ecossistemas terrestres e aquáticos a partir da interação dos sistemas de refrigeração do condensador com ecossistemas aquáticos, e, por fontes de liberação de radionuclídeos para o meio ambiente com a operação normal de usinas nucleares e reatores de produção de radioisótopos, acidentes em usinas nucleares e vazamento de resíduos radioativos armazenados.

A radioecologia atualmente apresenta uma linha de estudos que compreende:

- (1) proteção ambiental, na qual estão inseridos estudos sobre fluxos e biodisponibilidade das substâncias radioativas ao longo do tempo; ecotoxicologia; harmonização dos métodos de radionuclídeos e outros contaminantes; legislações; técnicas de medição e estratégias de monitoramento;

- (2) avaliação de risco, abordando efeitos biológicos da radiação em humanos e animais;
- (3) tratamento de rejeitos radioativos e
- (4) aspectos sociais, éticos e econômicos da proteção radiológica (EDITORIAL, 2009).

O estudo da proteção radioecológica está em desenvolvimento, pois alguns aspectos ainda necessitam de mais estudos e definições (PENTREATH, 2009).

3.4.2 Exposição dos organismos aquáticos às fontes de radiação ionizante

No meio ambiente, principalmente em regiões de maior incidência de radioatividade ambiental e próximos as instalações nucleares, sendo na maioria das vezes regiões litorâneas, onde existe risco de vazamentos e acidentes nucleares, muitos organismos aquáticos podem estar sujeitos a níveis mais elevados de radiação.

Diversos organismos marinhos podem bioacumular radioisótopos em concentrações milhares de vezes superiores aos níveis encontrados no ambiente (FOWLER, 2003).

Portanto, é de extrema importância verificar o comportamento destes compostos no ambiente, bem como, avaliar os efeitos da radiação sobre sistemas biológicos.

Em especial, deve-se olhar os organismos de hábitos sedentários ao redor de instalações nucleares em regiões litorâneas, pois estão continuamente expostos, em contato direto com a radiação durante todo o seu período de vida.

A partir de doses absorvidas durante certo tempo, organismos podem apresentar efeitos biológicos que desencadeiam mudanças desde o nível molecular até altos níveis de organização biológica, podendo afetar toda uma comunidade, ou até mesmo um nicho ecológico.

A proteção do meio ambiente deve ser claramente demonstrada, independente da presença ou ausência de seres humanos (PENTREATH, 2002).

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes na biota foram revistos por numerosos pesquisadores e organizações (e.g., WHICKER e SCHULTZ, 1982; IAEA, 1992; ROSE, 1992; WOODHEAD, 1993; EISLER, 1994, 2000; WHICKER, 1997; HINTON, 1998; MEYERS-SCHONE e TALMAGE, 2003; IRVINE e SAMPLE, 2005; HIGLEY, 2007; GERASKIN *et al.*, 2007).

A radiosensibilidade celular tem se mostrado variar filogeneticamente, apresentando maior sensibilidade em mamíferos e aves, e, baixa sensibilidade em invertebrados (WHICKER e SCHULTZ, 1982; UNSCEAR, 1996).

3.5 Legislação Ambiental

Ensaio ecotoxicológicos têm sido empregados para avaliar os efeitos da introdução de contaminantes no ambiente aquático. Ainda que poucos ensaios ecotoxicológicos sejam padronizados no Brasil, existem legislações no âmbito internacional que regulamentam substâncias químicas em diversas matrizes ambientais de forma bastante rigorosa.

Na Europa, alguns países possuem leis específicas para limites permissíveis de toxicidade estabelecidos para diferentes corpos receptores. De acordo com Zagatto e Bertolotti (2006) o nível de implementação de ensaios ecotoxicológicos no controle da poluição ainda é baixo, mas muitos países da União Européia possuem programas de monitoramento ambiental que utilizam ensaios de toxicidade com microcrustáceos, peixes e algas.

A legislação de substâncias químicas da União Européia foi aprovada pelo Parlamento Europeu e pelo Conselho da Comunidade Européia, originando o regulamento N° 1907/2006, definido como REACH (Register, Evaluation, Authorization, Chemicals) aplicando uma política de registro, avaliação, autorização e restrição aos produtos químicos comercializados na Europa.

Na década de 90 a USEPA desenvolveu os estudos para Avaliação e Redução da Toxicidade (TRE: Toxicity Reduction Evaluation), que tem por

objetivo identificar e avaliar os agentes responsáveis pela toxicidade de efluentes, implementar ações de controle e confirmar a eficácia das medidas adotadas para a redução da toxicidade.

No Brasil, a revisão da Resolução CONAMA Nº 20/1986 realizada em 2005 introduziu os ensaios de toxicidade, e na Resolução Nº 357/2005 exige-se a realização de ensaios ecotoxicológicos na avaliação de corpos hídricos e no controle de efluentes.

Existem ensaios padronizados também pela CETESB a partir da década de 80, mas só foram exigidos por meio da Resolução SMA Nº 03/2000 (PUSCEDDU, 2009). A Resolução da SMA 03/2000 estabelece os critérios para a realização do controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo.

A Legislação Federal - Resolução CONAMA 357/2005 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, a segunda estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras (BRASIL, 2005).

A Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), estabelece no parágrafo 1º do artigo 34 que efluentes líquidos não devem causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos para organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental.

Para os estados, cujos órgãos ambientais estaduais não possuem uma legislação específica para toxicidade, devem seguir as orientações da nova resolução CONAMA 430/2011.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta de água

A água utilizada nos ensaios de toxicidade aguda e de citotoxicidade com o mexilhão *Perna perna* foi coletada na Praia da Cocanha, localizada no município de Caraguatatuba, SP (FIGURA 7); foi acondicionada em barris de 50L transportadas e mantidas em laboratório à temperatura de 24°C. Para realização dos ensaios a água foi filtrada em rede de zooplâncton com malha de 150 µm.

FIGURA 7 – Localização da Praia da Cocanha, Caraguatatuba – SP

Fonte: Imagem LANDSAT, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais.

Escala: 1: 50.000

4.2 Obtenção e manutenção do organismo teste

Domingues e Bertoletti (2006) ressaltam que a escolha dos organismos-teste deve seguir os seguintes princípios básicos: sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos, tendo como requisito o conhecimento prévio da biologia das espécies; pequeno porte e ciclo de vida não muito longo; facilidade na manutenção/cultivo; disponibilidade dos organismos ao longo do ano, possibilitando o cultivo contínuo em laboratório; espécies autóctones ou

representativas do ecossistema em estudo; ampla distribuição geográfica e estabilidade genética, o que implica na obtenção de lotes uniformes de organismos. Seguindo essas considerações o organismo teste utilizado no presente estudo foi o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758).

Os organismos foram obtidos em área de cultivo localizado na Ilha da Cocanha Grande (FIG. 8). A Praia da Cocanha está localizada na região norte do município de Caraguatatuba, em área de ocupação baixa a média e intensa atividade de maricultura desenvolvida principalmente próximo às Ilhas da Cocanha Grande (Massaguaçu) e da Cocanha Pequena (CETESB, 2007).

Essa área foi escolhida como ponto de obtenção dos organismos em função de sua boa qualidade ambiental, registrada nos últimos relatórios de balneabilidade divulgados pela CETESB (2006, 2007, 2008, 2009), quando se constatou boa qualidade da água na maior parte do ano, com classificação “Boa”. Os mesmos relatórios da CETESB não identificaram toxicidade em amostras de água e sedimento coletados nessa praia. Nos relatórios mais recentes da CETESB dos anos de 2010 e 2011 a qualidade da água foi classificada como “Regular”, pois houve um aumento do período em que a praia esteve imprópria.

FIGURA 8 - Fazenda de Mexilhões na Ilha da Cocanha, Caraguatatuba – SP. Identificação também da Praia da Cocanha e da Sede da MAPEC

(Centro de Maricultores e Pescadores da Praia da Cocanha)

Para realização dos experimentos foram utilizados organismos adultos com tamanho médio de 4-5 cm de comprimento, após terem sido coletados do cultivo os organismos foram limpos, acondicionados em caixa térmica e transportados para o laboratório. Na figura 9a e 9b está representado o procedimento realizado nos organismos no local de coleta e na figura 9c o procedimento inicial realizado no laboratório.

FIGURA 9 - (a) Mexilhões *Perna perna* recém retirados do cultivo, (b) Mexilhões *Perna perna* limpos, (c) Mexilhões *Perna perna* no processo de lavagem no laboratório

No laboratório, os organismos foram aclimatados em aquários contendo água do mar filtrada por 24 horas, com aeração e temperatura de 25°C até o momento da realização dos ensaios. A água para a montagem dos experimentos, para utilização no controle e para a aclimação dos organismos foi coletada em Caraguatatuba, no mesmo local de obtenção dos organismos.

4.3 Substância teste

O princípio ativo DEET (*N,N*-diethyl-meta-toluamide – C₁₂H₁₇NO) (FIG. 10) da Sigma-Aldrich® é relativamente estável, tende a absorver água e possui sensibilidade quando exposto à luz. Insolúvel em água a 20°C e em glicerina,

porém solúvel em vários solventes orgânicos. Possui 95% de meta isômero, sendo este o princípio ativo do composto (USEPA, 1998). O composto é formado por amida, classe química muito utilizada em repelentes de inseto (PALUCH *et al.*, 2010).

FIGURA 10 - Representação da cadeia química do ***Dietiltoluamida*** DEET (MERCK, 2010).

4.4 Irradiação dos organismos

Considerando que as instalações nucleares geralmente encontram-se em regiões litorâneas, podendo assim existir o risco de vazamentos e acidentes para o ambiente marinho, o presente trabalho teve como objetivo o estudo dos efeitos de radiação ionizante sobre a biota aquática.

A exposição à radiação ionizante nos mexilhões foi realizada a fim de se verificar os efeitos biológicos causados sobre a membrana lisossômica de hemócitos do organismo teste.

Para irradiação foi utilizada radiação gama da fonte de ^{60}Co Gamma-Cell 200 (FIGURA 11a). Os organismos foram colocados em frascos de polipropileno contendo 750 mL de água marinha (FIGURA 11b), para serem submetidos à doses da radiação gama de ^{60}Co : 0, 250 ; 500; 750 e 1000 Gy (Gray) com uma taxa de dose de aproximadamente 1,64 KGy/hora.

FIGURA 11 - (a) Irradiador Gamma-Cell 200, (b) Mexilhões *Perna perna* em frascos de polipropileno

4.5 Ensaios ecotoxicológicos

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (OLIVI *et al.*, 2008).

4.5.1 Ensaios de toxicidade aguda

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico em um curto período de tempo. O critério de avaliação dos ensaios de ecotoxicidade aguda é a mortalidade ou imobilidade dos organismos-teste (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006). No presente estudo os ensaios de toxicidade aguda foram empregados para se avaliar a mortalidade de 50% (CL50) dos organismos quando expostos a agentes químicos (DEET) ou físicos (radiação ionizante).

4.5.1.1 Ensaios de toxicidade aguda com DEET

Primeiramente foram realizados ensaios de toxicidade aguda com o princípio ativo para encontrar a concentração capaz de causar mortalidade em 50% dos organismos expostos ao DEET. O tempo de exposição definido foi de 72h, pois o ensaio de citotoxicidade, onde avaliou-se o tempo de retenção do corante vermelho neutro consistiu na exposição dos organismos ao composto por um período de 72h. As concentrações testadas foram baseadas na literatura onde algumas espécies expostas ao DEET tiveram concentração letal próxima a 100 mg L⁻¹.

De acordo com Michael and Grant (1974) a concentração letal 50% para *Gambusia affinis* foi 235,0 mg L⁻¹ após 24 e 48 horas de exposição ao DEET. A CL50 encontrada para *Daphnia magna* foi 160,0 mg L⁻¹ após 48 horas e 108,0 mg L⁻¹ após 96 horas de exposição ao DEET (SEO *et al.*, 2005); e para *Gammarus fasciatus* a concentração letal 50% foi de 100 mg L⁻¹ após 96 horas de exposição (MAYER and ELLERSICK, 1986).

Portanto no presente estudo os organismos foram expostos à concentrações de DEET na faixa de 75 – 400 mg L⁻¹. Na TAB. 2 encontram-se os parâmetros e condições estabelecidos para os ensaios de toxicidade aguda com DEET para o mexilhão *Perna perna*.

TABELA 2 – Parâmetros e condições dos ensaios de toxicidade aguda com o mexilhão *Perna perna*

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Sistema de teste	Estático
Duração	72 h
Substância teste	DEET
Temperatura	22 ± 2°C
Organismo teste	<i>Perna perna</i>
Fotoperíodo	12h luz/escuro
Frasco-teste	Aquários
Volume da concentração-teste	30 Litros
Nº de soluções-teste	3 e controle água/solvente
Alimentação durante o teste	Não
Critério de avaliação de efeito	Mortalidade
Expressão dos resultados	Quantitativo: DL50
Critério de aceitação do teste	Mortalidade < 10% no controle

DL50 = dose letal 50% dos organismos expostos

4.5.1.2 Ensaios de toxicidade aguda em organismos irradiados com radiação gama de ^{60}Co

Foram realizados ensaios de exposição dos organismos em diferentes doses de radiação gama proveniente de fonte de ^{60}Co para encontrar a dose capaz de causar mortalidade à 50% dos organismos que foram expostos à radiação. Os organismos receberam doses que variaram de 250 – 3000 Gy e foram observados por 72h. Na TAB. 3 estão os parâmetros e condições estabelecidos para os ensaios de toxicidade aguda com radiação para o mexilhão *Perna perna*.

TABELA 3 – Parâmetros e condições dos ensaios de toxicidade aguda com mexilhão *Perna perna* irradiados

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Sistema de teste	Estático
Doses de radiação	0; 250; 500; 750; 1000; 1500; 2000; 2500 e 3000 Gy
Taxa de dose	1,58 a 1,71 kGy.h ⁻¹
Frasco- teste	Frascos de polipropileno 750mL
Nº de organismos/frasco	5
Tempo de observação após radiação	72h
Alimentação durante o teste	Não
Critério de avaliação de efeito	Mortalidade
Expressão dos resultados	Quantitativo: DL50
Critério de aceitação do teste	Mortalidade < 10% no controle

DL50 = dose letal 50% dos organismos expostos

4.5.2 Ensaios *in vivo* de citotoxicidade

Para os ensaios *in vivo* da citotoxicidade foi utilizado o do tempo de retenção do corante vermelho neutro para se verificar a integridade/estabilidade da membrana lisossômica de hemócitos do mexilhão *Perna perna*.

A TAB. 4 apresenta os parâmetros e condições estabelecidos para os ensaios de citotoxicidade com mexilhão *Perna perna*.

O estudo foi dividido em 3 etapas:

1. exposição dos organismos ao DEET;
2. exposição dos organismos à radiação gama;
3. exposição dos organismos à radiação gama seguida à exposição ao DEET.

TABELA 4 – Parâmetros e condições dos ensaios de citotoxicidade com mexilhão *Perna perna*

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Sistema de teste	Estático
Duração	72h
Substância-teste	DEET
Concentrações de DEET	0,02 mg L ⁻¹ , 0,001 mg L ⁻¹ e 0,0001 mg L ⁻¹
Temperatura	22 ± 2°C
Fotoperíodo	12 h luz/escuro
Frasco-teste	Aquários de 30 Litros
Nº de concentrações-teste	3 e controles água/solvente
Nº de organismos/frasco	15
Troca de soluções	Não
Alimentação	Não
Critério de avaliação de efeito	Integridade da membrana lisossômica
Expressão dos resultados	Quantitativo: CENO; CEO; CI25
	Qualitativo: tóxico ou não tóxico

CENO = concentração de efeito não observado; CEO = concentração de efeito observado;
CI25 = concentração de inibição em 25%

4.5.2.1 Ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro

Para avaliação da citotoxicidade empregou-se o ensaio do tempo e retenção do corante Vermelho Neutro em hemócitos de mexilhão *Perna perna*, de acordo com o procedimento descrito por Lowe *et al.* (1995) (FIG. 12). Esse método detecta alterações na permeabilidade da membrana lisossômica de hemócitos, promovendo evidências de danos celulares em função da exposição a diferentes contaminantes.

FIGURA 12 – Etapas realizadas no ensaio de tempo de retenção do corante vermelho neutro descrito por Lowe (1995).

Para realização do ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro as lâminas foram lavadas e preparadas 24 horas antes do experimento, aplicando-se 10 μ L de uma solução de poly-L-lisina em água destilada, utilizada para melhor fixação das células sobre a lâmina, a solução foi preparada na proporção 1:10 e aplicada sobre cada lâmina com auxílio de uma lamínula foi espalhada para o processo natural de secagem.

Foi preparada uma solução fisiológica para diluir a hemolinfa coletada dos mexilhões (4,77g de HEPES; 25,48 g de cloreto de sódio; 13,06 g de sulfato de magnésio; 0,75 g de cloreto de potássio; 1,47 g de cloreto de cálcio diluído em água deionizada em balão volumétrico de 1 Litro) . O pH 7,36 foi ajustado com NaOH ou HCl impreterivelmente antes de cada uso da solução. Após o preparo, a solução foi estocada em refrigerador, porém utilizada em temperatura ambiente para que o choque térmico não provocasse estresse nos hemócitos.

Preparou-se uma solução estoque de vermelho neutro utilizando-se 28,8mg do corante em 1mL de DMSO (Dimetilsulfóxido). A solução foi conservada em refrigerador ao abrigo de luz, pois este corante é fotossensível. A solução de trabalho foi preparada diluindo-se 10 μ L da solução estoque em 5mL da solução fisiológica e mantida em câmara escura. A cada bateria de lâminas analisada a solução de trabalho foi refeita devido a sua instabilidade.

No processo de extração da hemolinfa as valvas do mexilhão foram levemente separadas e com uma seringa hipodérmica de 1mL e agulha padrão 21 retirou-se o líquido do músculo adutor posterior (FIG. 13). O material coletado foi transferido para tubos de microcentrífuga com capacidade de 2 mL, que foram levemente agitados. Em seguida pipetou-se 40 μ L da solução de hemolinfa sobre cada lâmina tratada previamente com poly-L-lisina.

FIGURA 13 – Extração da hemolinfa

As lâminas foram incubadas em câmara escura e úmida por 15 minutos (FIG. 14). Após este período, 40 μ L de solução de trabalho de vermelho neutro foram adicionados à hemolinfa presente em cada lâmina, e o conjunto novamente incubado por mais 15 minutos. As lâminas foram observadas com auxílio de microscópio óptico (400x) (FIG. 15) em intervalos de 15 minutos, mantendo-se a iluminação mais baixa possível permitindo a visualização dos hemócitos, devido a fotossensibilidade do vermelho neutro.

FIGURA 14 – Incubação do conjunto de lâminas em câmara escura e úmida

Nas células (hemócitos) foi analisado o tempo de retenção do corante e as anormalidades estruturais.

FIGURA 15 – Observação das lâminas em microscópio

O tempo de retenção do corante vermelho neutro é obtido estimando-se a proporção de células que tiveram o corante liberado para o citosol e/ou anormalidades no formato, tamanho e cor dos lisossomos.

A TAB. 5 apresenta os critérios utilizados para diferenciação de células saudáveis e células estressadas, após administração do corante Vermelho Neutro.

TABELA 5 – Critérios de avaliação de hemócitos

Critério	Células saudáveis	Células estressadas
<i>Formato das células</i>	Irregular	Arredondado
<i>Tamanho das células</i>	Aumentado	Diminuído
Número de lisossomos	Aumentado	Diminuído
Tamanho dos lisossomos	Menores	Alargados/ Aumentados
Cor dos lisossomos	Vermelho pálido/ rosado	Vermelho ou rosa escuro
Pseudópodes	Não visíveis	Visíveis
Corante extravasado no citosol	Não visíveis	Visíveis

Hemócitos saudáveis apresentam forma irregular (FIG. 16a) e, uma vez expostos ao vermelho neutro, seus lisossomos podem ser vistos como pequenos pontos rosados aglomerados e o núcleo pode ser visto como uma esfera incolor assim como o citosol. Hemócitos estressados (FIG. 16b) tendem a ser esféricos e menores contendo lisossomos maiores e escuros e o citosol pode aparecer tingido de rosa pela liberação do corante contido nos lisossomos (KING, 2000).

FIGURA 16 – (a) Células saudáveis, (b) Células estressadas

Fonte: KING, 2000

Foi utilizada uma tabela para controle da avaliação dos hemócitos analisados onde: para mais que 50% das células observadas sem sinais de stress, usa-se o sinal + (positivo) para o animal examinado. O sinal – (negativo) delimita o “end-point”, quando 50% ou mais das células exibem anomalias estruturais ou vazamento do corante para o citosol (KING, 2000).

O estado de integridade da membrana lisossômica pode ser refletido pelo tempo necessário para que ocorra o extravasamento do corante Vermelho Neutro para o citosol. O tempo de retenção médio para cada concentração é calculado pelo tempo em minutos de cada animal analisado.

4.5.2.2 Ensaio de citotoxicidade com DEET

Nos ensaios preliminares foram utilizados aquários de 15 Litros com 5 organismos para cada solução teste e controles de água e solvente. Todos os experimentos realizados foram estáticos, sem alimentação, com fotoperíodo de 12h luz e temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os organismos foram retirados para avaliação de hemócitos a cada 24 horas, totalizando 3 leituras para cada experimento. Foram realizados três experimentos, nos quais os organismos foram expostos a diferentes concentrações do composto.

No primeiro experimento, considerado como preliminar, foram testadas as concentrações: $50,0 \text{ mg L}^{-1}$, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. A partir dos resultados do teste preliminar foi realizado um segundo experimento onde foram testadas as concentrações: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,001 \text{ mg L}^{-1}$. Como foi observado efeito nas duas menores concentrações testadas foram realizados outros três ensaios preliminares com as mesmas concentrações ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$). Para realização dos experimentos foi preparada uma solução estoque de DEET (100 mg L^{-1}) em álcool PA.

A partir dos ensaios preliminares foram definidas as concentrações de DEET para os ensaios definitivos: $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$. Foram realizados ensaios estáticos em triplicata, em aquários contendo 30 Litros de água marinha e 15 organismos por aquário (FIGURA 17).

As leituras foram realizadas a cada 24 horas, e o *endpoint* do ensaio foi de 72 horas. Os ensaios de citotoxicidade com DEET tem por objetivo encontrar os valores de CENO e CEO para mexilhões *Perna perna* e para tanto após a realização dos experimentos foi empregado o tratamento estatístico de acordo com o método descrito pela USEPA (2002).

FIGURA 17 – Ensaio de Citotoxicidade com DEET

4.5.2.3 Ensaio de citotoxicidade do DEET em organismos irradiados

Os organismos foram colocados em frascos de polipropileno (FIG. 18) contendo 750mL de água marinha e receberam dose de radiação de 11 Gy. Após a irradiação os organismos foram transportados para o laboratório e colocados em aquários contendo 30 Litros de água marinha.

O controle de água e do solvente (etanol) não foram irradiados mas receberam o mesmo procedimento dos organismos irradiados. Os organismos foram colocados em aquários contendo DEET nas concentrações de: $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$, e foram realizadas leituras em 24, 48 e 72 horas. O *endpoint* para as leituras é o mesmo dos ensaios anteriores.

FIGURA 18 – Mexilhões *Perna perna* acondicionados nos frascos de polipropileno para irradiação

Foram testadas 3 diferentes doses de Radiação gama de fonte de ^{60}Co em combinação com o composto sobre a integridade/estabilidade da membrana lisossômica de mexilhões *Perna perna* no ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro.

As doses recebidas pelos organismos foram: 0, 3, 11 e 107 Gy, determinadas pela $\text{DL50}_{(72\text{h})}$, que correspondem 0%, 0,25%, 1,0% e 10% da DL50 respectivamente. o mesmo procedimento foi aplicado ao controle de água e do solvente. Após a realização dos experimentos foi escolhida a dose de 11 Gy para os ensaios definitivos.

4.5.2.4 Ensaio de citotoxicidade em organismos irradiados

Nessa etapa do trabalho, os organismos receberam a dose de 11 Gy e posteriormente foram colocados em aquários contendo 30 Litros de água marinha, e então foi realizado o ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro, analisando a integridade/estabilidade da membrana lisossômica em organismos irradiados e não expostos ao DEET.

Foi observado se houve ou não diminuição no tempo de retenção do corante em comparação aos organismos não irradiados.

4.6 Tratamento estatístico

Os dados obtidos foram estatisticamente analisados de acordo com o tipo de ensaio:

Toxicidade Aguda

No ensaio de toxicidade aguda, com o percentual de mortalidade dos organismos foi calculada a estimativa das concentrações que apresentaram efeito em 50% dos organismos expostos (FIG. 19), utilizando o método estatístico não paramétrico de Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977).

FIGURA 19 – Fluxograma com as etapas para análise estatística e determinação dos valores de CE ou CL50 e intervalo de confiança a 95%

(adaptado USEPA, 2002)

Citotoxicidade

Os efeitos citotóxicos do DEET e da radiação gama em mexilhões *Perna perna*, assim como devido a exposição ao DEET dos organismos irradiados foi avaliado por análise de variância (ANOVA) e por comparação múltipla nos testes de hipóteses do programa estatístico TOXSTAT 3.4 (WEST & GULLEY, 1994).

De acordo com Buratini e Bertoletti (2006) a maior concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO) são estatisticamente diferentes em relação ao controle. Na FIG. 20 está representado o fluxograma com o procedimento adotado para obter os resultados de efeito citotóxico nos organismos teste (CENO e CEO).

FIGURA 20 – Fluxograma com as etapas para análise estatística e determinação dos valores de CENO, CEO e CI (adaptado USEPA, 2002).

Para a definição da CENO e CEO, os resultados foram analisados quanto à normalidade a partir do Teste de Chi-quadrado (χ^2) e quanto à homocedasticidade utilizando-se o Teste de Bartlett. De acordo com a USEPA (2002) o Teste de Chi-quadrado (χ^2), estabelece o agrupamento dos dados em classes, comparando sua distribuição à distribuição normal.

Aplica-se o Teste de Bartlett para grupos com número de réplicas igual ou diferente e o Teste de Hartley para grupos com número de réplicas igual ou quando não é muito diferente, e é sensível a dados não normalmente distribuídos (BURATINI e BERTOLETTI, 2006).

Após a verificação da normalidade e homocedasticidade nos resultados do ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro foi realizada uma análise de variância (ANOVA) entre os grupos para avaliar se as diferenças foram estatisticamente significativas. As diferenças significativas foram determinadas com nível de significância de $p < 0,05$.

Aplicou-se o Teste “t” de Student para detectar diferenças significativas entre os controles, não havendo diferenças foram realizadas análises entre o controle (água) e as soluções teste.

Foram utilizados outros testes como: o teste paramétrico Dunnett quando os dados foram normais e homogêneos e número de réplicas iguais; o teste de Bonferroni no caso de número de réplicas diferentes. Aplicou-se o Teste de Steel Many One quando não houve distribuição normal dos dados e com número de réplicas iguais.

Os resultados também foram submetidos à análise da Concentração de Inibição de 25% e 50% pelo método de interpolação linear, ou seja, uma estimativa pontual da concentração que causa efeito em 25% e 50% dos organismos expostos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda (CL50) do DEET e a dose letal de radiação gama de ^{60}Co encontrada para mexilhões *Perna perna* serão apresentados inicialmente.

Em seguida serão apresentados os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade (estabilidade da membrana lisossômica) do DEET para organismos irradiados e não irradiados.

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda (CL50 e DL50) foram calculados pelo software Trimmed Spearman-Kärber e dos ensaios de citotoxicidade (CENO, CEO, CI25 e CI50) obtidos por análise dos softwares TOXSTAT 3.4 e ICP. O fluxograma abaixo (FIG. 21) mostra as etapas realizadas para obtenção dos resultados:

FIGURA 21 – Fluxograma das etapas realizadas no presente estudo.

5.1 Ensaios de Ecotoxicidade aguda

5.1.1 Dietiltoluamida

Estes ensaios avaliaram a $CL_{50(72)}$, concentração capaz de causar mortalidade em 50% dos organismos após 72h de exposição ao DEET.

O valor médio da $CL(l)_{50;72h}$ do DEET obtido nos ensaios de ecotoxicidade aguda (n=3) realizados com o molusco bivalve *Perna perna* foi de 114,27 mg L⁻¹. O percentual de mortalidade para cada ensaio está apresentado na TAB. 6.

TABELA 6 – Percentual de mortalidade obtido nos ensaios de toxicidade aguda de DEET para o mexilhão *Perna perna*

Concentrações (mg L ⁻¹)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
	Mortalidade (%)		
Controle	0	0	0
Controle (solvente)	0	0	0
75	0	0	0
100	20	40	20
150	100	80	100
200	100	100	100
300	100	100	100
400	100	100	100

O valor da CL_{50} e do intervalo de confiança dos ensaios de ecotoxicidade realizados neste trabalho foram obtidos pelo programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977) e a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variância (CV) estão apresentados na TAB. 7.

TABELA 7 – Valores da CL50, intervalos de confiança, média, desvio padrão e coeficiente de variação para os ensaios de ecotoxicidade aguda do DEET para mexilhões *Perna perna*.

Ensaio	CL50 ₍₇₂₎ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (mg L ⁻¹)
1	114,27	(100,95-129,36)
2	114,27	(93,93-139,02)
3	114,27	(100,95-129,36)
Média	114,27	
Desvio padrão	16,98	
Coeficiente de variação (%)	15	

A FIG. 22 apresenta a taxa de mortalidade (%) dos mexilhões para o de DEET (mg L⁻¹).

FIGURA 22 – Taxa de mortalidade em função das concentrações de DEET a que os organismos foram expostos.

As concentrações de efeito agudo medido para peixes, invertebrados e algas variaram de 4 mg L⁻¹ a 388 mg L⁻¹, enquanto o intervalo de concentrações calculado pelo programa ECOSAR previu o efeito agudo de 25 mg L⁻¹ a 89 mg L⁻¹ (WEEKS *et al.*, 2011).

Na literatura existem poucos dados relativos à toxicidade aguda do DEET para os organismos aquáticos (WEEKS, 2011). E os dados disponíveis indicam que o DEET é ligeiramente tóxico para organismos aquáticos (MICHAEL and GRANT, 1974; OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS, 2000).

Na TAB. 8 estão representados os resultados da CL50 (mg L⁻¹) para várias espécies expostas ao DEET em diferentes *endpoints*.

TABELA 8 – Toxicidade aguda do DEET para diversas espécies em diferentes ensaios (Adaptado de RAND e BRAUSCH, 2011).

Composto	Categoria	Espécie	Nível trófico	Endpoint/duração	CL50 (mg L ⁻¹)
N,N-dietil metatoluamida (DEET)	Repelente de insetos	<i>D. magna</i>	Invertebrado	48h, 96h	160, 108 ¹
		<i>G. fasciatus</i>	Invertebrado	96h	100 ²
		<i>P. promelas</i>	Peixe	96h	110 ³
		<i>G. affinis</i>	Peixe	24-48h	235 ⁴
		<i>O. mykiss</i>	Peixe	96h	71,3 ⁵
		<i>C. protothecoides</i>	Alga	24h fotossíntese	388 ⁶

(1) Seo et al. (2005), (2) Mayer and Ellersieck (1986), (3) Brooke et al. (1984), (4) Michael and Grant (1974), (5) Office of Pesticides Program (2000), (6) Costanzo et al. (2007).

O DEET possui um baixo fator de bioconcentração e provavelmente não é acumulado em organismos aquáticos (COSTANZO *et al.*, 2007), o composto foi regularmente detectado em efluentes tratados e águas superficiais em concentrações de 0,2 ng L⁻¹ e 55 ng L⁻¹, respectivamente (WEEKS, 2011)

Embora o composto seja relativamente resistente à degradação e comumente encontrado em águas de superfície, até o presente momento desconhece-se estudos que examinaram a toxicidade crônica da exposição ao DEET para os organismos aquáticos (WEEKS, 2011)

Foi identificado que o DEET inibe a colinesterase em ratos (CHANEY *et al.*, 2000), e é possível que efeitos semelhantes possam ser observados em peixes, apesar de nenhuma pesquisa ter sido conduzida até o presente momento (WEEKS, 2011).

Além disso, nenhum estudo foi realizado para examinar possíveis efeitos endócrinos em organismos aquáticos, embora estudos nesse âmbito tenham sido conduzidos em ratos.

Os resultados em ratos machos indicaram que DEET não tem efeito sobre o número, morfologia ou viabilidade de espermatozóides após exposição de nove semanas ao composto (LEBOWITZ *et al.*, 1983), partindo desse contexto acredita-se que o composto apresenta baixo potencial de efeito em espécies aquáticas (WEEKS, 2011).

Costanzo *et al.* (2007) realizaram uma avaliação de risco preliminar para o DEET, e concluíram que o composto não é susceptível de produzir efeitos biológicos em concentrações ambientalmente relevantes nos ecossistemas aquáticos; no entanto, devido à falta de informação sobre a toxicidade crônica uma avaliação definitiva não foi concluída.

A toxicidade crônica do DEET para os organismos aquáticos ainda permanece indeterminada. Foi realizada uma avaliação preliminar de risco semelhante a do DEET, com o repelente de traça 1,4-diclorobenzeno, e invertebrados, especificamente *D. magna*, que se mostrou mais sensível à exposição de curto prazo enquanto que peixes mostraram-se mais sensíveis à exposição a longo prazo (BOUTONNET *et al.*, 2004).

Com base nas concentrações ambientais de 1,4-diclorobenzeno observadas, efeitos agudos ou crônicos estão ocorrendo para os organismos de água doce e marinhos, além disso, existe um potencial para a bioacumulação do composto e ainda não há nenhuma indicação de que o composto pode causar efeitos endócrinos (BOUTONNET *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos nesta etapa do projeto propiciam uma orientação para o início dos ensaios de citotoxicidade com DEET em mexilhões *Perna perna* e contribuem para informações do potencial tóxico desta substância em mais um organismo aquático, uma vez que não existe uma avaliação de risco ecológica completa deste composto, e o princípio ativo está presente em diversos produtos comercialmente disponíveis sendo amplamente utilizado.

5.1.2 Radiação gama de ^{60}Co

Os ensaios de ecotoxicidade aguda avaliaram a $\text{DL50}_{(72)}$, dose capaz de causar mortalidade em 50% dos organismos 72h após a irradiação.

O valor da $\text{DL50}_{(72)}$ para os ensaios de ecotoxicidade aguda com mexilhões *Perna perna* irradiados com radiação gama de ^{60}Co foi de 1068 Gy, e o percentual de mortalidade de cada ensaio está representado na TAB. 9.

TABELA 9 – Percentual de mortalidade dos ensaios de toxicidade aguda para organismos irradiados com radiação gama de ^{60}Co

Doses (Gy)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
	Mortalidade (%)		
Controle	0	0	0
250	0	0	0
500	0	0	0
750	0	0	0
1000	40	40	60
1500	100	80	100
2000	100	100	100
2500	100	100	100
3000	100	100	100

Utilizou-se o software *Trimmed Spearman-Kärber* para o cálculo da $\text{DL50}_{(72)}$ e dos intervalos de confiança de cada ensaio, tais valores estão apresentados na TAB. 10. Os valores médios da DL50, desvio padrão e coeficiente de variação também constam na mesma.

TABELA 10 – Valores da DL50, intervalos de confiança, média, desvio padrão e coeficiente de variação para os ensaios de ecotoxicidade aguda para mexilhões *Perna perna*.

Ensaio	DL50 ₍₇₂₎ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (mg L ⁻¹)
1	1066,20	(915,98-1241,06)
2	1142,73	(939,29-1390,23)
3	994,80	(854,64-1157,95)
Média	1068	
Desvio padrão	180	
Coeficiente de variação (%)	17	

Na FIG. 23 está representada a taxa de mortalidade (%) de acordo com as doses (Gy) que os organismos foram submetidos.

FIGURA 23 – Taxa de mortalidade em função das doses de radiação gama de ⁶⁰Co a que os organismos foram expostos

A Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP) desenvolveu um sistema para proteger seres humanos da radiação ionizante, com recomendação de valores de referência (ICRP, 1991, 2007). Este sistema surgiu inicialmente da necessidade de controlar a exposição de radiação no local de trabalho e em

práticas médicas, expandindo posteriormente para proteger o público geral de resíduos radioativos associados com armas nucleares, e na geração e produção de energia nuclear (PENTREATH, 2009).

Uma deficiência tem sido a desatenção para um sistema paralelo que avalie os efeitos da radiação ionizante para a biota. A ICRP estabeleceu um novo comitê (*Committee 5 for the Protection of the Environment*) para realizar trabalhos futuros na área de proteção ambiental às radiações (BALONOV *et al.*, 2005; AIEA, 2005; VOLKLE, 2006).

A proteção do meio ambiente deve ser claramente demonstrada, independente da presença de seres humanos (PENTREATH, 2009).

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes na biota têm sido estudados por diversos pesquisadores e organizações (VERGA and SCHULTZ, 1982; AIEA, 1992; ROSA, 1992; WOODHEAD, 1993; EISLER, 1994, 2000; UNSCEAR, 1996; VERGA, 1997; HINTON, 1998; MEYERS-SCHONE and TALMAGE, 2003; IRVINE and SAMPLE, 2005; HIGLEY, 2007; GERASKIN *et al.*, 2007).

Vários estudos foram realizados em táxons específicos, incluindo protozoários (WICHTERMAN, 1972), insetos (O'BRIEN and WOLFE, 1964), anfíbios (BRUNST, 1965), répteis (COSGROVE, 1971), aves (MELLINGER and SCHULTZ, 1975), plantas (VERGA and FRALEY, 1974), organismos terrestres (VERGA and HINTON, 1996) e biota aquática (AIEA, 1976, 1979; ANDERSON e HARRISON, 1986; NCRP, 1991; BLAYLOCK *et al.*, 1993).

Estes estudos abordam aspectos dos efeitos radiobiológicos, incluindo semelhanças e diferenças nos seres humanos e na biota, radiosensibilidade, transferência linear de energia (LET), eficácia radiobiológica (RBE), fator de ponderação da radiação (wR), efeitos determinístico versus efeitos estocásticos, exposição aguda versus exposição crônica e *endpoints* em diversos níveis de organização biológica (DELISTRATY, 2008).

Vias de exposição específicas aumentam a radiosensibilidade (devido a diferenças na toxicocinética, bioacumulação, comportamento) e efeitos secundários podem produzir efeitos biológicos únicos na biota (DELISTRATY, 2008).

Existem características comuns de efeitos da radiação em todos os organismos vivos, devido às semelhanças no nível molecular, como por exemplo a radiação ionizante pode ionizar átomos e moléculas, que por sua vez, podem produzir radicais livres, quebrar ou formar ligações químicas e moléculas que regulam processos celulares; geralmente esses processos ocorrem pela ação indireta da radiação.

Quando os mecanismos de reparação celular estão saturados, ocorrem danos, e a molécula de DNA é o principal alvo para a indução de efeitos biológicos da radiação em todos os organismos (ICRP, 2003). As quebras na cadeia dupla de DNA são de difícil reparação, portanto é um efeito bastante significativo (ZAHRAKA *et al.*, 2006; DOWNS *et al.*, 2007).

Além de danos diretos do DNA, a radiação ionizante pode interferir com a metilação do DNA ou modificação de histonas, dois principais mecanismos epigenéticos que podem alterar a expressão gênica (QIU, 2006).

A Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) recomenda um limite de dose aguda de 0.1 Gy para plantas terrestres e populações animais, um limite de taxa de dose crônica de 1 mGy d⁻¹ para populações de animais terrestres e um limite de taxa de dose crônica de 10 mGy d⁻¹ para populações aquáticas e populações de plantas terrestres (NCRP, 1991; IAEA, 1992).

De acordo com Irvine e Sample (2005) em uma recente compilação de dados nenhum efeito agudo e crônico adverso foram observados (NOAELs) para a exposição de radiação à biota (TAB. 11), esses resultados sugerem que as orientações da AIEA seriam de medidas preventivas na maioria dos casos.

Porém, foi observado que o critério de exposição de 30 dias a exposições agudas e crônicas (IRVINE and SAMPLE, 2005) é um tanto arbitrário, em relação às definições aguda e crônica especificadas pela AIEA (1992).

Como o nível de organização biológica aumenta, há aumentos em escala espacial e temporal, bem como aumento na magnitude da dose/resposta. Isso reflete em uma cascata hierárquica de respostas biológicas à exposição de contaminantes (POLIKARPOV, 1998; SPURGEON *et al.*, 2005).

TABELA 11 – Efeitos adversos não observados, expressos em média geométrica da taxa de dose, para exposição aguda e crônica de radiação ionizante em diversos táxons da biota não-humana^a

Taxon	Taxa de dose aguda (≤30 dias de exposição)		Taxa de dose crônica (>30 dias de exposição)		Dados agudos e crônicos combinados	
	NOAEL (Gy/d)	n ^b	NOAEL (Gy/d)	n ^b	NOAEL (Gy/d)	n
Anfíbios/Répteis	2,3	1	0,020	1	0,21	2
Aves	3,4	22	0,00020	7	0,60	29
Mamíferos	0,50	13	0,033	15	0,12	28
Invertebrados terrestres	23	3	64	2	35	5
Plantas terrestres	2,4	4	0,027	10	0,10	14
Invertebrados aquáticos	20	12	1,3	14	2,0	26
Peixes	1,1	4	0,019	6	0,095	10

^aAdaptado de Irvine e Sample (2005). Os autores classificaram exposição como aguda ou crônica (relativo para um período de 30 dias de duração) e convertida dose total aguda a uma taxa de dose aguda (quando possível) para facilitar a comparação com a taxa de dose crônica; ^b n= número de observações.

A maioria das pesquisas tem abordado o efeito da radiação ionizante em organismos individuais. Na avaliação de risco ecológico (ARE), o objetivo é proteger a população, exceto espécies ameaçadas de extinção onde o indivíduo necessita de proteção individual (IAEA,1992).

Além da hipótese inicial de que a biota é protegida de acordo com a radioproteção humana (ICRP, 1991), abordagens mais interessantes têm sido propostas para avaliar os impactos da radiação ionizante diretamente na biota.

Estas estratégias têm sido recomendadas por diversas organizações internacionais, os papéis e as responsabilidades das organizações relevantes foram descritos por IAEA (2005) e ICRP (2003) e forneceram um quadro global de uma perspectiva internacional.

Várias dessas estratégias incluem a aplicação de uma avaliação de risco ecológico, uso de padrões de limite de taxa de dose, desenvolvimento de um conjunto de referência para flora e fauna, e uma abordagem geográfica.

Os resultados dos ensaios de letalidade de radiação gama de ^{60}Co para o mexilhão *Perna perna* é um dado inédito na literatura. E contribuíram para a definição das doses utilizadas nos ensaios de citotoxicidade com o DEET, onde foi avaliado o potencial citotóxico da substância em organismos que já tinham sido expostos à uma determinada dose de radiação. E a interação da radiação com o DEET com a observação de efeito sinérgico ou antagônico.

5.2 Ensaios de citotoxicidade com *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia)

5.2.1 Ensaios preliminares de citotoxicidade do DEET com organismos não irradiados

As concentrações de DEET utilizadas nos ensaios preliminares de citotoxicidade foram definidas a partir da CL50 encontrada nos ensaios de toxicidade aguda, foram realizados diversos ensaios para encontrar a faixa de efeitos citotóxicos, e partir disso definiu-se concentrações para a obtenção da CEO, CENO, CI25 e CI50.

O primeiro ensaio preliminar de citotoxicidade do DEET com organismos não irradiados não apresentou diferença significativa entre os controles de água e água acrescida de solvente (álcool PA) para $\alpha=0,05$ e $\alpha=0,01$. Foi aplicado o Teste *t* de *Student* para avaliar se houve diferença significativa com o solvente utilizado, e a partir disso foi realizada a análise estatística com as concentrações testadas. Todas as análises dos ensaios de citotoxicidade foram realizadas no Software TOXSTAT 3.4.

Observou-se diferença significativa em todas as concentrações testadas (50,0; 1,0; 0,02 mg L⁻¹). A FIG. 24 representa o tempo de retenção do corante vermelho (VN) em minutos para cada concentração de DEET testada e os controles de água e solvente, em todos os tempos de exposição (24, 48 e 72h). Os valores médios do tempo de retenção do corante, desvio padrão e coeficiente de variação para cada leitura realizada estão apresentados na TAB. 12.

FIGURA 24 – Representação gráfica do tempo de retenção do corante VN em função das concentrações de DEET para o mexilhão *Perna perna*

(*) Diferença significativa em relação ao controle

TABELA 92 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para as leituras do 1º ensaio de citotoxicidade

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)
Controle	66,0	8,2	12,4	66,0	8,2	12,4	66,0	8,2	12,4
Solvente	69,0	8,2	11,9	60,0	10,6	17,6	63,0	6,7	10,6
0,02	24,0	8,2	34,2	27,0	12,5	46,4	21,0	13,4	63,8
1	3,0	6,7	223,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

No segundo ensaio foram testadas as concentrações de: 0,001 mg L⁻¹, 0,02 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹. Na análise estatística pelo Test *t* de Student não houve diferença significativa entre os controles. Houve diferença significativa em todas as concentrações testadas comparadas com o controle em todos os tempos de exposição. A FIG. 25 mostra os resultados do tempo de retenção do corante vermelho neutro (VN) em função das concentrações que os organismos foram expostos.

Ensaio Preliminar DEET II

FIGURA 25 – Representação gráfica do tempo de retenção do corante VN em função das concentrações de DEET para o mexilhão *Perna perna*

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Foram calculados os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão e coeficiente de variação para as leituras realizadas, tais resultados estão apresentados na TAB. 13.

TABELA 10 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para as leituras do 2º ensaio de citotoxicidade

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)
Controle	69,0	8,2	11,9	63,0	6,7	10,6	63,0	6,7	10,6
Solvente	63,0	6,7	10,6	66,0	8,2	12,4	66,0	8,2	12,4
0,001	39,0	8,2	21,0	42,0	6,7	15,9	27,0	12,5	46,4
0,02	27,0	6,7	24,8	33,0	6,7	20,3	15,0	0,0	0,0
0,5	6,0	8,2	136,9	6,0	8,2	136,9	6,0	8,2	136,9

A partir desses resultados foram testadas concentrações mais baixas no terceiro ensaio preliminar (0,0001 mg L⁻¹, 0,001 mg L⁻¹ e 0,02 mg L⁻¹).

Os controles foram comparados pelo teste *t* de Student e não apresentaram diferença significativa.

Nos tempos de 24 e 48h as concentrações de 0,001 e 0,02 mg L⁻¹ apresentaram diferença significativa em relação ao controle, e em 72h todas as concentrações apresentaram efeito.

Os resultados do tempo de retenção do corante em função das concentrações são apresentados na FIG. 26.

Ensaio Preliminar DEET III

FIGURA 26 – Representação gráfica do tempo de retenção do corante VN em função das concentrações de DEET para o mexilhão *Perna perna*

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão e coeficiente de variação para este ensaio estão na TAB. 14.

TABELA 14 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para as leituras do 3º ensaio de citotoxicidade

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)
Controle	63,0	6,7	10,6	63,0	6,7	10,6	63,0	6,7	10,6
Solvente	60,0	10,6	17,6	60,0	15,0	25,0	63,0	6,7	10,6
0,0001	57,0	6,7	11,7	54,0	8,2	15,2	45,0	10,6	23,5
0,001	33,0	6,7	20,3	30,0	0,0	0,0	27,0	12,5	46,4
0,02	27,0	6,7	24,8	24,0	8,2	34,2	15,0	0,0	0,0

Para tanto foram realizados outros dois ensaios (FIG. 26) com as mesmas concentrações (0,0001 mg L⁻¹, 0,001 mg L⁻¹ e 0,02 mg L⁻¹), onde observou-se diferença significativa em todas as concentrações testadas em um dos ensaios

FIG. 27 (a), e no outro, diferença significativa apenas nas duas concentrações mais altas (0,02 mg L⁻¹ e 0,001 mg L⁻¹) FIG. 27 (b).

FIGURA 27 – (a, b) Representação gráfica do tempo de retenção do corante VN em função das concentrações de DEET para o mexilhão *Perna perna*

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão e coeficiente de variação dos ensaios representados pelas FIG. 27a e 27b, estão apresentados na TAB. 15 e 16.

TABELA 11 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para as leituras do 4º ensaio de citotoxicidade

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)
Controle	66,0	8,2	12,4	60,0	10,6	17,6	66,0	8,2	12,4
Solvente	63,0	6,7	10,6	54,0	8,2	15,2	66,0	8,2	12,4
0,0001	54,0	8,2	15,2	54,0	8,2	15,2	42,0	6,7	15,9
0,001	33,0	6,7	20,3	42,0	6,7	15,9	18,0	6,7	37,2
0,02	27,0	6,7	24,8	27,0	12,5	46,4	18,0	6,7	37,2

TABELA 12 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para as leituras do 5º ensaio de citotoxicidade

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)
Controle	69,0	8,2	11,9	63,0	6,7	10,6	63,0	6,7	10,6
Solvente	69,0	8,2	11,9	60,0	15,0	25,0	63,0	6,7	10,6
0,0001	54,0	8,2	15,2	57,0	6,7	11,7	51,0	8,2	16,1
0,001	36,0	13,4	37,2	30,0	0,0	0,0	18,0	6,7	37,2
0,02	24,0	8,2	34,2	24,0	8,2	34,2	15,0	0,0	0,0

Um estudo realizado por Barber e colaboradores (2013) identificou os 25 compostos orgânicos mais detectados em estações de tratamento de efluentes em algumas localidades norte-americanas no verão e primavera de 2005, dentre os compostos mais encontrados estava o DEET na concentração ambiental média de 0,33 µg L⁻¹ em efluentes residuais, e na concentração ambiental média de 0,19 µg L⁻¹ nas proximidades das estações de tratamento.

Estes valores foram encontrados a partir de extração contínua líquido-líquido de compostos orgânicos neutros. Para os compostos encontrados foi calculado o quociente de perigo (Hazard Quotient), que é o valor estimado do contaminante capaz de causar um risco ambiental potencial.

Para o DEET o valor do quociente em efluente foi de 0,00064 µg L⁻¹ e em rio 0,00037 µg L⁻¹, esse quociente de perigo (HQ) é calculado a partir da concentração ambiental média pelo valor da concentração letal 50%.

Quando o valor do HQ é <1 (µg L⁻¹) considera-se que o composto apresenta baixo risco potencial.

As concentrações testadas nos ensaios de citotoxicidade que apresentaram efeito para o mexilhão *Perna perna* estão na mesma faixa das concentrações ambientais encontradas no estudo realizado por Barber (2013), o que configura a necessidade de se avaliar a toxicidade em concentrações mais baixas, na ordem de µg e ng L⁻¹ a fim de se manter uma boa qualidade da água e proteger a biota aquática de substâncias com potencial tóxico.

5.2.2 Ensaios definitivos de citotoxicidade do DEET em organismos não irradiados

Para definir as concentrações do DEET passíveis de causar efeito citotóxico no molusco bivalve *Perna perna* foram realizados ensaios definitivos em triplicata, com maior número de organismos ($n=15$) utilizando as mesmas concentrações testadas nos últimos ensaios preliminares ($0,0001 \text{ mg L}^{-1}$, $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,02 \text{ mg L}^{-1}$) para os tempos de exposição de 24, 48 e 72h (FIG. 28, 29 e 30).

FIGURA 28 – Toxicidade do DEET em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (Ensaio I)

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Observou-se efeito nas concentrações de $0,001$ e $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ para todos os tempos de exposição (24, 48 e 72h). Nesse ensaio a CENO foi de $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ e a CEO $0,001 \text{ mg L}^{-1}$.

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvios padrão e coeficiente de variação de cada leitura realizada estão apresentados na tabela abaixo (TAB. 17)

TABELA 13 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)
Controle	66,0	7,6	11,5	62,0	7,7	12,5	54,0	7,6	14,1
Solvente	64,0	8,9	13,9	60,0	11,3	18,9	50,0	7,3	14,6
0,0001	58,0	11,2	19,2	56,0	8,9	15,9	49,0	6,8	14,0
0,001	36,0	9,5	26,3	38,0	7,7	20,4	24,0	11,1	46,0
0,02	26,0	6,8	26,4	28,0	9,6	34,3	18,0	8,4	46,7

No segundo ensaio definitivo (FIG. 29) as concentrações mais altas (0,02 e 0,001 mg L⁻¹) apresentaram diferença significativa em relação aos controles, sendo portanto a CENO 0,0001 mg L⁻¹ e a CEO 0,001 mg L⁻¹.

FIGURA 29 – Toxicidade do DEET em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (Ensaio II)

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvios padrão e coeficientes de variação de acordo com as leituras realizadas são apresentados na tabela abaixo (TAB. 18)

TABELA 14 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)
Controle	60,0	17,9	29,8	60,0	13,8	23,1	57,0	10,1	17,7
Solvente	58,0	16,8	29,1	57,0	8,4	14,7	55,0	9,2	16,8
0,0001	52,0	11,2	21,4	53,0	7,7	14,6	52,0	9,5	18,4
0,001	33,0	10,1	30,7	34,0	11,9	35,2	27,0	15,2	56,3
0,02	22,0	12,5	56,8	24,0	13,6	56,8	19,0	8,9	46,8

No último ensaio de citotoxicidade de DEET com organismos não irradiados a CENO foi de 0,0001 mg L⁻¹ e a CEO de 0,001 mg L⁻¹. Os dados estão apresentados na figura abaixo (FIG. 30) e os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvios padrão e coeficientes de variação para este ensaio estão na TAB. 19.

FIGURA 30 – Toxicidade do DEET em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (Ensaio III)

(*) Diferença significativa em relação ao controle

TABELA 15 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)	Média	D P	C V(%)
Controle	59,0	11,9	20,3	62,0	11,1	17,9	58,0	11,1	19,2
Solvente	60,0	13,8	23,1	61,0	11,9	19,6	55,0	9,2	16,8
0,0001	54,0	7,6	14,1	53,0	7,7	14,6	49,0	8,9	18,1
0,001	34,0	18,3	53,9	32,0	15,9	49,6	24,0	7,6	31,7
0,02	21,0	18,6	88,7	25,0	13,5	53,9	17,0	11,1	65,6

Para complementar a avaliação da citotoxicidade foi calculada a CI25 e CI50 nos ensaios definitivos. Os resultados com as médias, intervalos de confiança, desvios padrão e coeficientes de variação de todos os ensaios estão apresentados nas TAB. 20, 21 e 22 de acordo com as leituras realizadas (24, 48 e 72h) para os valores da CI25.

TABELA 20 – Valores calculados para a CI25_(24h)

Ensaio	CI25 ₍₂₄₎	Intervalo de confiança
	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
1	0,0004	(0,0002-0,0006)
2	0,0005	(0,0002-0,0008)
3	0,0005	(0,0002-0,0008)
Média	0,0005	
Desvio padrão	0,00	
Coeficiente variação (%)	12	

TABELA 16 – Valores calculados para a CI25_(48h)

Ensaio	CI25 ₍₄₈₎	Intervalo de confiança
	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
1	0,0005	(0,0003-0,0007)
2	0,0004	(0,0002-0,0007)
3	0,0003	(0,0002-0,0006)
Média	0,0004	
Desvio padrão	0,0001	
Coeficiente de variação (%)	25	

TABELA 17 – Valores calculados para a $CI_{25(72h)}$

Ensaio	$CI_{25(72)}$ (mg L⁻¹)	Intervalo de Confiança (mg L⁻¹)
1	0,0004	(0,0002-0,0005)
2	0,0004	(0,0002-0,0005)
3	0,0002	(0,00009-0,00046)
Média	0,0003	
Desvio padrão	0,0001	
Coeficiente de variação (%)	35	

Os valores da CI_{50} estão apresentados nas TAB. 23, 24 e 25 para as leituras de 24, 48 e 72h, respectivamente.

TABELA 18 – Valores calculados para a $CI_{50(24h)}$

Ensaio	$CI_{50(24)}$ (mg L⁻¹)	Intervalo de confiança (mg L⁻¹)
1	0,0067	(0,0009-0,0110)
2	0,0087	(-)
3	0,0075	(-)
Média	0,0076	
Desvio padrão	0,0010	
Coeficiente de variação (%)	13	

TABELA 19 – Valores calculados para a $CI_{50(48h)}$

Ensaio	$CI_{50(48)}$ (mg L⁻¹)	Intervalo de confiança (mg L⁻¹)
1	0,0143	(-)
2	0,0086	(-)
3	0,0009	(-)
Média	0,0079	
Desvio padrão	0,0067	
Coeficiente de variação (%)	85	

TABELA 20 – Valores calculados para a $CI50_{(72h)}$

Ensaio	$CI50_{(72)}$ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (mg L ⁻¹)
1	0,0008	(0,0007-0,0054)
2	0,0009	(0,0007-0,0096)
3	0,0008	(0,0006-0,0009)
Média	0,0008	
Desvio padrão	0,0001	
Coefficiente de variação (%)	7	

Apesar do DEET ser o princípio ativo de repelentes de insetos mais utilizado em âmbito mundial, e estar nas formulações da maioria dos produtos com repelência disponíveis comercialmente, ainda são escassos os dados sobre seu comportamento no meio ambiente, e os processos de degradação do composto após tratamento de águas e efluentes.

Nos últimos anos, a contaminação de DEET tem sido amplamente divulgada, e o composto tem sido detectado em diversas matrizes ambientais aquáticas, incluindo rios, águas subterrâneas, oceano, águas residuais e até mesmo em água tratada por sistemas de tratamento de água convencionais (SANDSTROM, 2005; TAY, 2009; CALZA, 2011).

O DEET pode atingir o ambiente, principalmente por meio de águas residuais e é considerado persistente na hidrólise. Como resultado de seu uso extensivo, o DEET passou a ser classificado como um contaminante emergente, e sua remoção da água é de alta prioridade (ANTONOPOULOU, 2013).

Em um estudo de monitoramento de fármacos e contaminantes emergentes foi identificada a presença de DEET em estações de tratamento de águas residuais da Região Norte do Arizona e na Ilha de Pittsburg, a menor detecção foi de 23 ng L⁻¹ e a maior de 3000 ng L⁻¹ (WILSON *et al.*, 2013).

Wilson (2013) detectou concentrações de DEET em amostras de água de superfície no rio Colorado na ordem de ng L⁻¹, a menor concentração detectada foi de 5,5 e a maior de 8,5. Na Baía de Thompson do Lago Havasu também identificou-se DEET com o menor valor detectado de 6,2 e o maior de 12 ng L⁻¹ (WILSON, 2013).

Também foram monitorados poços na estação de tratamento de águas na Região Norte do Arizona e um ponto na área urbanizada dentro da cidade, os poços possuem de 150-200m de profundidade, e as concentrações de DEET variaram na faixa de 1,7 - 11 ng L⁻¹. Pode-se observar que o DEET diminui rapidamente em uma média de 700 ng L⁻¹ em um dos pontos da estação de tratamento para menos de 10 ng L⁻¹ no monitoramento mais próximo (Wilson *et al.*, 2013).

Outros estudos também identificaram a presença de DEET em outra matrizes ambientais, como o estudo realizado por Magnusson (2013), onde foram detectadas concentrações de DEET em sedimentos de rios e estuários de importância econômica ao longo da costa norte de Queensland na Austrália, no rio Herbert foram detectadas 2,7 - 3,7 µg kg⁻¹ de DEET em sedimento e no rio Daintree 4,4 - 5,7 µg kg⁻¹.

Um estudo realizado por Antonopoulou (2013) avaliou o mecanismo de degradação fotocatalítica do DEET em meio aquoso por uma bateria de técnicas analíticas, foram empregadas medições precisas para identificar inúmeros produtos de transformação e a estrutura dos diversos isômeros formados durante a degradação do composto.

A degradação do DEET ocorre através do ataque de radicais •OH, principalmente sobre o anel aromático para formar os radicais hidroximetilciclohexadieno e posteriormente produtos de transformação mono e polihidroxilados, outras rotas de transformação procedem através da adição de radicais superóxidos e finalmente reações de abertura do anel (ANTONOPOULOU, 2013).

A avaliação da toxicidade foi avaliada pelo monitoramento das alterações na bioluminescência de *Vibrio fischeri*, em uma amostra inicial mostrou um valor de inibição de 20%, depois de uma diminuição inicial para 13%, a toxicidade aumentou e atingiu um máximo de 25% de inibição em 20 min., após esse tempo, a toxicidade diminuiu e atingiu menos de 5% em 60 minutos, o que demonstrou eficiência no tratamento fotocatalítico para alcançar a desintoxicação quase completa de amostras contendo DEET (ANTONOPOULOU, 2013).

Com diversos estudos identificando concentrações de DEET na ordem de µg e ng L⁻¹ em diversas matrizes mostram a importância de se avaliar a toxicidade desse composto em organismos não-alvos, os efeitos adversos causados sobre a

biota e seu possível potencial de efeito sinérgico em combinação com outras substâncias. O presente estudo encontrou efeito citotóxico do DEET em concentrações acima de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ um valor bem próximo das concentrações identificadas no meio ambiente, que evidencia a necessidade de mais estudos sobre a toxicidade, degradação e persistência desse composto no ambiente aquático e na biota.

5.2.3 Ensaios preliminares de citotoxicidade do DEET em organismos irradiados

Para a avaliação da citotoxicidade do DEET em organismos irradiados foram escolhidas três doses de radiação gama de ^{60}Co a partir da DL50, com o intuito de se verificar a possibilidade de haver efeitos adversos nos organismos, e a partir disso escolher a melhor dose para ser testada nos ensaios definitivos.

Como a $\text{DL50}_{(72\text{h})}$ foi de 1068 Gy foram definidas as doses: 3; 11 e 107 Gy para os ensaios de citotoxicidade utilizando as concentrações de $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$, $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ de DEET.

Na dose de 3 Gy (FIG. 31) observou-se que o tempo de retenção não foi significativamente diferente dos ensaios em que os organismos não foram irradiados, sugerindo que essa dose não tenha sido suficiente para promover algum dano passível de ser observado dentro do período em que o experimento foi realizado.

FIGURA 31 – Toxicidade do DEET em hemócitos de *Perna perna* irradiados (3Gy)

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Os valores do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão e coeficiente de variação de cada leitura realizada no ensaio são apresentadas na TAB. 26.

TABELA 21 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN (minutos), desvio padrão* e coeficiente de variação**

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)
Controle	64	10,457	16,339	61	9,307	15,257	50	9,012	18,025
Solvente	62	13,127	21,173	58	9,954	17,163	49	11,105	22,663
0,0001	54	8,215	15,214	50	9,660	19,321	40	9,158	22,895
0,001	28	9,158	32,707	28	11,105	39,661	19	8,510	44,790
0,02	19	7,210	37,951	22	9,949	45,224	15	8,007	53,384

Quando os organismos foram irradiados a 11 Gy (FIG. 32), observou-se uma diminuição no tempo de retenção do corante vermelho neutro em todas as concentrações quando em comparação com os ensaios de organismos não irradiados.

Pode-se sugerir que a radiação tenha uma ação potencial à toxicidade do composto. Para verificar essa possibilidade foram realizados ensaios definitivos utilizando a dose de 11 Gy, com maior número de organismos (n=15).

FIGURA 32 – Toxicidade do DEET em hemócitos de *Perna perna* irradiados (11 Gy)

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) estão apresentados na TAB. 27.

TABELA 22 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão* e coeficiente de variação**

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)
Controle	64	10,457	16,339	61	10,602	17,381	49	13,419	27,387
Solvente	62	13,127	21,173	59	13,359	22,643	50	12,622	25,245
0,0001	54	8,215	15,214	51	9,158	17,956	43	10,891	25,329
0,001	32	9,809	30,655	32	13,419	41,936	24	12,070	50,292
0,02	22	8,215	37,344	19	12,793	67,333	15,75	8,125	51,589

A dose de 107 Gy (FIG. 33) causou efeito adverso aos organismos, pode-se observar uma redução significativa no número de células comparando-se com as outras doses testadas, além de ocorrer lise celular na maioria das lâminas analisadas (>80%).

Também houve uma diminuição no tempo de retenção do corante em 48h para as concentrações de 0,001 e 0,02 mg L⁻¹ com aumento em 72h.

FIGURA 33 – Toxicidade do DEET em hemócitos de *Perna perna* irradiados (107 Gy)

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) de cada leitura realizada estão apresentados na TAB. 28.

TABELA 23 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvios padrão* e coeficientes de variação**

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)
Controle	64	10,457	16,339	57	8,655	15,184	51	11,254	22,067
Solvente	57	13,127	23,030	56	9,307	16,619	50	12,622	25,245
0,0001	53	8,215	15,501	49	7,713	15,741	43	8,366	19,457
0,001	29	8,510	29,345	11	9,158	83,254	25,25	11,683	46,270
0,02	18	6,708	37,267	8	8,215	102,697	15,5	7,861	50,718

Os organismos que receberam 107 Gy de radiação gama de ⁶⁰Co tiveram um menor tempo de retenção do corante nos lisossomos de hemócitos, sugere-se que nesse caso a radiação cause um efeito de potencialização com o DEET, ou seja, que a toxicidade aumente quando os organismos são irradiados e expostos ao DEET.

Ocorreu mortalidade de organismos que foram irradiados e expostos à 0,001 e 0,02 mg L⁻¹ de DEET, observou-se também uma intensa liberação de gametas nos organismos que receberam essa dose de radiação.

Sugerindo também que a radiação nessa dose, seguida de exposição ao DEET tenha causado alguma alteração no sistema fisiológico dos organismos, e os que não conseguiram se recuperar do efeito vieram a óbito.

Com os resultados desses ensaios preliminares definiu-se a dose de 11 Gy para os ensaios definitivos, pois foi uma dose que causou diminuição do tempo de retenção, mostrando que a radiação atua de alguma maneira sobre o metabolismo dos mexilhões, porém essa dose não foi passível de causar um efeito maior impedindo a realização do ensaio.

5.2.4 Ensaios definitivos de citotoxicidade do DEET em organismos irradiados

Foram realizados ensaios com organismos irradiados (n=15) a 11 Gy e expostos às mesmas concentrações de DEET (0,0001; 0,001; 0,02 mg L⁻¹) dos ensaios anteriores para avaliar a toxicidade do composto em organismos irradiados.

Os resultados dos ensaios I, II e III estão apresentados nas FIG. 34, 35 e 36. Para todos os ensaios com organismos irradiados a CENO encontrada foi de $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ e a CEO de $0,001 \text{ mg L}^{-1}$.

FIGURA 34 – Toxicidade do DEET em hemócitos de *Perna perna* irradiados (Ensaio I)

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão e coeficiente de variação de cada leitura realizada estão apresentados na tabela abaixo (TAB. 29)

TABELA 24 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão* e coeficiente de variação** em organismos irradiados com 11 Gy

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)
Controle	64	10,556	16,493	61	10,556	17,304	49	15,491	31,616
Solvente	62	13,732	22,148	59	12,806	21,705	50	13,496	26,992
0,0001	54	7,606	14,085	51	10,667	20,915	43	11,148	25,926
0,001	33	8,409	25,482	33	14,696	44,536	24,375	12,990	53,293
0,02	22	7,746	35,209	22	15,362	69,828	19,285	13,708	71,079

FIGURA 35 – Toxicidade do DEET em hemócitos de *Perna perna* irradiados (Ensaio II)

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão e coeficiente de variação de cada leitura realizada estão apresentados na TAB. 30.

TABELA 25 – Valores da média, desvio padrão* e coeficiente de variação** em organismos irradiados com 11 Gy

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	*D P	**C V(%)	Média	*D P	**C V(%)	Média	*D P	**C V(%)
Controle	62	11,148	17,981	61	8,904	14,597	50	9,258	18,516
Solvente	58	7,746	13,355	58	9,599	16,550	49	10,556	21,542
0,0001	49	10,556	21,542	50	9,258	18,516	40	9,258	23,145
0,001	26	10,556	40,6	22	7,746	35,209	19	8,904	46,864
0,02	20	9,258	46,291	20	7,319	36,596	15	8,017	53,452

FIGURA 36 – Toxicidade do DEET em hemócitos de *Perna perna* irradiados (Ensaio III)

(*) Diferença significativa em relação ao controle

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão e coeficiente de variação de cada leitura realizada estão apresentados na TAB. 31.

TABELA 26 – Valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvio padrão* e coeficiente de variação** em organismos irradiados com 11 Gy

(mg L ⁻¹)	24h			48h			72h		
	Média	*D P	**C V(%)	Média	*D P	**C V(%)	Média	*D P	**C V(%)
Controle	60	16,035	26,726	57	8,409	14,752	57	10,141	17,792
Solvente	58	13,732	23,676	56	10,556	18,85	52	9,599	18,459
0,0001	50	9,258	18,516	49	10,556	21,542	46	8,904	19,356
0,001	27	15,212	56,343	26	14,417	55,451	19,285	14,917	77,349
0,02	18	11,619	64,55	18	11,619	64,55	14	11,982	85,586

Para a avaliação da citotoxicidade do DEET em organismos irradiados calculou-se também a CI50 nos ensaios definitivos. Os resultados com as médias, intervalos de confiança, desvios padrão e coeficientes de variação de todos os ensaios estão apresentados nas tabelas abaixo (TAB. 32, 33 e 34) de acordo com as leituras realizadas (24, 48 e 72h)

TABELA 27 – Valores calculados para a $CI50_{(24h)}$ em organismos irradiados

Ensaio	$CI50_{(24)}$ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (mg L ⁻¹)
1	0,0067	(0,0009-0,0110)
2	0,0087	(-)
3	0,0075	(-)
Média	0,0076	
Desvio padrão	0,0010	
Coeficiente de variação (%)	13,1875	

TABELA 28 – Valores calculados para a $CI50_{(48h)}$ em organismos irradiados

Ensaio	$CI50_{(48)}$ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (mg L ⁻¹)
1	0,0143	(-)
2	0,0086	(-)
3	0,0009	(-)
Média	0,0079	
Desvio padrão	0,0067	
Coeficiente de variação (%)	84,7668	

TABELA 29 – Valores calculados para a $CI50_{(72h)}$ em organismos irradiados

Ensaio	$CI50_{(72)}$ (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança (mg L ⁻¹)
1	0,0008	(0,0007-0,0054)
2	0,0009	(0,0007-0,0096)
3	0,0008	(0,0006-0,0009)
Média	0,0008	
Desvio padrão	0,0001	
Coeficiente de variação (%)	6,9282	

Os efeitos biológicos de qualquer contaminante são geralmente dependentes da dose recebida. No caso da radiação ionizante, a dose está relacionada com a energia absorvida no corpo de organismos vivos (FISHER *et al.*, 2013).

Muitos invertebrados acumulam contaminantes, tais como radionuclídeos, geralmente por serem organismos de hábitos sésseis ou de pouca mobilidade, e filtradores. Eles são indicadores ideais pois podem se acumular radionuclídeos muitas vezes acima as concentrações na identificadas na água do mar (MATISHOV & MATISHOV, 2004).

Recentes relatórios descreveram a presença de radionuclídeos liberados após o acidente na usina nuclear Fukushima Daiichi na biota do Pacífico, tal fato têm despertado preocupação e atenção em todo o mundo (BUESSELER, *et al.*, 2012; MADIGAN, *et al.*, 2012)

Foram identificadas doses de radiação na biota marinha aproximadamente duas ordens de magnitude acima do valor de referência para a proteção proposta para os ecossistemas ($10 \mu\text{Gy h}^{-1}$) (FISHER *et al.*, 2013).

Em atuns rabilho (*Thunnus orientalis*) que migraram do Japão para águas de Califórnia foi identificada a presença de ^{134}Cs e ^{137}Cs (MADIGAN, *et al.*, 2012).

No presente estudo a radiação atuou como um fator estressante para os organismos, causando uma diminuição no tempo de retenção do corante vermelho neutro quando comparado com os organismos não irradiados, porém não suficiente para que houvesse um sinergismo entre o composto e a ação da radiação ionizante.

De acordo com Yamamoto (1994) ^{210}Po é um radionuclídeo que ocorre naturalmente da série do ^{238}U , e tem meia-vida de 138,4 dias, é um emissor alfa e tende a alcançar suas maiores concentrações ambientais dentro de organismos marinhos.

Dada a constatação de que radionuclídeos artificiais da usina nuclear de Fukushima causaram danos fisiológicos e genéticos, para uma espécie de borboleta residente, e que os efeitos cumulativos de irradiação externa e interna poderiam ter resultado em detrimientos a nível de população, foram avaliada as doses de Fukushima derivadas na biota Marinha e comparadas aos níveis de referência de toxicidade reconhecidos (HIYAMA, *et al.* 2012).

Os estudos com organismos irradiados e posteriormente expostos à substâncias químicas são escassos, Gimiliani (2013) conduziu um estudo com

microcrustáceos irradiados à 25 Gy de radiação gama de ^{60}Co e expostos ao DEET avaliando a taxa de reprodução, que diminuiu a partir de 15 mg L^{-1} do composto. Tais estudos são importantes para a verificação de possíveis interações entre diferentes substâncias, e sobre a toxicidade em organismos que estão sujeitos à receberem doses de radiação maiores que a radiação de “background”.

5.2.5 Exposição dos organismos à radiação ionizante

Para verificar se houve diminuição no tempo de retenção do corante vermelho neutro em lisossomos de hemócitos do mexilhão *Perna perna* irradiados à 11 Gy e não expostos ao DEET foram realizados ensaios onde se comparou os tempos de retenção do corante em organismos irradiados e não irradiados por meio do Teste *t* de Student.

Observou-se diferença significativa em relação ao controle para $\alpha=0,10$ e $\alpha=0,05$ em todas as leituras realizadas (24, 48 e 72h) para todos os ensaios (I, II e III), exceto para em 72h no ensaio I onde não se observou diferença significativa para $\alpha=0,01$. A FIG. 37 apresenta os resultados dos ensaios realizados.

FIGURA 37 – Tempo de retenção do corante vermelho neutro do molusco bivalve *Perna perna* irradiados em comparação com o controle

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvios padrão e coeficientes de variação de cada leitura realizada estão apresentados na TAB. 35.

TABELA 30 – Valores médios do tempo de retenção do corante, desvio padrão* e coeficiente de variação** de organismos irradiados com 11 Gy e controle

(Gy)	24h			48h			72h		
	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)
0	55,666	12,630	22,689	53	11,325	21,368	49,666	12,833	25,839
11	29,333	14,648	49,938	30,261	15,031	49,670	27,923	15,98	57,228

De acordo com o Conselho Nacional de Proteção Radiológica – NCRP (1991) os estudos dos efeitos da radiação ionizante sobre a biota geralmente são medidos em doses maiores do que o esperado em ambientes aquáticos, pois são associados às atividades nucleares.

A dose de radiação de um organismo é a quantidade total de energia absorvida da radiação ionizante por unidade de massa de tecido ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$ de tecido), e a taxa de dose refere-se à energia absorvida ao longo do tempo ($\mu\text{Gy h}^{-1}$) (FISHER *et al.*, 2013).

De acordo com Fisher e colaboradores (2013) uma fonte é a irradiação externa proveniente da contaminação circundante, tal como sedimentos ou água, principalmente a partir de raios gama, mas também por radiação beta em pequenos organismos ($< 1\text{cm}$).

O decaimento radioativo resulta em emissões energéticas que variam entre diferentes radionuclídeos, e a eficácia da radiação em causar algum dano biológico, está diretamente relacionada com o tipo de radiação emitida (FISHER *et al.*, 2013).

5.2.6 Comparação dos resultados dos ensaios de citotoxicidade do DEET com organismos irradiados e não irradiados com radiação gama de ^{60}Co

Com a finalidade de mostrar e comparar a diferença no tempo de retenção do corante vermelho neutro em lisossomos de hemócitos do molusco bivalve *Perna perna*, os resultados dos ensaios em organismos irradiados e em organismos não irradiados foram apresentados nas FIG. 38, 39 e 40.

FIGURA 38 – Tempo de retenção do corante VN em função da concentração de DEET para organismos irradiados e não irradiados (24h).

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvios padrão e coeficientes de variação de cada leitura realizada estão apresentados na TAB. 36.

TABELA 31 – Valores médios do tempo de retenção do corante, desvio padrão* e coeficiente de variação** de organismos irradiados e não irradiados (24h)

(mg L ⁻¹)	24h					
	Não irradiados			Irradiados		
	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)
Controle	60,666	9,910	16,335	62	12,58	20,290
Solvente	59,666	10,683	17,904	59,333	11,736	19,780
0,0001	54,666	9,967	18,233	51	9,140	17,921
0,001	34,333	12,656	36,864	28,666	11,392	39,741
0,02	23	12,668	55,079	20	9,541	47,705

FIGURA 39 – Tempo de retenção do corante VN em função da concentração de DEET para organismos irradiados e não irradiados (48h)

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvios padrão e coeficientes de variação de cada leitura realizada estão apresentados na TAB. 37.

TABELA 32 – Valores médios do tempo de retenção do corante, desvio padrão* e coeficiente de variação** de organismos irradiados e não irradiados (48h)

(mg L ⁻¹)	48h					
	Não irradiados			Irradiados		
	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)
Controle	61,333	10,927	17,816	59,666	9,289	15,569
Solvente	59,333	10,576	17,825	57,666	10,987	19,052
0,0001	54	8,132	15,059	50	10,163	20,327
0,001	34,666	11,876	34,259	27	12,286	45,506
0,02	25,666	12,249	47,726	20	11,433	57,167

FIGURA 40 – Tempo de retenção do corante VN em função da concentração de DEET para organismos irradiados e não irradiados (72h)

Os valores médios do tempo de retenção do corante VN, desvios padrão e coeficientes de variação de cada leitura realizada estão apresentados na TAB. 38.

TABELA 33 – Valores médios do tempo de retenção do corante, desvio padrão* e coeficiente de variação** de organismos irradiados e não irradiados (72h)

(mg L ⁻¹)	72h					
	Não irradiados			Irradiados		
	Média	*D P	**C V (%)	Média	*D P	**C V (%)
Controle	56,333	9,632	17,098	52	11,630	22,366
Solvente	53,333	8,611	16,147	50,333	11,217	22,282
0,0001	50	8,456	16,913	43	9,770	22,721
0,001	25	11,290	45,161	20,886	12,270	58,748
0,02	18	9,487	52,707	16,095	11,236	69,809

6. CONCLUSÕES

- A concentração letal de DEET para o molusco bivalve *Perna perna* foi de 114,27 mg L⁻¹;
- A dose letal de radiação gama de ⁶⁰Co para mexilhões *Perna perna* foi de 1068 Gy;
- As concentrações de DEET na faixa de 0,001 à 0,02 mg L⁻¹ apresentaram citotoxicidade para lisossomos de hemócitos do mexilhão *Perna perna*;
- A concentração de 0,0001 mg L⁻¹ de DEET não apresentou citotoxicidade para os lisossomos de hemócitos dos mexilhões;
- A radiação gama de ⁶⁰Co diminuiu em 47% o tempo de retenção do corante vermelho neutro em lisossomos de hemócitos do organismo teste;
- Observou-se efeito sinérgico em organismos irradiados com 107 Gy e expostos à 0,001 e 0,02 mg L⁻¹ de DEET a partir da análise da integridade da membrana lisossômica, foi observado rompimento celular e mortalidade de organismos;
- A concentração letal de DEET encontrada para mexilhões *Perna perna* foi de 114,27 mg L⁻¹, porém concentrações na ordem de 1 – 20 µg L⁻¹ apresentaram-se citotóxicas para o organismo, o que mostra que o composto causa efeito sobre a biota aquática. O que implica em maior rigor quanto às concentrações utilizadas em produtos comercialmente disponíveis, e o monitoramento do descarte do composto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade de sedimento do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil.** . 2002. 322 Doutorado USP - : Universidade de São Paulo

ANDERSON, P. G.-L., J.; BERESFORD, N. A.; COPPLESTONE, D.; HOWARD, B. J. H., P.; OUGHTON, D.; WHITEHOUSE, P. Protection of the environment from ionizing radiation in a regulatory context (protect): proposed numerical benchmark values. **Journal of Environmental Radioactivity.**, v. 100, p. 100-1108, 2009.

ANDERSON, S. L., HARRISON, F.L.,. **Effects of radiation on aquatic organisms and radiobiological methodologie for effects assessment.** Office of Radiation Programs, United States Environmental Protection Agency (USEPA) 1986

ANTONOPOULOU, M. G., A.; DELIGIANNAKIS, Y.; KONSTANTINOU I. Kinetic and mechanistic investigation of photocatalytic degradation of the N,Ndiethyl-m-toluamide. . **Chemical Engineering Journal.** , 2013.

ANTONOPOULOU, M. K., I. Optimization and modeling of the photocatalytic degradation of the insect repellent, DEET in aqueous TiO₂ suspensions, Clean Soil, Air, Water. 2013.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Câmara Técnica de Cosméticos. Utilização do DEET em preparações de repelentes para insetos.** 2006

ARAGÃO, M. A. A., R. P. A. . **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos.** In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). . 2006.

BALONOV, M. L., G.; LOUVAT, D.; ROBINSON, C.; CABIANCA, T. The IAEA standards for the radioactive discharge control: Present status and future development. **Radioprotection**, v. 40, p. S721-S726, 2005.

BARBER, L. B. K., STEFFANIE H.; BROWN, GREG K.; FURLONG, EDWARD T.; GRAY, JAMES L.; KOLPIN, DANA W.; MEYER, MICHAEL T.; SANDSTROM, MARK W.; ZAUGG, STEVEN D. Persistence and Potential Effects of Complex Organic Contaminant Mixtures in Wastewater-Impacted Streams. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 5, p. 2177-2188, 2013.

BAYNE, B. L. **Marine mussels: their ecology and physiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. 506.

BERGONIE, J., TRIBONDEAU, L. Interpretation de quelques resultats de la radiotherapie et essai de fixation d'une technique rationelle. **CR Acad. Sci.**, n. 143, p. 983–985., 1906.

BIDWELL JR FAU - BECKER, C. B. C. F.-H., STEVE; HENSLEY S FAU - STARK, RICHARD; STARK R FAU - MEYER, MICHAEL T.; MEYER, M. T. Occurrence of organic wastewater and other contaminants in cave streams in northeastern Oklahoma and northwestern Arkansas. **Arch Environ Contam Toxicol.**, n. 1432-0703 (Electronic), p. 286-98., 2010.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature.**, n. 447, p. 396–398., 2007.

BLAISE, C. **Introduction to ecotoxicological concepts. Proceedings of Biological Testing and Harzard Assessment**. . Environmental Canada, p.11-47. 1982

BLAYLOCK, B. G., FRANK, M.L., O'NEAL, B.R. **Methodology for estimating radiation dose rates to freshwater biota exposed to radionuclides in the environment**. United States Dept. of Energy (USDOE). 1993

BOUTONNET, J.-C., THOMPSON, R.S., DE ROOIJ, C., GARNY, V., LECLOUX, A., VAN WIJK, D. 1,4-dichlorobenzene marine risk assessment with special reference to the osparcom region: north Sea. **Environ. Monit. Assess.**, n. 97, p. 103–117, 2004.

BRAUSCH, J. M. G., RAND, M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere.**, v. 82, p. 1518–1532, 2011.

BRAUSCH, J. M. R., G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere.**, v. 82, p. 1518-1532, 2011.

BROOKE, L. T., CALL, D.J., GEIGER, D.L., NORTHCOTT, C.E.,. **Acute Toxicities of Organic Chemicals to Fathead Minnows (*Pimephales promelas*)**. Center for Lake Superior Environmental Studies, Superior, WI. 1984.

BROOKE, W. B. R., R. M. Review: Tick repellents: Past, present, and future. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, p. 63–79, 2010.

BROOKS, A. L. Developing a scientific basis for radiation risk estimates: goal of the DOE low dose research program. **Health Phys.**, n. 85 (1), p. 85–93., 2003.

BROWN M FAU; HEBERT, A. A. Insect repellents: an overview. n. 0190-9622 p. 243-9., 1997.

BRUNST, V. V. Effects of ionizing radiation on the development of amphibians. **Q. Rev. Biol.**, n. 40, p. 1-67, 1965.

BUDAVARI, S. **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., p.584. 1996

BURATINI, S. V. B., E. **Análise estatística. In: Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações. ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.** 2006.

CAIRNS, J. J. N., B. R. **Ecological Toxicity Testing**. Boca Raton: Lewis Publishers: 228 p. 1995.

CALZA, P. M., C.; RASO, E.; GIANCOTTI, V.; MINERO, C. N,N-diethyl-m-toluamide transformation in river waters. **Sci. Total Environ.** , v. 409, p. 3894-3901., 2011.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - Relatórios de Balneabilidade de Praias 2013. Disponível em:

< <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/25-publicacoes/-relatorios> >.

Acesso em: 19 de Fevereiro.

CHANEY, L. A., WINEMAN, R.W., ROCKHOLD, R.W., HUME, A.S., Acute effects of an insect repellent, N,N-diethyl-m-toluamide, on cholinesterase inhibition induced by pyridostigmine bromide in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, n. 165, p. 107–114., 2000.

CHEUNG, V. V., WEDDERBURN, R.J. & DEPLEDGE, M.H. . Molluscan lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of a pollution gradient in Tolo Harbor, Hong Kong. . **Mar. Env. Res.**, n. 46, p. 273-241. , 1997.

COMMITTEE., I. I. M. W. **International Mussel Watch Project: Initial Implementation Phase, final report**

Woods Hole Oceanographic Institution, Coastal Research Center, Woods Hole, MA., 1995

CORDY, G. E. D., NORMA L.; BOUWER, HERMAN; RICE, ROBERT C.; FURLONG, EDWARD T.; ZAUGG, STEVEN D.; MEYER, MICHAEL T.; BARBER, LARRY B.; KOLPIN, DANA W. Do Pharmaceuticals, Pathogens, and Other Organic Waste Water Compounds Persist When Waste Water Is Used for Recharge? **Ground Water Monitoring & Remediation**, v. 24, n. 2, p. 58-69, 2004.

COSGROVE, G. E. Reptilian radiobiology. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n. 159, p. 1678–1684., 1971.

COSTANZO, S. D., WATKINSON, A.J., MURBY, E.J., KOLPIN, D.W., SANDSTROM, M.W., Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-mtoluamide) commonly found in aquatic environments? **Sci. Total Environ.**, n. 384, p. 214–220., 2007.

DELISTRATY, D. Radioprotection of nonhuman biota. **Journal of Environmental Radioactivity**, n. 99, p. 1863–1869, 2008.

DEPLEDGE, M. H. **Nondestructive Biomarkers in Vertebrates (M. C. Fossi & C. Leonzio, eds.)** Boca Raton, FL, USA. : Lewis Publishers, 1993. 271-285. .

DOGAN EB FAU - AYRES, J. W. A. J. F.-R., P. A.; ROSSIGNOL, P. A. Behavioural mode of action of deet: inhibition of lactic acid attraction. 1999.

DONOHUE, D. L. Strengthening IAEA safeguards through environmental sampling and analysis. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 271-273, p. 11-18, 1998.

DOWD, S. B. T., E.R. **Practical radiation protection and applied radiobiology.** Philadelphia, P.A.: Saunders Company. 1999

DOWNS, J. A., NUSSENZWEIG, M.C., NUSSENZWEIG, A.,. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. **Nature.**, n. 447, p. 951–958., 2007.

ECHA. **European Chemicals Agency - Guidance on information requirements and chemical safety assessment.** 2010

EDITORIAL. The international conference on radioecology and environmental radioactivity. **Journal of Environmental Radioactivity.**, n. 100 p. 999-1001., 2009.

EISLER, R. **Radiation Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review.** National Biological Service, United States Department of Interior, Washington, DC, USA. Contam. Haz. Rev. Rep. 29. 1994

FAJARDO, L. F. N., M.; ANDERSON, R. E. **Radiation pathology.** New York. NY. Oxford. 2001

FERREIRA, J. F. M., A. R. M. . **Desenvolvimento de cultivo de mexilhões em Santa Catarina (sul do Brasil).** . In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIAS DEL MAR. Mar del Plata, Argentina.: 80 p. 1995.

FOSSI, M. C. S., C.; CASINI, S. . Mixed function oxidase induction in *Carcinus aestuarii*. Field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due to Mediterranean contaminants. . **Comp. Biochem. Physiol.** , v. 121, p. 321-331. 1998.

FOWLER, S. W. Radionuclide bioaccumulation patterns in marine organisms. . In: AGENCY., I. I. A. E., Protection of the environment from the effects of ionizing radiation. , 2003, Proceedings of an International Conference Stockholm, 6 –10 October.p.548.

FRADIN, M. S. D., J. F. . Comparative Efficacy of Insect Repellents against Mosquito Bites. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 1, p. 13-18, 2002.

FREIRE, M. M. S., V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. . Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. . **Oecol. Bras.** , v. 12, n. 3, p. 347-354, 2008.

GERASKIN, S. A., EVSEEVA, T.I., BELYKH, E.S., MAJSTRENKO, T.A., MICHALIK, B., TASKAEV, A.I. Effects on non-human species inhabiting areas with enhanced level of natural radioactivity in the north of Russia: a review. **J. Environ. Radioact**, n. 94, p. 151–182., 2007.

GETOFF, N. Radiation-induced degradation of water pollutants-state of the art. **Radiation Physics and Chemistry**., v. 47., p. 581-593., 1996.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. B., E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos**. CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental São Paulo, SP. 1990

GLASSMEYER, S. T. F., E.T.; KOLPIN, D.W.; CAHILL, J.D.; ZAUGG,; S.D.; WERNER, S. L. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. **Environmental Science Technology**., v. 39, p. 5157–5169., 2005.

GRYBOSKI, J. W., D.; ORDWAY. N. K. . Toxic encephalopathy apparently related to the use of insect repellent. . **N. Engl. J. Med.**, v. 264, p. 289-291, 1961.

HALL, S. A. G., N.; BEROZA, M. Insect repellent. **J. Agr. Food. Chem.**, v. 5, p. 663-667, 1957.

HAMILTON, M. A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. **Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays.** Environmental Science & Technology., p.714-719. 1977

HIGLEY, K. A. **Effects of radioactivity on plants and animals.** CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p.209-224. 2007

HINTON, T. G. **Risks from exposure to radiation.** 2nd ed. CRC Press/ Lewis Publishers. Boca Raton, FL., p.303-304. 2003

HODGSON, E. A Textbook of Modern Toxicology. **John Wiley & Sons**, 2004.

HOFFMAN, D. J. B., A.; RATTNER, G.; BURTON, A. J.; CAIRNS, J. J. **Handbook of Ecotoxicology.** 2nd ed. CRC Press., 2002.

HOFFMANN, E. J. M., J. R. . Reassessment of the role and utility of wind in suppression of mosquito (Diptera: Culicidae) host finding: stimulus dilution supported over flight limitation. 2003.

IAEA. **International Atomic Energy Agency - Effects of ionizing radiation on aquatic organisms and ecosystems.** Vienna, Austria. 1976

IAEA. **International Atomic Energy Agency - Methodology for assessing impacts of radioactivity on aquatic ecosystems.** 1979

IAEA. **International Atomic Energy Agency - Effects of ionizing radiation on plants and animals at levels implied by current radiation protection standards.** 1992

IAEA. **International Atomic Energy Agency - Measures to strengthen international cooperation in nuclear, radiation and transport safety and waste management.** 2005

ICRP. **International Commission on Radiological Protection - Recommendations of the International Commission on Radiological Protection.** 1991

ICRP. **International Commission on Radiological Protection - A framework for assessing the impact of ionizing radiation on non-human species.** 2003

ICRP. **International Commission on Radiological Protection - Draft recommendations of the international commission on radiological protection.** 2007

IRVINE, C., SAMPLE, B. **A Review and Analysis of Ecological Dose-effects from Radiation Exposure.** DOE/RL-2005-40, Draft A, Richland, WA, USA. 2005

KENDALL, R. J. A., T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T.; HOOPER, M. J.; MARTIN, C. F.; MCMURRY, S. T.; PATINO, R.; SMITH, E. E.; THEODORAKIS, W. **Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons.** 6th ed., MacGraw-Hill: New York: 2001.

KING, R. Rapid assesment of marine pollution – Biological techniques. . **Plymouth Environmental Research Center**, p. 37, 2000.

KOLPIN, D. W., FURLONG, E.T., MEYER, M.T., THURMAN, E.M., ZAUGG, S.D., BARBER, L.B., BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 1202–1211., 2002.

KOLPIN, D. W. S., M.; MEYER, M.T.; FURLONG, E.T.; ZAUGG, S.D. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. **Science of the Total Environment.**, n. 328, p. 119-130., 2004.

KOTURBASH, I., RUGO, R.E., HENDRICKS, C.A., LOREE, J., THIBAUT, B., KUTANZI, K., POGRIBNY, I., YANCH, J.C., ENGLEWARD, B.P., KOVALCHUK,

O. Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue in vivo. **Oncogene** **25**, p. 4267–4275., 2006.

LEBOWITZ, H., YOUNG, R., KIDWELL, J., MCGOWAN, J., LANGLOSS, J., BRUSICK, D. DEET (N,N-diethyltoluamide) does not affect sperm number, viability, and head morphology in male rats treated dermally. **Drug Chem. Toxicol.**, v. 6, p. 379–395., 1983.

LEONZIO, C. F., M. C. . **Nondestructive biomarkers strategy: perspectives and applications**. Lewis Publ., London, p.297-312. . 1993

LITTLE, A. D. **Development of Candidate Chemical Simulant List: The Evaluation of Candidate Chemical Simulants Which May Be Used in Chemically Hazardous Operations**. . Air Force Aero Med Res Lab, Wright-Patterson AFB, OH, AFAMRL-TR-82-87. . 1982

LOWE, D. M. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. . **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, n. 46, p. 91-100. , 1988.

LOWE, D. M., FOSSATO, V.U, & DEPLEDGE, M.H. Contaminant –induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from Venice lagoon: an in vitro study. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, n. 129, p. 189-196, 1995.

LOWE, D. M. M., M. N. & EVANS, B. M. . Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from Lab. *Limanda limanda*. **Marine Ecology Progress Series**, n. 91, p. 135-140. , 1992.

LOWE, D. M. P., R. K. . Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. . **Aquatic Toxicology**, v. 30, p. 357-365, 1994.

MAGNUSSON, M. H., K.; RIDD, M.; NEGRI, A. P. Pesticide contamination and phytotoxicity of sediment interstitial water to tropical benthic Microalgae. . **Water Research**, 2013.

MAYER FLJ, E. M. **Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals.** U.S.Dep.Interior, Fish Wildl.Serv. (USGS Data File). 1986

MELLINGER, P. J., SCHULTZ, V. Ionizing radiation and wild birds: a review. **Crit. Rev. Environ. Control** 5,, p. 397–421, 1975.

METTLER JUNIOR, F. A. U., A.C. Medical effects of ionizing radiation. **2nd ed. Philadelphia, P.A. Saunders Company**, 1995.

MICHAEL A. G., G. G. S. Toxicity of the repellent DEET (N,N-Diethyl Metatoluamide) to *Gambusia affinis* (Baird and Girard). . **Mosq News** n. 34, p. 32-35, 1974.

MILLER, J. D. Anaphylaxis associated with insect repellent. . **N. Engl. J. Med.**, v. 307, p. 1341-1342, 1982.

MIRANDA, M. C. **Desenvolvimento de lipossoma com produto repelente de insetos e metodologia analítica.** 2005. UFRJ/ FF, Rio de Janeiro.

MOORE, M. N. Cellular responsesto pollutants. **Mar Pollut Bull**, v. 16, p. 134-139, 1985.

MOORE, M. N., VIARENGO, A. Lysosomal membrane fragility and catabolism of cytosolic proteins: evidence for a direct relationship. **Experientia** n. 43, p. 320-323.1987.

MOTHERSILL, C., BUCKING, C., SMITH, R.W., AGNIHOTRI, N., O'NEILL, A., KILEMADE, M., SEYMOUR, C.B. Communication of radiation-induced stress or bystander signals between fish in vivo. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, p. 6859–6864., 2006.

NCRP. **National Council on Radiation Protection and Measurements. Effects of ionizing radiation on aquatic organisms.** Bethesda, MD. Report nº 109., p.115. 1991

NICHOLSON, S. Ecotoxicological and toxicological responses to cooper in *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes. . **Chemosphere.** , v. 45, p. 339-407, 2001.

O'BRIEN, R. D., WOLFE, L.S. **Nongenetic effects of radiation. In: Radiation. Radioactivity and Insects.** New York, USA. Academic Press, p.23-54. 1964

OLIVI, P. C., C. R.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. . A TOXICIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS: DISCUSSÃO E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

PALUCH, G. B., L.; COATS J. Mosquito repellents: a review of chemical structure diversity and olfaction. . **Society of Chemical Industry**, 2010.

PEDROSA, R. C. G., R.; WILHELM FILHO, D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox Report, Associação Brasileira de Divulgação Científica**, p. 265- 271. , 2001.

PENTREATH, R. J. Radioecology, radiobiology and radiological protection: frameworks and fractures. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 100, p. 1019-1026., 2009.

PEREIRA, C. D. S. A., D. M. DE S.; BAINY, A. C. D.; ZARONI, L. P.; GASPARRO, M. R.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; FURLEY, T. H.; SOUSA, E. C. P. M. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. . **Environmental toxicology and chemistry - SETAC**, v. 26(3), p. 462-469. , 2007.

PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. . **Can J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60, p. 1010-1016., 1982.

POLIKARPOV, G. G. Conceptual model of responses of organisms, populations, and ecosystems to all possible dose rates of ionising radiation in the environment. **Radiat. Prot. Dosimet**, v. 75, n. (1-4), p. 181–185., 1998.

QIU, J. Epigenetics: unfinished symphony. **Nature.**, v. 441, p. 143-145, 2006.

RAND, G. M. W., P. G.; MCCARTY, L. S. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment.** 2nd. Ecological Services Inc. North Palm Beach, FL., 1995. 1125.

RESGALLA JR., C. L., K. S. . Sensibilidade dos Organismos Marinhos Utilizados em Testes de Toxicidade no Brasil. . **NOTAS TÉC. FACIMAR**, v. 6, n. 153-163, 2002.

RIBO, J. M. **Environ. Toxicol. Water Qual.** v. 12, p. 283, 1997.

ROSE, K. S. B. Lower limits of radiosensitivity in organisms excluding man. **J. Environ. Radioact.**, v. 15, n. 113-133, 1992.

SALOMÃO, L. C. M., A. R. M.; LUNETTA, J. E. Influência da salinidade na sobrevivência de Perna perna. **Bol. Fisiol. Animal Univ. São Paulo**, v. 4, p. 143-152, 1980.

SANDSTROM, M. W. K., D.W.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D. Widespread detection of N,N-diethyl-m-toluamide in U.S. Streams: Comparison with concentrations of pesticides, personal care products, and other organic wastewater compounds. **Environ. Toxicol. Chem.** , v. 24, p. 1029–1034., 2005.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, p. 48-53, 1999.

SEO, J., LEE, Y.G., KIM, S.D., CHA, C.J., AHN, J.H., HUR, H.G. Biodegradation of the insecticide N,N-diethyl-m-toluamide by fungi: identification and toxicity of metabolites. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 48, p. 323–328., 2005.

SHERMAN, J. L. J. Development of a systemic insect repellent. **J. Amer. Med. Assoc.**, v. 196, p. 256-258, 1966.

SINGH, S. P. A., A.; CHAUDHARY, A.; KHAN, S.; WILLETT, K.L.; GARDINALI, P.R. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. **Ecotoxicology.**, n. 19, p. 338-350., 2010.

SPURGEON, D. J., RICKETTS, H., SVENDSEN, C., MORGAN, A.J., KILLE, P. Hierarchical responses of soil invertebrates (earthworms) to toxic metal stress. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, p. 5327–5334., 2005.

TAY, K. S. R., N.A.; ABAS, M.R. Degradation of DEET by ozonation in aqueous solution. **Chemosphere.**, v. 76, p. 1296-302., 2009.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. . **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 1, p. 151-173, 1977.

UNEP. **United Nations Environment Programme - Report of the meeting of experts to review the MEDPOL biomonitoring programme.** Athens, Greece: UNEP- (OCA) / MEDWG., p.132-137. . 1997

UNSCEAR. **Sources and Effects of Ionizing Radiation. Scientific Annex: Effects of Radiation on the Environment.** United Nations, New York, USA. 1996

USEPA. **United States Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision (RED) DEET. Prevention, pesticides and toxic substances.**, p.134. 1998

USEPA. **United States Environmental Protection Agency. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.**, p.266. 2002

USEPA. **United States Environmental Protection Agency. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.**, p.335. 2002

VOLKLE, H. Radiation protection of environment under the light of the new concept of radiation protection of non-human species. **ICRP Second European Congress, Paris, France.**, 2006.

WALKER, C. H. H., S. P.; SIBLY, R. M. & PEAKALL, D. B. . **Principles of ecotoxicology.** . London, UK: Taylor & Francis., 1996. 321.

WEEKS, J. A. G., P. D.; NIKIFOROV, A. I. . Assessment of the Environmental Fate and Ecotoxicity of N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET). . **Integrated Environmental Assessment and Management.** , v. 8, n. 1, p. 120-134., 2011.

WEIGEL, S. B., U.; JENSEN, E.; KALLENBORN, R.; THORESEN, H.; HÜHNERFUSS, H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and sweater from Tromsø/ Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. **Chemosphere.**, n. 56, p. 583-592., 1994.

WEIGEL, S. K., JAN; HÜHNERFUSS, HEINRICH Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. **Science of The Total Environment**, v. 295, n. 1–3, p. 131-141, 2004.

WEST, I. G., D. **Western Ecosystems Technology. TOXSTAT 3.4** 1994.

WHICKER, F. W. **Impacts on plant and animal populations. In: Health Impacts of Large Releases of Radionuclides.** Ciba Foundation Symposium 203. John Wiley & Sons, p.74–88. 1997

WHICKER, F. W. S., V. Radioecology: Nuclear energy and environment. **CRC Press. Boca Raton, FL.**, n. 212(1), p. 228, 1982.

WICHTERMAN, R. Biological effects of ionizing radiation on protozoa: some discoveries and unsolved problems. **Bioscience**, v. 22, p. 281–289., 1972.

WILSON, D. C. J.-L., T. L. **Emerging Contaminant Sources and Fate in Recharged Treated Wastewater, Lake Havasu City, Arizona.** U.S. Environmental Protection Agency. Office of Research and Development, National Exposure Research Laboratory. Las Vegas, NV 2013

YU, M.-H. **Environmental Toxicology.** CRC Press. Boca Raton. 2005

ZAGATTO, P. A. B., E. . **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.** . São Carlos, SP. : Rima, 2006.

ZAKRZEWSKI, S. F. Principles of Environmental Toxicology. **American Chemical Society: Washington**, 1994.

ZARONI, L. P. A., D. M. S.; RACHID, B. R. F. AND SOUSA, E. C. P. M. **Diferenças no estado fisiológico de adultos e na viabilidade de embriões do mexilhão Perna perna provenientes de duas populações coletadas em Ubatuba - SP.** . São Paulo: Arte & Ciência Villipres., p.15-25. 2001

Ensaio 1 CL50₍₇₂₎ para o DEET

```
ARE THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH CONCENTRATION EQUAL(Y/N)? Y  
ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH CONCENTRATION: 5  
ENTER UNITS FOR DURATION OF EXPERIMENT(HOURS,DAYS,ETC.): HOURS  
ENTER DURATION OF TEST: 72  
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:  
  
WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION(Y/N)? Y  
  
DATE: 23.01.80             TEST NUMBER: 1                DURATION: 72 HOURS  
CHEMICAL: DEET              SPECIES: PERNA PERNA  
  
RAW DATA:  
CONCENTRATIONS< ng L>      75.00 100.00 150.00 200.00 300.00 400.00  
NUMBER EXPOSED:               5       5         5        5        5        5  
MORTALITIES:                   0       1         5         5         5        5  
SPEARMAN-KÄRBER TRIM:          0.00%  
  
SPEARMAN-KÄRBER ESTIMATES:    LC50:           114.27  
95% LOWER CONFIDENCE:         100.95  
95% UPPER CONFIDENCE:         129.36
```

```
ARE THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH CONCENTRATION EQUAL(Y/N)? Y
ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH CONCENTRATION: 5
ENTER UNITS FOR DURATION OF EXPERIMENT(HOURS,DAYS,ETC.): HOURS
ENTER DURATION OF TEST: 72
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:
0000000000
WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION(Y/N)? Y

DATE: 30.01.20          TEST NUMBER: 2          DURATION: 72 HOURS
CHEMICAL: DEET          SPECIES: PERNA PERNA

RAW DATA:
CONCENTRATION( mg L)      75.00 100.00 150.00 200.00 300.00 400.00
NUMBER EXPOSED:           5       5       5       5       5       5
MORTALITIES:              0       2       4       5       5       5
SPEARMAN-KÄRBER TRIM:    0.00%

SPEARMAN-KÄRBER ESTIMATES: LCS0:         114.27
                          95% LOWER CONFIDENCE:   93.93
                          95% UPPER CONFIDENCE:   139.02
```

```

ARE THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH CONCENTRATION EQUAL(Y/N)? Y
ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH CONCENTRATION: 5
ENTER UNITS FOR DURATION OF EXPERIMENT(HOURS,DAYS,ETC.): HOURS
ENTER DURATION OF TEST: 72
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
10
```


APÊNDICE C – Resultados dos ensaios preliminares de citotoxicidade do DEET em organismos não irradiados obtidos por meio do software TOXSTAT 3.4 (GULLEY, D.D. et al. 1991).

I ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 24 horas

```

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv Transform: NO TRANSFORM

=====
t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 66.0000 CALCULATED t VALUE = -0.5774
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 69.0000 DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = -3.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 <2>, 8> = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 <2>, 8> = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01
=====
vn prelin I
File: vn prelin I DEET Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
=====
EXPECTED 1.340 4.840 7.640 4.840 1.340
OBSERVED 0 5 9 5 1
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 1.6789
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

vn prelin I
File: vn prelin I DEET Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality
=====
D = 720.000
U = 0.934
Critical U <P = 0.05> (n = 20) = 0.905
Critical U <P = 0.01> (n = 20) = 0.868
=====
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

vn prelin I
File: vn prelin I DEET Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
=====
These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.
Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.

vn prelin I
File: vn prelin I DEET Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION N MIN MAX MEAN
1 controle 5 60.000 75.000 66.000
2 50.0 5 0.000 0.000 0.000
3 1.0 5 0.000 15.000 3.000
4 0.02 5 15.000 30.000 24.000
=====
vn prelin I
File: vn prelin I DEET Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION VARIANCE SD SEM C.U. %
1 controle 67.500 8.216 3.674 12.45
2 50.0 0.000 0.000 N/A
3 1.0 45.000 6.708 223.61
4 0.02 67.500 8.216 3.674 34.23
=====
vn prelin I
File: vn prelin I DEET Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION TRANSFORMED RANK CRIT. df SIG
MEAN SUM VALUE
1 controle 66.000 15.00 17.00 5.00 *
2 50.0 0.000 15.00 17.00 5.00 *
3 1.0 3.000 15.00 17.00 5.00 *
4 0.02 24.000 15.00 17.00 5.00 *
=====
Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

```

I ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 48 horas

```

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv Transform: NO TRANSFORM

=====
t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 66.0000 CALCULATED t VALUE = -0.5774
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 69.0000 DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = -3.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 <2>, 8> = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 <2>, 8> = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01
=====

```

```

vn prelim I
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED    1.340      4.840      7.640      4.840      1.340
OBSERVED     0         5         12         3         0
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 5.8730
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

vn prelim I
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORMATION
Shapiro - Wilk's test for normality
-----
D = 900.000
W = 0.883
Critical W (P = 0.05) (n = 20) = 0.905
Critical W (P = 0.01) (n = 20) = 0.868
-----
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

vn prelim I
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----
These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.
Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.

vn prelim I
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
-----
GRP IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
1      controle     5    60.000  75.000  66.000
2      50.0         5     0.000   0.000   0.000
3      1.0          5     0.000   0.000   0.000
4      0.02         5    15.000  45.000  27.000
-----

vn prelim I
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
-----
GRP IDENTIFICATION  VARIANCE  SD    SEM    C.V. %
1      controle     67.500   8.216  3.674  12.45
2      50.0         0.000   0.000  0.000  N/A
3      1.0          0.000   0.000  0.000  N/A
4      0.02        157.500  12.550  5.612  46.48
-----

vn prelim I
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORMATION
STEEL'S MANY-ONE RANK TEST      -      Ho:Control(Treatment)
-----
GROUP IDENTIFICATION  TRANSFORMED  RANK  CRIT.  df    SIG
                        MEAN    SUM    VALUE
1      controle     66.000    15.00  17.00  5.00  *
2      50.0         0.000    15.00  17.00  5.00  *
3      1.0          0.000    15.00  17.00  5.00  *
4      0.02        27.000    15.00  17.00  5.00  *
-----
Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

```

I ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 72 horas

```

vermelho neutro controle-solvente
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORM
-----
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 (SOLVENT CRIT.) MEAN = 66.0000    CALCULATED t VALUE = 0.6325
GRP2 (BLANK CRIT.) MEAN = 63.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 3.0000
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01

vn prelim I
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED    1.340      4.840      7.640      4.840      1.340
OBSERVED     1         3         11         5         0
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.6088
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

vn prelim I
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORMATION
Shapiro - Wilk's test for normality
-----
D = 990.000
W = 0.822
Critical W (P = 0.05) (n = 20) = 0.905
Critical W (P = 0.01) (n = 20) = 0.868
-----
Data FAIL normality test. Try another transformation.
Warning - The first three homogeneity tests are sensitive to non-normal
data and should not be performed.

vn prelim I
File: vn prelim I DEET      Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----
These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.
Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.

```

vn preliminar I
File: vn preliminar I DEET Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	66.000
2	50.0	5	0.000	0.000	0.000
3	1.0	5	0.000	0.000	0.000
4	0.02	5	0.000	30.000	21.000

vn preliminar I
File: vn preliminar I DEET Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	67.500	8.216	3.674	12.45
2	50.0	0.000	0.000	0.000	N/A
3	1.0	0.000	0.000	0.000	N/A
4	0.02	100.000	13.416	6.000	63.89

vn preliminar I
File: vn preliminar I DEET Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	controle	66.000				
2	50.0	0.000	15.00	17.00	5.00	*
3	1.0	0.000	15.00	17.00	5.00	*
4	0.02	21.000	15.00	17.00	5.00	*

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

II ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 24 horas

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 60.0000 CALCULATED t VALUE = 1.2649
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 63.0000 DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 6.0000

TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	1	7	4	8	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 6.1876
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 990.000
W = 0.843
Critical W <P = 0.05> <n = 20> = 0.905
Critical W <P = 0.01> <n = 20> = 0.868

Data FAIL normality test. Try another transformation.

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance

Calculated H statistic <max Var/min Var> = 1.50
Closest, conservative, Table H statistic = 49.0 <alpha = 0.01>

Used for Table H ==> R <# groups> = 4, df <# reps-1> = 4
Actual values ==> R <# groups> = 4, df <# avg reps-1> = 4.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.21

Table Chi-square value = 11.34 <alpha = 0.01, df = 3>
Table Chi-square value = 7.81 <alpha = 0.05, df = 3>

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	69.000
2	0.5	5	0.000	15.000	6.000
3	0.02	5	15.000	30.000	27.000
4	0.001	5	30.000	45.000	39.000

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	67.500	8.216	3.674	11.91
2	0.5	67.500	8.216	3.674	136.93
3	0.02	45.000	6.708	3.000	24.85
4	0.001	67.500	8.216	3.674	21.07

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	69.0000	69.0000		
2	0.5	6.0000	6.0000	12.663	*
3	0.02	27.0000	27.0000	8.442	*
4	0.001	39.0000	39.0000	6.030	*

Dunnett table value = 2.23 <1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3>

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.5	5	11.094	16.1	63.000
3	0.02	5	11.094	16.1	42.000
4	0.001	5	11.094	16.1	30.000

II ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 48 horas

vermelho neutro cont-solo
File: vn cont-solo Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	63.0000	CALCULATED t VALUE =	-0.6325
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	66.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	-3.0000		

TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	1	3	12	2	2

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 5.2655
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 810.000
U = 0.898
Critical U (P = 0.05) (n = 20) = 0.905
Critical U (P = 0.01) (n = 20) = 0.868

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 1.50
Closest, conservative, Table H statistic = 49.0 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 4
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 4.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance

Calculated B1 statistic = 0.24

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	63.000
2	0.5	5	0.000	15.000	6.000
3	0.02	5	30.000	45.000	33.000
4	0.001	5	30.000	45.000	42.000

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	45.000	6.708	3.000	10.65
2	0.5	67.500	8.216	3.674	136.93
3	0.02	45.000	6.708	3.000	20.33
4	0.001	45.000	6.708	3.000	15.97

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	63.0000	63.0000		
2	0.5	6.0000	6.0000	12.667	*
3	0.02	33.0000	33.0000	6.667	*
4	0.001	42.0000	42.0000	4.667	*

Dunnett table value = 2.23 <1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3>

vn preliminar II
File: vn preliminar II Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.5	5	10.035	15.9	57.000
3	0.02	5	10.035	15.9	30.000
4	0.001	5	10.035	15.9	21.000

II ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 72 horas

```

vermelho neutro cont-solv
File: vn deet02 Transform: NO TRANSFORMATION

=====
t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN = 63.0000 CALCULATED t VALUE = -0.6325
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN = 66.0000 DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = -3.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 <2>, 8> = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 <2>, 8> = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn prelim II
File: vn prelim II Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
EXPECTED 1.340 4.840 7.640 4.840 1.340
OBSERVED 0 5 11 3 1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.6008
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn prelim II
File: vn prelim II Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 1000.000
W = 0.939
Critical W <P = 0.05> <n = 20> = 0.985
Critical W <P = 0.01> <n = 20> = 0.868

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

vn prelim II
File: vn prelim II Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance

These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.

vn prelim II
File: vn prelim II Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP IDENTIFICATION N MIN MAX MEAN
1 controle 5 60.000 75.000 63.000
2 0.5 5 0.000 15.000 6.000
3 0.02 5 15.000 15.000 15.000
4 0.001 5 15.000 15.000 27.000

vn prelim II
File: vn prelim II Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP IDENTIFICATION VARIANCE SD SEM C.U. %
1 controle 45.000 6.708 3.000 10.65
2 0.5 67.500 8.216 3.674 136.93
3 0.02 0.000 0.000 0.000 0.00
4 0.001 157.500 12.550 5.612 46.40

vn prelim II
File: vn prelim II Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP IDENTIFICATION TRANSFORMED MEAN RANK SUM CRIT. VALUE df SIG
1 controle 63.000 15.00 17.00 5.00 *
2 0.5 6.000 15.00 17.00 5.00 *
3 0.02 15.000 15.00 17.00 5.00 *
4 0.001 27.000 15.00 17.00 5.00 *

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

```

III ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 24 horas

```

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv Transform: NO TRANSFORM

=====
t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN = 63.0000 CALCULATED t VALUE = 0.5345
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN = 66.0000 DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 3.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 <2>, 8> = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 <2>, 8> = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
EXPECTED 1.340 4.840 7.640 4.840 1.340
OBSERVED 2 0 16 0 2

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 19.4780
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277

Data FAIL normality test. Try another transformation.

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 720.000
W = 0.871
Critical W <P = 0.05> <n = 20> = 0.985
Critical W <P = 0.01> <n = 20> = 0.868

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance

Calculated H statistic <max Var/min Var> = 1.00
Closest, conservative, Table H statistic = 49.0 <alpha = 0.01>

Used for Table H ==> R <# groups> = 4, df <# reps-1> = 4
Actual values ==> R <# groups> = 4, df <# avg reps-1> = 4.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

```


vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = -0.00

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	63.000
2	0.02	5	15.000	30.000	27.000
3	0.001	5	30.000	45.000	33.000
4	0.0001	5	45.000	60.000	57.000

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	45.000	6.708	3.000	10.65
2	0.02	45.000	6.708	3.000	24.05
3	0.001	45.000	6.708	3.000	20.33
4	0.0001	45.000	6.708	3.000	11.77

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	63.000	63.000		
2	0.02	27.000	27.000	8.485	*
3	0.001	33.000	33.000	7.071	*
4	0.0001	57.000	57.000	1.414	

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16.3)

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.02	5	9.461	15.0	36.000
3	0.001	5	9.461	15.0	30.000
4	0.0001	5	9.461	15.0	6.000

III ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 48 horas

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	63.0000	CALCULATED t VALUE =	0.4082
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	60.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	3.0000		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	4	9	6	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.0922
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 720.000
W = 0.909

Critical W (P = 0.05) (n = 20) = 0.985
Critical W (P = 0.01) (n = 20) = 0.868

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance

These two tests can not be performed because at least one group has zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	63.000
2	0.02	5	45.000	60.000	54.000
3	0.001	5	30.000	30.000	30.000
4	0.0001	5	15.000	30.000	24.000

vn prelim III
File: vn prelim III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	45.000	6.708	3.000	10.65
2	0.02	67.500	8.216	3.674	15.21
3	0.001	0.000	0.000	0.000	0.00
4	0.0001	67.500	8.216	3.674	34.23

vn preliminar III
File: vn preliminar III Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	controle	63.000				
2	0.02	54.000	21.00	17.00	5.00	
3	0.001	30.000	15.00	17.00	5.00	*
4	0.0001	24.000	15.00	17.00	5.00	*

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

III ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 72 horas

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN	=	63.0000	CALCULATED t VALUE	=	0.0000
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN	=	63.0000	DEGREES OF FREEDOM	=	8
DIFFERENCE IN MEANS	=	0.0000			

TABLE t VALUE <0.05 <2>, 8> = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 <2>, 8> = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn preliminar III
File: vn preliminar III Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	3	14	2	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 9.0867
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn preliminar III
File: vn preliminar III Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 1260.000
W = 0.886
Critical W (P = 0.05) <n = 20> = 0.905
Critical W (P = 0.01) <n = 20> = 0.868

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

vn preliminar III
File: vn preliminar III Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance

These two tests can not be performed because at least one group has zero variance.
Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.

vn preliminar III
File: vn preliminar III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	63.000
2	0.02	5	15.000	15.000	15.000
3	0.001	5	15.000	45.000	27.000
4	0.0001	5	30.000	60.000	45.000

vn preliminar III
File: vn preliminar III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	45.000	6.708	3.000	10.65
2	0.02	0.000	0.000	0.000	0.00
3	0.001	157.500	12.550	5.612	46.48
4	0.0001	112.500	10.607	4.743	23.57

vn preliminar III
File: vn preliminar III Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	controle	63.000				
2	0.02	15.000	15.00	17.00	5.00	*
3	0.001	27.000	15.00	17.00	5.00	*
4	0.0001	45.000	17.00	17.00	5.00	*

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

IV ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 24 horas

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN	=	66.0000	CALCULATED t VALUE	=	0.6325
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN	=	63.0000	DEGREES OF FREEDOM	=	8
DIFFERENCE IN MEANS	=	3.0000			

TABLE t VALUE <0.05 <2>, 8> = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 <2>, 8> = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn preliminar IV
File: vn preliminar IV Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	1	5	8	5	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 0.2001
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

```

vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
Shapiro - Wilk's test for normality
-----
D =  980.000
W =    0.951
Critical U <P = 0.05> <n = 20> = 0.905
Critical U <P = 0.01> <n = 20> = 0.868
-----
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.
vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic <max Var/min Var> =    1.50
Closest, conservative, Table H statistic =   49.0 <alpha = 0.01>
Used for Table H ==>   R <# groups> =    4,   df <# reps-1> =    4
Actual values ==>   R <# groups> =    4,   df <# avg reps-1> =   4.00
-----
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =    0.30
-----
Table Chi-square value =   11.34 <alpha = 0.01, df =  3>
Table Chi-square value =    7.01 <alpha = 0.05, df =  3>
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N      MIN      MAX      MEAN
-----
1      controle      5      60.000    75.000    66.000
2      0.02           5      15.000    30.000    27.000
3      0.001           5      30.000    45.000    33.000
4      0.0001          5      45.000    60.000    54.000
-----
vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD      SEM      C.U. %
-----
1      controle      67.500    8.216    3.674    12.45
2      0.02           45.000    6.708    3.000    24.85
3      0.001           45.000    6.708    3.000    20.33
4      0.0001          67.500    8.216    3.674    15.21
-----
vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST  -  TABLE 1 OF 2  Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED MEAN  MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS  T STAT  SIG
-----
1      controle      66.000    66.000
2      0.02           27.000    27.000    8.222  *
3      0.001           33.000    33.000    6.957  *
4      0.0001          54.000    54.000    2.530  *
-----
Dunnett table value =  2.23  <1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3>
vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST  -  TABLE 2 OF 2  Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  NUM OF REPS  Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>  % of CONTROL  DIFFERENCE FROM CONTROL
-----
1      controle      5
2      0.02           5      10.578    16.0    39.000
3      0.001           5      10.578    16.0    33.000
4      0.0001          5      10.578    16.0    12.000

```

IV ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 48 horas

```

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv      Transform: NO TRANSFORM
-----
t-test of Solvent and Blank Controls  Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN =   60.0000  CALCULATED t VALUE =   1.0000
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN =   54.0000  DEGREES OF FREEDOM =    8
DIFFERENCE IN MEANS =    6.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 <2>, 8> =  2.306  NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 <2>, 8> =  3.355  NO significant difference at alpha=0.01
-----
vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL  <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
-----
EXPECTED  1.340      4.840      7.640      4.840      1.340
OBSERVED   1         5         9         5         0
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   1.6789
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
Shapiro - Wilk's test for normality
-----
D = 1530.000
W =    0.916
Critical U <P = 0.05> <n = 20> = 0.905
Critical U <P = 0.01> <n = 20> = 0.868
-----
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.
vn prelim IU
File: vn prelim IU      Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic <max Var/min Var> =    3.50
Closest, conservative, Table H statistic =   49.0 <alpha = 0.01>
Used for Table H ==>   R <# groups> =    4,   df <# reps-1> =    4
Actual values ==>   R <# groups> =    4,   df <# avg reps-1> =   4.00
-----
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

```

vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
Bartlett's test for homogeneity of variance					
Calculated B1 statistic = 1.68					
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)					
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)					
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.					
vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2					
GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	45.000	75.000	60.000
2	0.02	5	15.000	45.000	27.000
3	0.001	5	30.000	45.000	42.000
4	0.0001	5	45.000	60.000	54.000
vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2					
GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	112.500	10.607	4.743	17.68
2	0.02	157.500	12.550	5.612	46.48
3	0.001	45.000	6.708	3.000	15.97
4	0.0001	67.500	8.216	3.674	15.21
vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	60.000	60.000		
2	0.02	27.000	27.000	5.336	*
3	0.001	42.000	42.000	2.910	*
4	0.0001	54.000	54.000	0.970	
Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)					
vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.02	5	13.792	23.0	33.000
3	0.001	5	13.792	23.0	18.000
4	0.0001	5	13.792	23.0	6.000

IV ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 72 horas

vermelho neutro cont-solv File: vn cont-solv Transform: NO TRANSFORM					
t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN					
=====					
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 66.0000 CALCULATED t VALUE = 0.0000					
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 66.0000 DEGREES OF FREEDOM = 8					
DIFFERENCE IN MEANS = 0.0000					
=====					
TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05					
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01					
vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies					
INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	1	3	12	2	2
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 5.2655					
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277					
Data PASS normality test. Continue analysis.					
vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
Shapiro - Wilk's test for normality					
=====					
D = 810.000					
W = 0.898					
Critical U (P = 0.05) (n = 20) = 0.985					
Critical W (P = 0.01) (n = 20) = 0.868					
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.					
vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
Hartley's test for homogeneity of variance					
=====					
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 1.50					
Closest, conservative, Table H statistic = 49.0 (alpha = 0.01)					
Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 4					
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 4.00					
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.					
vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
Bartlett's test for homogeneity of variance					
Calculated B1 statistic = 0.24					
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)					
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)					
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.					
vn preliminar IU File: vn preliminar IU Transform: NO TRANSFORMATION					
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2					
GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	66.000
2	0.02	5	15.000	30.000	18.000
3	0.001	5	15.000	30.000	18.000
4	0.0001	5	30.000	45.000	42.000

vn prelim IU
File: vn prelim IU Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controls	67.500	8.216	3.674	12.45
2	0.02	45.000	6.708	3.000	37.27
3	0.001	45.000	6.708	3.000	37.27
4	0.0001	45.000	6.708	3.000	15.97

vn prelim IU
File: vn prelim IU Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controls	66.000	66.000		
2	0.02	18.000	18.000	10.667	*
3	0.001	18.000	18.000	10.667	*
4	0.0001	42.000	42.000	5.333	*

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

vn prelim IU
File: vn prelim IU Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controls	5			
2	0.02	5	10.035	15.2	40.000
3	0.001	5	10.035	15.2	40.000
4	0.0001	5	10.035	15.2	24.000

V ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 24 horas

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	69.0000	CALCULATED t VALUE =	0.0000
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	69.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	0.0000		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn prelim U
File: vn prelim U Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	1	6	1	12	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 10.0672
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data FAIL normality test. Try another transformation.

vn prelim U
File: vn prelim U Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 1530.000
W = 0.784
Critical W (P = 0.05) (n = 20) = 0.905
Critical W (P = 0.01) (n = 20) = 0.868

Data FAIL normality test. Try another transformation.

vn prelim U
File: vn prelim U Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 2.67
Closest, conservative, Table H statistic = 49.0 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 4
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 4.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

vn prelim U
File: vn prelim U Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance

Calculated B1 statistic = 1.49

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn prelim U
File: vn prelim U Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controls	5	60.000	75.000	69.000
2	0.02	5	15.000	30.000	24.000
3	0.001	5	15.000	45.000	36.000
4	0.0001	5	45.000	60.000	54.000

vn prelim U
File: vn prelim U Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	controls	69.000				
2	0.02	24.000	15.00	17.00	5.00	*
3	0.001	36.000	15.00	17.00	5.00	*
4	0.0001	54.000	18.00	17.00	5.00	*

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

V ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 48 horas

```

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv          Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 63.0000    CALCULATED t VALUE = 0.4002
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 60.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 3.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01
vn preliminar U
File: vn preliminar U          Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED    1.340          4.840          7.640          4.840          1.340
OBSERVED    1          2          13          3          1
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 6.2989
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn preliminar U
File: vn preliminar U          Transform: NO TRANSFORMATION
Shapiro - Wilk's test for normality
=====
D = 630.000
U = 0.956
Critical U (P = 0.05) (n = 20) = 0.985
Critical U (P = 0.01) (n = 20) = 0.868
=====
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.
vn preliminar U
File: vn preliminar U          Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
=====
These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.
Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.
vn preliminar U
File: vn preliminar U          Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION    N    MIN    MAX    MEAN
1      controle      5    60.000    75.000    63.000
2      0.02           5    15.000    30.000    24.000
3      0.001          5    30.000    30.000    30.000
4      0.0001         5    45.000    60.000    57.000
vn preliminar U
File: vn preliminar U          Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION    VARIANCE    SD    SEM    C.U. %
1      controle      45.000    6.708    3.000    10.65
2      0.02           67.500    8.216    3.674    34.23
3      0.001          9.000    3.000    0.000    0.00
4      0.0001         45.000    6.708    3.000    11.77
vn preliminar U
File: vn preliminar U          Transform: NO TRANSFORMATION
STEEL'S MANY-ONE RANK TEST          -          Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION    TRANSFORMED MEAN    RANK SUM    CRIT. VALUE    df    SIG
1      controle      63.000          15.00    17.00    5.00    *
2      0.02           24.000          15.00    17.00    5.00    *
3      0.001          30.000          15.00    17.00    5.00    *
4      0.0001         57.000          23.00    17.00    5.00
=====
Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

```

V ensaio preliminar tempo de retenção do corante vermelho neutro – 72 horas

```

vermelho neutro controle-solvente
File: vn cont-solv          Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 63.0000    CALCULATED t VALUE = 0.0000
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 63.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 0.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01
vn preliminar U
File: vn preliminar U          Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED    1.340          4.840          7.640          4.840          1.340
OBSERVED    0          3          13          2          2
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 7.7914
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn preliminar U
File: vn preliminar U          Transform: NO TRANSFORMATION
Shapiro - Wilk's test for normality
=====
D = 630.000
U = 0.782
Critical U (P = 0.05) (n = 20) = 0.985
Critical U (P = 0.01) (n = 20) = 0.868
=====
Data FAIL normality test. Try another transformation.
vn preliminar U
File: vn preliminar U          Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
=====
These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.
Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.

```

```
vn prelin U
File: vn prelin U      Transform: NO TRANSFORMATION
```

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	63.000
2	0.02	5	15.000	15.000	15.000
3	0.001	5	15.000	30.000	18.000
4	0.0001	5	45.000	60.000	51.000

```
vn prelin U
File: vn prelin U      Transform: NO TRANSFORMATION
```

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	45.000	6.700	3.000	10.65
2	0.02	0.000	0.000	0.000	0.00
3	0.001	45.000	6.708	3.000	37.27
4	0.0001	67.500	8.216	3.674	16.11

```
vn prelin U
File: vn prelin U      Transform: NO TRANSFORMATION
```

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	controle	63.000				
2	0.02	15.000	15.00	17.00	5.00	*
3	0.001	18.000	15.00	17.00	5.00	*
4	0.0001	51.000	17.00	17.00	5.00	

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

APÊNDICE D – Resultados dos ensaios de citotoxicidade do DEET em organismos não irradiados obtidos por meio do software TOXSTAT 3.4 (GULLEY, D.D. et al. 1991).

I Ensaio – 24 horas

```
vermelho neutro DEET ensaio I - 24h
File: vn deet ensaioI Transform: NO TRANSFORM
```

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CRIL) MEAN =	66.0000	CALCULATED t VALUE =	0.6614
GRP2 (BLANK CRIL) MEAN =	64.0000	DEGREES OF FREEDOM =	20
DIFFERENCE IN MEANS = 2.0000			

TABLE t VALUE <0.05 (2),20> = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2),20> = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01

```
vn def I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION
```

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	4.020	14.520	22.920	14.520	4.020
OBSERVED	5	20	10	24	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 18.0403
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data FAIL normality test. Try another transformation.

```
vn def I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION
```

Hartley's test for homogeneity of variance

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 2.64
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

```
vn def I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION
```

Bartlett's test for homogeneity of variance

Calculated B1 statistic = 3.08

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

```
vn def I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION
```

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	15	60.000	75.000	66.000
2	0.0001	15	45.000	90.000	58.000
3	0.001	15	15.000	45.000	36.000
4	0.02	15	15.000	30.000	26.000

```
vn def I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION
```

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	57.857	7.606	1.964	11.52
2	0.0001	124.286	11.148	2.878	19.22
3	0.001	90.000	9.487	2.449	26.35
4	0.02	47.143	6.866	1.773	26.41

```
vn def I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION
```

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	controle	66.000				
2	0.0001	58.000	100.00	102.00	15.00	*
3	0.001	36.000	120.00	102.00	15.00	*
4	0.02	26.000	120.00	102.00	15.00	*

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

I Ensaio – 48 horas

```

vermelho neutro DEET ensaio1 48h
File: vn deet ensaio1      Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 62.0000    CALCULATED t VALUE = 8.5641
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 60.0000    DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 2.0000
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) = 2.048    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) = 2.763    NO significant difference at alpha=0.01

vn prelin I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
=====
EXPECTED    4.020    14.520    22.920    14.520    4.020
OBSERVED    1        16        29        8        6
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 7.9354
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

vn prelin I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 1.54
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 4.    df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4.    df (# avg reps-1) = 14.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

vn prelin I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.94
=====
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn prelin I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION    N    MIN    MAX    MEAN
1      controle      15    45.000    75.000    62.000
2      0.0001         15    45.000    75.000    56.000
3      0.001          15    30.000    45.000    38.000
4      0.02           15    15.000    45.000    28.000
=====
vn prelin I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION    VARIANCE    SD    SEM    C.V. %
1      controle      60.000    7.746    2.000    12.49
2      0.0001         79.206    8.904    2.297    15.90
3      0.001          60.000    7.746    2.000    28.30
4      0.02           92.143    9.599    2.478    34.28
=====
vn prelin I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2      Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION    TRANSFORMED MEAN    MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS    T STAT    SIG
1      controle      62.000    62.000
2      0.0001         56.000    56.000    1.925
3      0.001          38.000    38.000    7.700 *
4      0.02           28.000    28.000    10.907 *
=====
Dunnett table value = 2.13    (1 Tailed Value, P=0.05, df=40.3)

vn prelin I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2      Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION    NUM OF REPS    Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)    % of CONTROL    DIFFERENCE FROM CONTROL
1      controle      15
2      0.0001         15    6.639    10.7    6.000
3      0.001          15    6.639    10.7    24.000
4      0.02           15    6.639    10.7    34.000
=====

```

I Ensaio – 72 horas

```

vermelho neutro DEET ensaio1 72h
File: vn deet ensaio1      Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 54.0000    CALCULATED t VALUE = 1.4676
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 50.0000    DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 4.0000
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) = 2.048    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) = 2.763    NO significant difference at alpha=0.01

vn prelin I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
=====
EXPECTED    4.020    14.520    22.920    14.520    4.020
OBSERVED    1        25        10        18        6
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 10.9251
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data FAIL normality test. Try another transformation.

vn prelin I
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 2.59
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 4.    df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4.    df (# avg reps-1) = 14.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

```



```

vn preliminar
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 3.62

-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn preliminar
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N      MIN      MAX      MEAN
-----
1      controle      15      45.000    60.000    54.000
2      0.0001          15      45.000    60.000    49.000
3      0.001            15      15.000    45.000    24.000
4      0.02             15      0.000     30.000    18.000

vn preliminar
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD      SEM      C.V. %
-----
1      controle      57.857    7.606    1.964    14.09
2      0.0001          47.143    6.866    1.773    14.01
3      0.001            122.143   11.052    2.954    46.05
4      0.02             70.714    8.409    2.171    46.72

vn preliminar
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2                      Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED MEAN  MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS  T STAT  SIG
-----
1      controle      54.000            54.000
2      0.0001          49.000            49.000
3      0.001            24.000            24.000    1.587
4      0.02             18.000            18.000    9.521 *
                                     11.425 *

Dunnett table value = 2.13 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3)

vn preliminar
File: vn def I      Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2                      Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  NUM OF REPS  Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)  % of CONTROL  DIFFERENCE FROM CONTROL
-----
1      controle      15
2      0.0001          15
3      0.001            15      6.712      12.4      5.000
4      0.02             15      6.712      12.4      30.000
                                     36.000

```

II Ensaio – 24 horas

```

vermelho neutro DEET
File: vn DEET      Transform: NO TRANSFORM

-----
t-test of Solvent and Blank Controls                      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
-----
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 57.0000      CALCULATED t VALUE = 0.5641
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 55.0000      DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 2.0000
-----
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) = 2.048      NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) = 2.763      NO significant difference at alpha=0.01

vermelho neutro def II
File: vn def II      Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL  <-1.5  -1.5 to <-0.5  -0.5 to 0.5  >0.5 to 1.5  >1.5
-----
EXPECTED  4.020    14.520    22.920    14.520    4.020
OBSERVED   7         11         16         24         2

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 12.3561
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

vermelho neutro def II
File: vn def II      Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Uar/min Uar) = 1.52
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

vermelho neutro def II
File: vn def II      Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.83

-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vermelho neutro def II
File: vn def II      Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N      MIN      MAX      MEAN
-----
1      controle      15      45.000    75.000    57.000
2      0.0001          15      30.000    60.000    52.000
3      0.001            15      15.000    45.000    33.000
4      0.02             15      0.000     30.000    22.000

vermelho neutro def II
File: vn def II      Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD      SEM      C.V. %
-----
1      controle      102.857    10.142    2.619    17.79
2      0.0001          124.286    11.148    2.873    21.44
3      0.001            102.857    10.142    2.619    30.73
4      0.02             156.429    12.507    3.229    56.85

```

vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	57.000	57.000		
2	0.0001	52.000	52.000	1.242	
3	0.001	33.000	33.000	5.960	*
4	0.02	22.000	22.000	8.692	*

Dunnett table value = 2.13 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3)

vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	15			
2	0.0001	15	8.577	15.0	5.000
3	0.001	15	8.577	15.0	24.000
4	0.02	15	8.577	15.0	35.000

II Ensaio – 48 horas

vermelho neutro DEET
File: vn DEET Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 60.0000 CALCULATED t VALUE = 0.7157
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 57.0000 DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 3.0000

TABLE t VALUE (0.05 (2) 28) = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2) 28) = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01

vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	4.020	14.520	22.920	14.520	4.020
OBSERVED	5	17	15	21	2

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 7.3062
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 3.21
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance

Calculated B1 statistic = 5.10

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	15	45.000	75.000	60.000
2	0.0001	15	45.000	60.000	53.000
3	0.001	15	15.000	45.000	34.000
4	0.02	15	0.000	45.000	24.000

vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	122.057	13.887	3.586	23.15
2	0.0001	60.000	7.746	2.000	14.62
3	0.001	143.571	11.982	3.094	35.24
4	0.02	186.429	13.654	3.525	56.89

vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	60.000	60.000		
2	0.0001	53.000	53.000	1.588	
3	0.001	34.000	34.000	5.899	*
4	0.02	24.000	24.000	8.167	*

Dunnett table value = 2.13 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3)

vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	15			
2	0.0001	15	9.389	15.6	7.000
3	0.001	15	9.389	15.6	26.000
4	0.02	15	9.389	15.6	36.000

II Ensaio – 72 horas

```

vermelho neutro DEET
File: vn DEET Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 50.0000 CALCULATED t VALUE = 0.3145
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 50.0000 DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 2.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2),28> = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2),28> = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01
vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
=====
EXPECTED 4.020 14.520 22.920 14.520 4.020
OBSERVED 3 17 23 14 3
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 0.9601
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 2.92
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00
=====
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 5.23
=====
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION N MIN MAX MEAN
1 controle 15 45.000 75.000 57.000
2 0.0001 15 45.000 75.000 52.000
3 0.001 15 0.000 45.000 27.000
4 0.02 15 0.000 30.000 19.000
vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION VARIANCE SD SEM C.V. %
1 controle 102.857 10.142 2.619 17.79
2 0.0001 2.143 0.599 2.470 10.46
3 0.001 231.429 15.213 3.928 56.34
4 0.02 79.286 8.904 2.299 46.86
vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION TRANSFORMED MEAN MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS T STAT SIG
1 controle 57.000 57.000
2 0.0001 52.000 52.000 1.210
3 0.001 27.000 27.000 7.307 *
4 0.02 19.000 19.000 9.255 *
=====
Dunnett table value = 2.13 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3)
vermelho neutro def II
File: vn def II Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION NUM OF REPS Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS) % of CONTROL DIFFERENCE FROM CONTROL
1 controle 15
2 0.0001 15 8.745 15.3 5.000
3 0.001 15 8.745 15.3 30.000
4 0.02 15 8.745 15.3 30.000
=====

```

III Ensaio – 24 horas

```

vermelho neutro DEET
File: vn DEET Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 50.0000 CALCULATED t VALUE = -0.2112
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 50.0000 DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = -1.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2),28> = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2),28> = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01
vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
=====
EXPECTED 4.020 14.520 22.920 14.520 4.020
OBSERVED 1 18 19 21 1
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 8.9339
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 6.00
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00
=====
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

```

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 12.27

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	15	45.000	75.000	59.000
2	0.0001	15	45.000	60.000	54.000
3	0.001	15	0.000	60.000	34.000
4	0.02	15	0.000	60.000	21.000

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	143.571	11.982	3.094	20.31
2	0.0001	57.857	7.606	1.964	14.09
3	0.001	336.429	18.342	4.736	53.95
4	0.02	347.143	18.632	4.811	88.72

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	59.000	59.000		
2	0.0001	54.000	54.000	0.921	
3	0.001	34.000	34.000	4.603	*
4	0.02	21.000	21.000	6.996	*

Dunnett table value = 2.13 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3)

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	15			
2	0.0001	15	11.569	19.6	5.000
3	0.001	15	11.569	19.6	25.000
4	0.02	15	11.569	19.6	38.000

III Ensaio – 48 horas

vermelho neutro DEET
File: vn DEET Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 62.0000 CALCULATED t VALUE = 0.2366
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 61.0000 DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 1.0000

TABLE t VALUE (0.05 (2),28) = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	4.020	14.520	22.920	14.520	4.020
OBSERVED	5	15	20	18	2

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.4759
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 4.21 (alpha = 0.01)
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9

Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 7.00

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	15	45.000	75.000	62.000
2	0.0001	15	45.000	60.000	53.000
3	0.001	15	15.000	60.000	32.000
4	0.02	15	0.000	45.000	25.000

vermelho neutro def III
File: vn def III Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	124.286	11.148	2.878	17.78
2	0.0001	60.000	7.746	2.000	14.62
3	0.001	252.857	15.901	4.106	49.69
4	0.02	182.143	13.496	3.485	53.98

```

vermelho neutro def III
File: vn def III      Transform: NO TRANSFORMATION

```

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2					
Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	52.000	52.000		
2	0.0001	53.000	53.000	1.981	
3	0.001	32.000	32.000	6.603	*
4	0.02	25.000	25.000	8.144	*

Dunnett table value = 2.13 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3)

```

vermelho neutro def III
File: vn def III      Transform: NO TRANSFORMATION

```

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2					
Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REFS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	15			
2	0.0001	15	9.678	15.6	9.000
3	0.001	15	9.678	15.6	30.000
4	0.02	15	9.678	15.6	37.000

III Ensaio – 72 horas

```

vermelho neutro DEET
File: vn DEET      Transform: NO TRANSFORM

```

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN =	50.0000	CALCULATED t VALUE =	0.0010
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN =	55.0000	DEGREES OF FREEDOM =	28
DIFFERENCE IN MEANS =	3.0000		

TABLE t VALUE <0.05 (2),28> = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2),28> = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01

```

vermelho neutro def III
File: vn def III      Transform: NO TRANSFORMATION

```

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	4.020	14.520	22.920	14.520	4.020
OBSERVED	4	11	23	19	3

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.4948
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

```

vermelho neutro def III
File: vn def III      Transform: NO TRANSFORMATION

```

Hartley's test for homogeneity of variance

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 2.15
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

```

vermelho neutro def III
File: vn def III      Transform: NO TRANSFORMATION

```

Bartlett's test for homogeneity of variance

Calculated B1 statistic = 2.71

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

```

vermelho neutro def III
File: vn def III      Transform: NO TRANSFORMATION

```

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	15	45.000	75.000	58.000
2	0.0001	15	30.000	60.000	49.000
3	0.001	15	15.000	30.000	24.000
4	0.02	15	0.000	30.000	17.000

```

vermelho neutro def III
File: vn def III      Transform: NO TRANSFORMATION

```

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	124.286	11.148	2.878	19.22
2	0.0001	79.286	8.904	2.297	18.17
3	0.001	57.857	7.606	1.964	31.69
4	0.02	124.286	11.148	2.878	65.58

```

vermelho neutro def III
File: vn def III      Transform: NO TRANSFORMATION

```

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2					
Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	58.000	58.000		
2	0.0001	49.000	49.000	2.510	*
3	0.001	24.000	24.000	9.482	*
4	0.02	17.000	17.000	11.434	*

Dunnett table value = 2.13 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3)

```

vermelho neutro def III
File: vn def III      Transform: NO TRANSFORMATION

```

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2					
Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REFS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	15			
2	0.0001	15	7.638	13.2	9.000
3	0.001	15	7.638	13.2	34.000
4	0.02	15	7.638	13.2	41.000

APÊNDICE E – Resultados dos ensaios preliminares de citotoxicidade do DEET em organismos irradiados obtidos por meio do software TOXSTAT 3.4 (GULLEY, D.D. et al. 1991).

I ensaio preliminar 107 Gy – 24 horas

```

File: vn rad      Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN = 63.0000    CALCULATED t VALUE = 1.0954
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN = 54.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 9.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
=====
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED     1.340         4.840         7.640         4.840         1.340
OBSERVED      0             3             10            5             2
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.0989
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
=====
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 2.10
=====
Table Chi-square value = 11.34 <alpha = 0.01, df = 3>
Table Chi-square value = 7.81 <alpha = 0.05, df = 3>
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
=====
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
=====
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
-----
1      controle      5    45.000  75.000  63.000
2      0.0001          5    45.000  60.000  54.000
3      0.001            5    30.000  45.000  33.000
4      0.02             5    15.000  30.000  18.000
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
=====
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
=====
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD    SEM    C.V. %
-----
1      controle      157.500   12.550  5.612   19.92
2      0.0001          67.500   8.216   3.674   15.21
3      0.001            45.000   6.708   3.000   20.33
4      0.02             45.000   6.708   3.000   37.27
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
=====
ANOVA TABLE
=====
SOURCE      DF      SS      MS      F
-----
Between      3      6210.000  2070.000  26.286
Within <Error> 16      1260.000   78.750
Total       19      7470.000
=====
Critical F value = 3.24 <0.05,3,16>
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
=====
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2      Ho:Control<Treatment
=====
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED MEAN  MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS  T STAT  SIG
-----
1      controle      63.000            63.000
2      0.0001          54.000            54.000            1.604
3      0.001            33.000            33.000            5.345 *
4      0.02             18.000            18.000            8.018 *
=====
Dunnett table value = 2.23 <1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3>
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
=====
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2      Ho:Control<Treatment
=====
GROUP  IDENTIFICATION  NUM OF REPS  Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>  % of CONTROL  DIFFERENCE FROM CONTROL
-----
1      controle      5            12.516            19.9            9.000
2      0.0001          5            12.516            19.9            30.000
3      0.001            5            12.516            19.9            45.000
4      0.02             5            12.516            19.9            45.000
=====

```

I ensaio preliminar 107 Gy – 48 horas

```

vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN = 57.0000    CALCULATED t VALUE = 1.4142
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN = 48.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 9.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
=====
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED     1.340         4.840         7.640         4.840         1.340
OBSERVED      1             7             6             6             0
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.0203
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
=====
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.63
=====
Table Chi-square value = 11.34 <alpha = 0.01, df = 3>
Table Chi-square value = 7.81 <alpha = 0.05, df = 3>
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
=====

```

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	45.000	75.000	57.000
2	0.0001	5	30.000	45.000	42.000
3	0.001	5	0.000	15.000	9.000
4	0.02	5	0.000	15.000	6.000

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	157.500	12.550	5.612	22.02
2	0.0001	45.000	6.708	3.000	15.97
3	0.001	67.500	8.216	3.674	91.29
4	0.02	67.500	8.216	3.674	136.93

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	9405.000	3135.000	37.156
Within (Error)	16	1350.000	84.375	
Total	19	10755.000		

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	57.000	57.000		
2	0.0001	42.000	42.000	2.582	*
3	0.001	9.000	9.000	8.262	*
4	0.02	6.000	6.000	8.779	*

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	12.955	22.7	15.000
3	0.001	5	12.955	22.7	48.000
4	0.02	5	12.955	22.7	51.000

I ensaio preliminar 107 Gy – 72 horas

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	48.0000	CALCULATED t VALUE =	-0.6325
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	54.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	-6.0000		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 No significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 No significant difference at alpha=0.01

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.273	4.598	7.258	4.598	1.273
OBSERVED	0	7	6	6	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 4.4463
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.51

Bartlett's test using average degrees of freedom
Calculated B2 statistic = 0.61
Based on average replicate size of 3.75

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
Data PASS B2 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	157.500	12.550	5.612	26.15
2	0.0001	157.500	12.550	5.612	29.88
3	0.001	157.500	12.550	5.612	46.48
4	0.02	75.000	8.660	4.330	115.47

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	4303.421	1434.474	10.174
Within (Error)	15	2115.000	141.000	
Total	18	6418.421		

Critical F value = 3.29 (0.05,3,15)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

BONFERRONI t-TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	48.000	48.000		
2	0.0001	42.000	42.000	0.799	
3	0.001	27.000	27.000	2.796	*
4	0.02	7.500	7.500	5.084	*

Bonferroni t table value = 2.34 <1 Tailed Value, P=0.05, df=15,3)

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

BONFERRONI t-TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	12.595	36.7	6.000
3	0.001	5	12.595	36.7	21.000
4	0.02	4	18.662	38.9	40.500

II ensaio preliminar 107 Gy – 24 horas

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	60.0000	CALCULATED t VALUE =	-0.4082
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	63.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	-3.0000		

TABLE t VALUE <0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	4	10	5	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.3063
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.00

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	45.000	75.000	60.000
2	0.0001	5	45.000	60.000	54.000
3	0.001	5	15.000	45.000	30.000
4	0.02	5	15.000	30.000	18.000

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	112.500	10.607	4.743	17.68
2	0.0001	67.500	8.216	3.674	15.21
3	0.001	112.500	10.607	4.743	35.36
4	0.02	45.000	6.708	3.000	37.27

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	5895.000	1965.000	23.289
Within (Error)	16	1350.000	84.375	
Total	19	7245.000		

Critical F value = 3.24 <0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: all equal

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	60.000	60.000		
2	0.0001	54.000	54.000	1.033	
3	0.001	30.000	30.000	5.164	*
4	0.02	18.000	18.000	7.230	*

Dunnett table value = 2.23 <1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	12.955	21.6	6.000
3	0.001	5	12.955	21.6	30.000
4	0.02	5	12.955	21.6	42.000

II ensaio preliminar 107 Gy – 48 horas

vn rad	Transform: NO TRANSFORM				
File: vn rad	t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN				
=====					
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN	=	57.0000	CALCULATED t VALUE	=	-0.5345
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN	=	60.0000	DEGREES OF FREEDOM	=	8
DIFFERENCE IN MEANS	=	-3.0000			
=====					
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8>	=	2.306	NO significant difference at alpha=0.05		
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8>	=	3.355	NO significant difference at alpha=0.01		
vn rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	Chi-square test for normality: actual and expected frequencies				

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	2	5	8	5	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 1.6926					
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277					
Data PASS normality test. Continue analysis.					
vn rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	Bartlett's test for homogeneity of variance				
Calculated B1 statistic = 0.30					

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)					
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)					
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.					
vn rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2				

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	control	5	45.000	60.000	57.000
2	0.0001	5	45.000	60.000	51.000
3	0.001	5	0.000	15.000	12.000
4	0.02	5	0.000	15.000	9.000
vn rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2				

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	control	45.000	6.708	3.000	11.77
2	0.0001	67.500	8.216	3.674	16.11
3	0.001	45.000	6.708	3.000	55.90
4	0.02	67.500	8.216	3.674	91.29
vn rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	ANOVA TABLE				

SOURCE	DF	SS	MS	F	
Between	3	9573.750	3191.250	56.733	
Within (Error)	16	900.000	56.250		
Total	19	10473.750			

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)					
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal					
vn rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment				

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	control	57.000	57.000		
2	0.0001	51.000	51.000	1.265	
3	0.001	12.000	12.000	9.487	*
4	0.02	9.000	9.000	10.119	*
Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)					
vn rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment				

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	control	5			
2	0.0001	5	10.573	18.6	6.000
3	0.001	5	10.573	18.6	45.000
4	0.02	5	10.573	18.6	48.000

II ensaio preliminar 107 Gy – 72 horas

```

vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN      =      45.0000      CALCULATED t VALUE      =      0.4002
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN      =      42.0000      DEGREES OF FREEDOM      =      8
DIFFERENCE IN MEANS          =      3.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8>    =      2.306      NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8>    =      3.355      NO significant difference at alpha=0.01
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
EXPECTED      1.340      4.840      7.640      4.840      1.340
OBSERVED      0      3      13      3      1
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =      6.5857
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
=====
These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.

```

un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: un rad	SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2				
GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	30.000	60.000	45.000
2	0.0001	5	45.000	45.000	45.000
3	0.001	5	15.000	45.000	30.000
4	0.02	5	15.000	30.000	18.000

un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: un rad	SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2				
GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	112.500	10.607	4.743	23.57
2	0.0001	0.000	0.000	0.000	0.00
3	0.001	225.000	15.000	6.708	50.00
4	0.02	45.000	6.708	3.000	37.27

un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: un rad	ANOVA TABLE				
SOURCE	DF	SS	MS	F	
Between	3	2565.000	855.000	0.941	
Within (Error)	16	1530.000	95.625		
Total	19	4095.000			

Critical F value = 3.24 <0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: un rad	DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment				
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	45.000	45.000		
2	0.0001	45.000	45.000	0.000	
3	0.001	30.000	30.000	2.425	*
4	0.02	18.000	18.000	4.366	*

Dunnett table value = 2.23 <1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: un rad	DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment				
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	13.792	30.6	0.000
3	0.001	5	13.792	30.6	15.000
4	0.02	5	13.792	30.6	27.000

III ensaio preliminar 107 Gy – 24 horas

un rad	Transform: NO TRANSFORM				
File: vn rad	t-test of Solvent and Blank Controls				
Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN					
=====					
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	69.0000	CALCULATED t VALUE =	2.1320		
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	54.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8		
DIFFERENCE IN MEANS =	15.0000				
=====					
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> =	2.306	NO significant difference at alpha=0.05			
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> =	3.355	NO significant difference at alpha=0.01			
un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	Chi-square test for normality: actual and expected frequencies				
=====					
INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	7	4	8	1
=====					
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 6.1076					
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277					
Data PASS normality test. Continue analysis.					
un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: un rad	Bartlett's test for homogeneity of variance				
Calculated B1 statistic = 0.21					
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)					
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)					
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.					
un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2				
=====					
GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	69.000
2	0.0001	5	45.000	60.000	51.000
3	0.001	5	15.000	30.000	24.000
4	0.02	5	15.000	30.000	18.000
un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: vn rad	SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2				
=====					
GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	67.500	8.216	3.674	11.91
2	0.0001	67.500	8.216	3.674	16.11
3	0.001	67.500	8.216	3.674	34.23
4	0.02	45.000	6.708	3.000	37.27
un rad	Transform: NO TRANSFORMATION				
File: un rad	ANOVA TABLE				
=====					
SOURCE	DF	SS	MS	F	
Between	3	8505.000	2835.000	45.818	
Within (Error)	16	990.000	61.875		
Total	19	9495.000			
=====					
Critical F value = 3.24 <0.05,3,16>					
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal					

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	59.000	59.000		
2	0.0001	51.000	51.000	3.618	*
3	0.001	24.000	24.000	9.045	*
4	0.02	18.000	18.000	10.251	*

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	11.094	16.1	18.000
3	0.001	5	11.094	16.1	45.000
4	0.02	5	11.094	16.1	51.000

III ensaio preliminar 107 Gy – 48 horas

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 57.0000 CALCULATED t VALUE = -0.5345
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 60.0000 DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = -3.0000

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	1	6	6	7	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.0203
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.63

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	45.000	60.000	57.000
2	0.0001	5	45.000	60.000	54.000
3	0.001	5	0.000	30.000	12.000
4	0.02	5	0.000	15.000	9.000

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	45.000	6.708	3.000	11.77
2	0.0001	57.500	7.584	3.674	15.21
3	0.001	157.500	12.550	5.612	104.58
4	0.02	67.500	8.216	3.674	91.29

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	10170.000	3390.000	40.178
Within (Error)	16	1350.000	84.375	
Total	19	11520.000		

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	57.000	57.000		
2	0.0001	54.000	54.000	0.516	
3	0.001	12.000	12.000	7.746	*
4	0.02	9.000	9.000	8.262	*

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	12.955	22.7	3.000
3	0.001	5	12.955	22.7	45.000
4	0.02	5	12.955	22.7	48.000

III ensaio preliminar 107 Gy – 72 horas

```

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 60.0000    CALCULATED t VALUE = 1.0000
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 54.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 6.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED    1.273      4.598      7.258      4.598      1.273
OBSERVED     0         6         8         5         0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.0045
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORMATION
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.00

Bartlett's test using average degrees of freedom
Calculated B2 statistic = 1.13
Based on average replicate size of 3.75

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.01 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
Data PASS B2 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP IDENTIFICATION N MIN MAX MEAN
1 control 5 45.000 75.000 60.000
2 0.0001 5 30.000 60.000 42.000
3 0.001 4 15.000 30.000 18.750
4 0.02 5 15.000 30.000 21.000

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP IDENTIFICATION VARIANCE SD SEM C.V. %
1 control 112.500 10.607 4.743 17.68
2 0.0001 157.500 12.550 5.612 29.88
3 0.001 56.250 7.500 3.750 40.00
4 0.02 67.500 8.216 3.674 39.12

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORMATION
ANOVA TABLE

SOURCE DF SS MS F
Between 3 5373.355 1791.118 17.690
Within (Error) 15 1518.750 101.250
Total 18 6892.105

Critical F value = 3.29 (0.05,3,15)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORMATION
BONFERRONI t-TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION TRANSFORMED MEAN MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS T STAT SIG
1 control 60.000 60.000
2 0.0001 42.000 42.000 2.020 *
3 0.001 18.750 18.750 6.111 *
4 0.02 21.000 21.000 6.128 *
Bonferroni t table value = 2.34 (1 Tailed Value, P=0.05, df=15,3)

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORMATION
BONFERRONI t-TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION NUM OF REPS Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS) % of DIFFERENCE FROM CONTROL
1 control 5
2 0.0001 5 14.910 24.9 18.000
3 0.001 4 15.815 26.4 41.250
4 0.02 5 14.910 24.9 39.000

```

I ensaio preliminar 11 Gy – 24 horas

```

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 63.0000    CALCULATED t VALUE = -0.7303
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 69.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = -6.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01

un rad
File: un rad          Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED    1.340      4.840      7.640      4.840      1.340
OBSERVED     0         7         6         7         0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 4.9600
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

```

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.47

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	15.000	45.000	30.000
2	0.0001	5	45.000	60.000	54.000
3	0.001	5	15.000	45.000	30.000
4	0.02	5	15.000	30.000	21.000

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	112.500	10.607	4.743	35.36
2	0.0001	67.500	8.216	3.674	15.21
3	0.001	112.500	10.607	4.743	35.36
4	0.02	67.500	8.216	3.674	39.12

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	3003.750	1001.250	11.125
Within (Error)	16	1440.000	90.000	
Total	19	4443.750		

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	30.000	30.000		
2	0.0001	54.000	54.000	-4.000	
3	0.001	30.000	30.000	0.000	
4	0.02	21.000	21.000	1.500	

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	13.300	44.6	-24.000
3	0.001	5	13.300	44.6	0.000
4	0.02	5	13.300	44.6	9.000

I ensaio preliminar 11 Gy – 48 horas

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN	=	57.0000	CALCULATED t VALUE	=	-0.3015
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN	=	60.0000	DEGREES OF FREEDOM	=	8
DIFFERENCE IN MEANS	=	-3.0000			

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	6	10	4	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.9328
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.20

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	45.000	75.000	57.000
2	0.0001	5	30.000	60.000	42.000
3	0.001	5	15.000	45.000	30.000
4	0.02	5	0.000	30.000	15.000

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	157.500	12.550	5.612	22.02
2	0.0001	157.500	12.550	5.612	29.88
3	0.001	112.500	10.607	4.743	35.36
4	0.02	112.500	10.607	4.743	70.71

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	4770.000	1590.000	11.778
Within (Error)	16	2160.000	135.000	
Total	19	6930.000		

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	57.000	57.000		
2	0.0001	42.000	42.000	2.041	
3	0.001	30.000	30.000	3.674	*
4	0.02	15.000	15.000	5.715	*

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	16.387	28.7	15.000
3	0.001	5	16.387	28.7	27.000
4	0.02	5	16.387	28.7	42.000

I ensaio preliminar 11 Gy – 72 horas

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 48.0000 CALCULATED t VALUE = -0.6325
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 54.0000 DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = -6.0000

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.273	4.598	7.258	4.598	1.273
OBSERVED	0	5	8	5	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 1.4777
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.79

Bartlett's test using average degrees of freedom
Calculated B2 statistic = 1.73
Based on average replicate size of 3.75

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
Data PASS B2 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	30.000	60.000	48.000
2	0.0001	5	45.000	60.000	48.000
3	0.001	5	15.000	45.000	27.000
4	0.02	4	0.000	15.000	7.500

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	157.500	12.550	5.612	26.15
2	0.0001	45.000	6.708	3.000	13.98
3	0.001	157.500	12.550	5.612	46.48
4	0.02	75.000	8.660	4.330	115.47

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	5013.947	1671.316	15.057
Within (Error)	15	1665.000	111.000	
Total	18	6678.947		

Critical F value = 3.29 (0.05,3,15)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

BONFERRONI t-TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	48.000	48.000		
2	0.0001	48.000	48.000	0.000	
3	0.001	27.000	27.000	3.152	*
4	0.02	7.500	7.500	5.730	*

Bonferroni t table value = 2.34 (1 Tailed Value, P=0.05, df=15,3)

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

BONFERRONI t-TEST		TABLE 2 OF 2		Ho:Control<Treatment	
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0,0001	5	15.612	32.5	0.000
3	0,001	5	15.612	32.5	21.000
4	0,02	4	16.559	34.5	40.500

II ensaio preliminar 11 Gy – 24 horas

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	60.0000	CALCULATED t VALUE =	0.7845
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	54.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	6.0000		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	7	6	7	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 4.9600
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance

Calculated B1 statistic = 0.47

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	45.000	75.000	60.000
2	0,0001	5	45.000	60.000	54.000
3	0,001	5	15.000	45.000	30.000
4	0,02	5	15.000	30.000	21.000

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	112.500	10.607	4.743	17.68
2	0,0001	67.500	8.216	3.674	15.21
3	0,001	112.500	10.607	4.743	35.36
4	0,02	67.500	8.216	3.674	39.12

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	5253.750	1751.250	19.458
Within (Error)	16	1440.000	90.000	
Total	19	6693.750		

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	60.000	60.000		
2	0,0001	54.000	54.000	1.000	
3	0,001	30.000	30.000	5.000	*
4	0,02	21.000	21.000	6.500	*

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0,0001	5	13.380	22.3	6.000
3	0,001	5	13.380	22.3	30.000
4	0,02	5	13.380	22.3	39.000

II ensaio preliminar 11 Gy – 48 horas

```

on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 (SOLVENT CRIL) MEAN = 63.0000    CALCULATED t VALUE = 0.9428
GRP2 (BLANK CRIL) MEAN = 57.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 6.0000
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01
on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
=====
EXPECTED    1.340      4.840      7.640      4.840      1.340
OBSERVED    1          5          8          6          0
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 1.7265
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.99
=====
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
=====
GRP  IDENTIFICATION    N    MIN    MAX    MEAN
=====
1      controle      5    45.000  75.000  63.000
2      0.0001         5    45.000  60.000  57.000
3      0.001          5    15.000  45.000  27.000
4      0.02           5    15.000  30.000  24.000
=====
on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
=====
GRP  IDENTIFICATION    VARIANCE    SD    SEM    C.U. %
=====
1      controle      157.500    12.550  5.612  19.92
2      0.0001         45.000     6.708  3.000  11.77
3      0.001          157.500    12.550  5.612  46.48
4      0.02           67.500     8.216  3.674  34.23
=====
on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
ANOVA TABLE
=====
SOURCE    DF    SS    MS    F
=====
Between    3    6063.750  2021.250  18.912
Within (Error) 16  1710.000  106.875
Total      19  7773.750
=====
Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal
on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2      Ho:Control<Treatment
=====
GROUP  IDENTIFICATION    TRANSFORMED MEAN    MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS    T STAT    SIG
=====
1      controle      63.000    63.000
2      0.0001         57.000    57.000    0.918
3      0.001          27.000    27.000    5.506 *
4      0.02           24.000    24.000    5.965 *
=====
Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)
on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2      Ho:Control<Treatment
=====
GROUP  IDENTIFICATION    NUM OF REPS    Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)    % of CONTROL    DIFFERENCE FROM CONTROL
=====
1      controle      5              14.581    23.1    6.000
2      0.0001         5              14.581    23.1    36.000
3      0.001          5              14.581    23.1    39.000
4      0.02           5              14.581    23.1    39.000
=====

```

II ensaio preliminar 11 Gy – 72 horas

```

on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 (SOLVENT CRIL) MEAN = 39.0000    CALCULATED t VALUE = -0.3162
GRP2 (BLANK CRIL) MEAN = 42.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = -3.0000
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01
on rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
=====
EXPECTED    1.273      4.598      7.258      4.598      1.273
OBSERVED    0          7          7          5          0
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.0451
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

```



```

on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.88
-----
Bartlett's test using average degrees of freedom
Calculated B2 statistic = 1.78
Based on average replicate size of 3.75
-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
Data PASS B2 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N      MIN      MAX      MEAN
-----
1      controle      5      15.000   60.000   39.000
2      0.0001           5      30.000   60.000   42.000
3      0.001             4      15.000   45.000   22.500
4      0.02              5      15.000   30.000   21.000
-----
on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD      SEM      C.U. %
-----
1      controle      292.500   17.183   7.649    43.85
2      0.0001           157.500   12.550   5.612    29.88
3      0.001             225.000   15.000   7.500    66.67
4      0.02              67.500    8.216    3.674    39.12
-----
on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
-----
ANOVA TABLE
-----
SOURCE      DF      SS      MS      F
-----
Between      3      1707.632  569.211  3.110
Within (Error) 15      2745.000  183.000
Total        18      4452.632
-----
Critical F value = 3.29 (0.05,3,15)
Since F < Critical F FAIL TO REJECT Ho: all equal
on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
-----
BONFERRONI t-TEST - TABLE 1 OF 2          Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED MEAN  MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS  T STAT  SIG
-----
1      controle      39.000            39.000
2      0.0001           42.000            42.000
3      0.001             22.500            22.500
4      0.02              21.000            21.000
-----
Bonferroni t table value = 2.34 (1 Tailed Value, P=0.05, df=15,3)
on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
-----
BONFERRONI t-TEST - TABLE 2 OF 2          Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  NUM OF REFS  Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)  % of CONTROL  DIFFERENCE FROM CONTROL
-----
1      controle      5            20.045  51.4  -3.000
2      0.0001           4            21.261  54.5  16.500
3      0.001             5            20.045  51.4  18.000
4      0.02              5            20.045  51.4  18.000
-----

```

III ensaio preliminar 11 Gy – 24 horas

```

on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORM
-----
t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
-----
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 69.0000  CALCULATED t VALUE = 0.8944
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 63.0000  DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 6.0000
-----
TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306  NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355  NO significant difference at alpha=0.01
on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL  <-1.5  -1.5 to <-0.5  -0.5 to 0.5  >0.5 to 1.5  >1.5
-----
EXPECTED  1.340  4.840  7.640  4.840  1.340
OBSERVED  0  9  0  11  0
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 21.7355
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data FAIL normality test. Try another transformation.
on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = -0.00
-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
on rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N      MIN      MAX      MEAN
-----
1      controle      5      60.000   75.000   69.000
2      0.0001           5      45.000   60.000   54.000
3      0.001             5      30.000   45.000   36.000
4      0.02              5      15.000   30.000   24.000
-----

```

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	67.500	8.216	3.674	11.91
2	0.0001	67.500	8.216	3.674	15.21
3	0.001	67.500	8.216	3.674	22.82
4	0.02	67.500	8.216	3.674	34.23

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	controle	69.000				
2	0.0001	54.000	18.00	17.00	5.00	
3	0.001	36.000	15.00	17.00	5.00	*
4	0.02	24.000	15.00	17.00	5.00	*

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

III ensaio preliminar 11 Gy – 48 horas

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN =	63.0000	CALCULATED t VALUE =	0.4082
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN =	60.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	3.0000		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	6	7	6	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.0359
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 5.38

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	60.000	75.000	63.000
2	0.0001	5	45.000	60.000	54.000
3	0.001	5	15.000	60.000	39.000
4	0.02	5	0.000	45.000	10.000

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	45.000	6.708	3.000	10.65
2	0.0001	67.500	8.216	3.674	15.21
3	0.001	292.500	17.103	7.649	43.85
4	0.02	382.500	19.558	8.746	100.65

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	5805.000	1935.000	9.829
Within (Error)	16	3150.000	196.875	
Total	19	8955.000		

Critical F value = 3.24 (0.05, 3, 16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	63.000	63.000		
2	0.0001	54.000	54.000	1.014	
3	0.001	39.000	39.000	2.704	*
4	0.02	10.000	10.000	5.071	*

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

un rad
File: un rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REFS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	19.789	31.4	9.000
3	0.001	5	19.789	31.4	24.000
4	0.02	5	19.789	31.4	45.000

III ensaio preliminar 11 Gy – 72 horas

```

on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORM
-----
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 60.0000    CALCULATED t VALUE = 1.0000
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 54.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 6.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01
on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
-----
EXPECTED    1.206          4.356          6.876          4.356          1.206
OBSERVED    0              6              7              4              1
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 1.0930
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.17
-----
Bartlett's test using average degrees of freedom
Calculated B2 statistic = 1.21
Based on average replicate size of 3.50
-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
Data PASS B2 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
-----
1      controle      5    45.000  75.000  60.000
2      0.0001          5    30.000  60.000  39.000
3      0.001            4    15.000  30.000  22.500
4      0.02             4    15.000  30.000  18.750
-----
on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD    SEM    C.V. %
-----
1      controle      112.500   10.607  4.743   17.68
2      0.0001          100.000   10.000   6.000   34.40
3      0.001            75.000    8.660   4.330   38.49
4      0.02             56.250    7.500   3.750   40.00
-----
on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
ANOVA TABLE
-----
SOURCE      DF      SS      MS      F
-----
Between      3      4036.250  1612.083  14.433
Within (Error) 14      1563.750   111.696
Total       17      6400.000
-----
Critical F value = 3.34 (0.05,3,14)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal
on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
BONFERRONI t-TEST - TABLE 1 OF 2      Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED MEAN  MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS  T STAT  SIG
-----
1      controle      60.000            60.000
2      0.0001          39.000            39.000
3      0.001            22.500            22.500
4      0.02             18.750            18.750
-----
Bonferroni t table value = 2.36 (1 Tailed Value, P=0.05, df=14,3)
on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
BONFERRONI t-TEST - TABLE 2 OF 2      Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  NUM OF REPS  Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)  % of CONTROL  DIFFERENCE FROM CONTROL
-----
1      controle      5            15.773          26.3          21.000
2      0.0001          5            16.730          27.9          37.500
3      0.001            4            16.730          27.9          41.250
4      0.02             4            16.730          27.9          41.250
-----

```

I ensaio preliminar 3 Gy – 24 horas

```

on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORM
-----
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 63.0000    CALCULATED t VALUE = -0.7303
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 69.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = -6.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01
on rad
File: on rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
-----
EXPECTED    1.340          4.840          7.640          4.840          1.340
OBSERVED    0              3              10             5              2
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.0989
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

```

```

vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 2.10
-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.01 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN      MAX      MEAN
-----
1      controle      5    45.000    75.000    63.000
2      0.0001          5    45.000    60.000    54.000
3      0.001            5    30.000    45.000    33.000
4      0.02             5    15.000    30.000    18.000
-----
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD      SEM      C.U. %
-----
1      controle      157.500    12.550    5.612    19.22
2      0.0001          67.500     8.216    3.674    15.21
3      0.001            45.000     6.708    3.000    20.33
4      0.02             45.000     6.708    3.000    37.27
-----
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
ANOVA TABLE
-----
SOURCE      DF      SS      MS      F
-----
Between      3      6210.000    2070.000    26.286
Within (Error) 16      1260.000     78.750
Total       19      7470.000
-----
Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2      Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED MEAN  MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS  T STAT  SIG
-----
1      controle      63.000            63.000
2      0.0001          54.000            54.000      1.604
3      0.001            33.000            33.000      5.345 *
4      0.02             18.000            18.000      8.018 *
-----
Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2      Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  NUM OF REPS  Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)  % of CONTROL  DIFFERENCE FROM CONTROL
-----
1      controle      5
2      0.0001          5      12.516      19.9      9.000
3      0.001            5      12.516      19.9      30.000
4      0.02             5      12.516      19.9      45.000
-----

```

I ensaio preliminar 3 Gy – 48 horas

```

vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORM
-----
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN = 63.0000      CALCULATED t VALUE = 0.9428
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN = 57.0000      DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 6.0000
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306      NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355      NO significant difference at alpha=0.01
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
-----
EXPECTED      1.340      4.840      7.640      4.840      1.340
OBSERVED      0      7      6      6      1
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.0203
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.63
-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.01 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN      MAX      MEAN
-----
1      controle      5    60.000    75.000    63.000
2      0.0001          5    45.000    60.000    51.000
3      0.001            5    15.000    45.000    33.000
4      0.02             5    15.000    30.000    21.000
-----
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD      SEM      C.U. %
-----
1      controle      45.000     6.708    3.000    10.65
2      0.0001          8.216     2.866    1.283    16.11
3      0.001          157.500    12.550    5.612    38.03
4      0.02           67.500     8.216    3.674    39.12
-----

```

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE				
SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	5228.000	1740.000	20.622
Within (Error)	16	1350.000	84.375	
Total	19	6578.000		

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	63.000	63.000		
2	0.0001	51.000	51.000	2.066	
3	0.001	33.000	33.000	5.164 *	
4	0.02	21.000	21.000	7.230 *	

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REFS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	12.955	20.6	12.000
3	0.001	5	12.955	20.6	30.000
4	0.02	5	12.955	20.6	42.000

I ensaio preliminar 3 Gy – 72 horas

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN			
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	45.0000	CALCULATED t VALUE =	-0.4082
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	48.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	-3.0000		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	4	12	3	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 4.7597
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.36

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2				
GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX
1	controle	5	30.000	60.000
2	0.0001	5	30.000	60.000
3	0.001	5	30.000	60.000
4	0.02	5	15.000	30.000

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2				
GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM
1	controle	112.500	10.607	4.743
2	0.0001	157.500	12.550	5.612
3	0.001	112.500	10.607	4.743
4	0.02	45.000	6.708	3.000

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE				
SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	3690.000	1230.000	11.509
Within (Error)	16	1710.000	106.875	
Total	19	5400.000		

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

un rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	45.000	45.000		
2	0.0001	42.000	42.000	0.459	
3	0.001	15.000	15.000	4.588 *	
4	0.02	18.000	18.000	4.129 *	

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

```

vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST      -   TABLE 2 OF 2                      Ho:Control<Treatment

```

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	control	5			
2	0.0001	5	14.581	32.4	3.000
3	0.001	5	14.581	32.4	30.000
4	0.02	5	14.581	32.4	27.000

II ensaio preliminar 3 Gy – 24 horas

```

vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls                      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 69.0000      CALCULATED t VALUE = 2.1320
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 54.0000      DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 15.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306      NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355      NO significant difference at alpha=0.01
vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
EXPECTED      1.340      4.840      7.640      4.840      1.340
OBSERVED      0      6      4      9      1
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 7.0141
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.21
=====
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.01 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION      N      MIN      MAX      MEAN
1      control      5      60.000      75.000      69.000
2      0.0001      5      45.000      60.000      54.000
3      0.001      5      15.000      30.000      24.000
4      0.02      5      15.000      30.000      18.000
=====
vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION      VARIANCE      SD      SEM      C.U. %
1      control      67.500      8.216      3.674      11.91
2      0.0001      67.500      8.216      3.674      15.21
3      0.001      67.500      8.216      3.674      34.23
4      0.02      45.000      6.708      3.000      37.27
=====
vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
ANOVA TABLE
=====
SOURCE      DF      SS      MS      F
Between      3      8853.750      2951.250      47.697
Within (Error) 16      990.000      61.875
Total      19      9843.750
=====
Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal
vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST      -   TABLE 1 OF 2                      Ho:Control<Treatment

```

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	control	69.000	69.000		
2	0.0001	54.000	54.000	3.015	*
3	0.001	24.000	24.000	9.045	*
4	0.02	18.000	18.000	10.251	*

```

Dunnnett table value = 2.23      (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)
vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST      -   TABLE 2 OF 2                      Ho:Control<Treatment

```

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	control	5			
2	0.0001	5	11.094	16.1	15.000
3	0.001	5	11.094	16.1	45.000
4	0.02	5	11.094	16.1	51.000

II ensaio preliminar 3 Gy – 48 horas

```

vn rad
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls                      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 63.0000      CALCULATED t VALUE = 0.9428
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 52.0000      DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 11.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306      NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355      NO significant difference at alpha=0.01

```

```

vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED    1.340          4.840          7.640          4.840          1.340
OBSERVED     0              7              6              6              1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.0203
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.63
-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.01 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
1      controle      5    60.000  75.000  63.000
2      0.0001         5    45.000  60.000  51.000
3      0.001           5    15.000  45.000  33.000
4      0.02            5    15.000  30.000  21.000
-----
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD    SEM    C.V. %
1      controle      45.000    6.708  3.000   10.65
2      0.0001         67.500    8.216  3.674   16.11
3      0.001           157.500   12.550  5.612   38.03
4      0.02            67.500    8.216  3.674   39.12
-----
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
ANOVA TABLE
-----
SOURCE      DF      SS      MS      F
Between      3      5220.000  1740.000  20.622
Within (Error) 16      1350.000   84.375
Total        19      6570.000
-----
Critical F value = 3.24 (0.05, 3, 16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2      Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED MEAN  MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS  T STAT  SIG
1      controle      63.000            63.000
2      0.0001         51.000            51.000  2.066
3      0.001           33.000            33.000  5.164 *
4      0.02            21.000            21.000  7.230 *
Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)
-----
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2      Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  NUM OF REPS  Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)  % of CONTROL  DIFFERENCE FROM CONTROL
1      controle      5
2      0.0001         5            12.955  20.6  12.000
3      0.001           5            12.955  20.6  30.000
4      0.02            5            12.955  20.6  42.000

```

II ensaio preliminar 3 Gy – 72 horas

```

vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORM
-----
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
-----
GRP1 (SOLVENT CRIL) MEAN = 54.0000  CALCULATED t VALUE = 0.5774
GRP2 (BLANK CRIL) MEAN = 51.0000  DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 3.0000
-----
TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306  NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355  NO significant difference at alpha=0.01
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
EXPECTED    1.340          4.840          7.640          4.840          1.340
OBSERVED     1              5              7              7              0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.4491
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.78
-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.01 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
-----
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
1      controle      5    45.000  60.000  54.000
2      0.0001         5    30.000  45.000  42.000
3      0.001           5    15.000  30.000  24.000
4      0.02            5     0.000  30.000  15.000

```

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	67.500	8.216	3.674	15.21
2	0.0001	45.000	6.708	3.000	15.97
3	0.001	67.500	8.216	3.674	34.23
4	0.02	112.500	10.607	4.743	70.71

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	4623.750	1541.250	21.077
Within (Error)	16	1170.000	73.125	
Total	19	5793.750		

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	54.000	54.000		
2	0.0001	42.000	42.000	2.219	
3	0.001	24.000	24.000	6.547	*
4	0.02	15.000	15.000	7.211	*

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	12.061	22.3	12.000
3	0.001	5	12.061	22.3	30.000
4	0.02	5	12.061	22.3	39.000

III ensaio preliminar 3 Gy – 24 horas

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	60.0000	CALCULATED t VALUE =	-0.4002
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	63.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	-3.0000		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	8	5	7	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 6.6194
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.96

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	45.000	75.000	60.000
2	0.0001	5	45.000	60.000	54.000
3	0.001	5	15.000	45.000	27.000
4	0.02	5	15.000	30.000	21.000

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	112.500	10.607	4.743	17.60
2	0.0001	67.500	8.216	3.674	15.21
3	0.001	157.500	12.550	5.612	46.40
4	0.02	67.500	8.216	3.674	39.12

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	5625.000	1875.000	18.519
Within (Error)	16	1620.000	101.250	
Total	19	7245.000		

Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

vn rad
File: vn rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	60.000	60.000		
2	0.0001	54.000	54.000	0.943	
3	0.001	27.000	27.000	5.195	*
4	0.02	21.000	21.000	6.128	*

Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)


```
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
```

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2					
Ho:Control<Treatment					
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	14.192	23.7	6.000
3	0.001	5	14.192	23.7	33.000
4	0.02	5	14.192	23.7	39.000

III ensaio preliminar 3 Gy – 48 horas

```
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORM
```

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CRIL) MEAN =	60.0000	CALCULATED t VALUE =	0.5345
GRP2 (BLANK CRIL) MEAN =	57.0000	DEGREES OF FREEDOM =	8
DIFFERENCE IN MEANS =	3.0000		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8) = 2.306 NO significant difference at alpha=0.05
 TABLE t VALUE (0.01 (2), 8) = 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

```
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
```

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.340	4.840	7.640	4.840	1.340
OBSERVED	0	9	6	4	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 5.4996
 Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
 Data PASS normality test. Continue analysis.

```
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
```

Bartlett's test for homogeneity of variance
 Calculated B1 statistic = 0.95

Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
 Table Chi-square value = 7.01 (alpha = 0.05, df = 3)
 Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

```
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
```

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	5	45.000	75.000	60.000
2	0.0001	5	45.000	60.000	51.000
3	0.001	5	15.000	45.000	27.000
4	0.02	5	15.000	45.000	24.000

```
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
```

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	142.500	10.607	4.743	17.69
2	0.0001	157.500	12.550	5.612	16.11
3	0.001	157.500	12.550	5.612	46.48
4	0.02	100.000	10.000	6.000	55.90

```
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
```

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	4725.000	1575.000	12.174
Within (Error)	16	2070.000	129.375	
Total	19	6795.000		

Critical F value = 3.24 (0.05, 3, 16)
 Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

```
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
```

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	60.000	60.000		
2	0.0001	51.000	51.000	1.251	
3	0.001	27.000	27.000	4.587	*
4	0.02	24.000	24.000	5.004	*

Dunnnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)

```
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
```

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	5			
2	0.0001	5	16.042	26.7	9.000
3	0.001	5	16.042	26.7	33.000
4	0.02	5	16.042	26.7	36.000

III ensaio preliminar 3 Gy – 72 horas

```

vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls      Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 51.0000    CALCULATED t VALUE = 0.4472
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 40.0000    DEGREES OF FREEDOM = 8
DIFFERENCE IN MEANS = 3.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2), 8> = 2.306    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2), 8> = 3.355    NO significant difference at alpha=0.01
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
=====
EXPECTED    1.340        4.840        7.640        4.840        1.340
OBSERVED     1          6          8          4          1
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 0.6133
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.30
=====
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.01 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
=====
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
=====
1    controle        5    45.000  60.000  51.000
2    0.0001           5    30.000  45.000  36.000
3    0.001            5    15.000  30.000  18.000
4    0.02             5     0.000  15.000  12.000
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
=====
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD    SEM    C.U. %
=====
1    controle        67.500    8.216  3.674  16.11
2    0.0001           67.500    8.216  3.674  22.82
3    0.001            45.000    6.708  3.000  37.27
4    0.02             45.000    6.708  3.000  55.90
=====
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
ANOVA TABLE
=====
SOURCE      DF      SS      MS      F
=====
Between      3      4713.750  1571.250  27.933
Within (Error) 16      900.000   56.250
Total       19      5613.750
=====
Critical F value = 3.24 (0.05,3,16)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2      Ho:Control<Treatment
=====
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED MEAN  MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS  T STAT  SIG
=====
1    controle        51.000            51.000
2    0.0001           36.000            36.000      3.162  *
3    0.001            18.000            18.000      6.957  *
4    0.02             12.000            12.000      8.222  *
=====
Dunnett table value = 2.23 (1 Tailed Value, P=0.05, df=16,3)
vn rad
File: vn rad      Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2      Ho:Control<Treatment
=====
GROUP  IDENTIFICATION  NUM OF REPS  Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)  % of CONTROL  DIFFERENCE FROM CONTROL
=====
1    controle        5              5
2    0.0001           5             10.578      20.7      15.000
3    0.001            5             10.578      20.7      33.000
4    0.02             5             10.578      20.7      39.000
=====

```

APÊNDICE F – Resultados dos ensaios de citotoxicidade do DEET em organismos irradiados obtidos por meio do software TOXSTAT 3.4 (GULLEY, D.D. et al. 1991).

I Ensaio – 24 horas

```

vermelho neutro radiacao
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 64.0000 CALCULATED t VALUE = 0.4472
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 62.0000 DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 2.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 <2>,28> = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 <2>,28> = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad I Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
=====
EXPECTED 4.020 14.520 22.920 14.520 4.020
OBSERVED 3 14 17 26 0
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 14.9030
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277
Data FAIL normality test. Try another transformation.
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad I Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic <max Var/min Var> = 1.93
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 <alpha = 0.01>
Used for Table H ==> R <# groups> = 4, df <# reps-1> = 12
Actual values ==> R <# groups> = 4, df <# avg reps-1> = 14.00
=====
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad I Transform: NO TRANSFORMATION
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.98
=====
Table Chi-square value = 11.34 <alpha = 0.01, df = 3>
Table Chi-square value = 7.81 <alpha = 0.05, df = 3>
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad I Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION N MIN MAX MEAN
1 controle 15 45.000 75.000 64.000
2 0.0001 15 45.000 60.000 54.000
3 0.001 15 15.000 45.000 33.000
4 0.02 15 15.000 30.000 22.000
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad I Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION VARIANCE SD SEM C.V. %
1 controle 111.429 10.556 2.726 16.49
2 0.0001 57.857 7.606 1.964 14.09
3 0.001 70.714 8.409 2.171 25.48
4 0.02 60.000 7.746 2.000 35.21
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad I Transform: NO TRANSFORMATION
STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION TRANSFORMED RANK CRIT. df SIG
MEAN SUM VALUE
1 controle 64.000 175.50 182.00 15.00 *
2 0.0001 54.000 124.00 182.00 15.00 *
3 0.001 33.000 120.00 182.00 15.00 *
4 0.02 22.000 120.00 182.00 15.00 *
=====
Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

```

I Ensaio – 48 horas

```

vermelho neutro radiacao
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN = 61.0000 CALCULATED t VALUE = 0.4571
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN = 59.0000 DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 2.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2),28> = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2),28> = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
EXPECTED 4.020 14.520 22.920 14.520 4.020
OBSERVED 5 12 19 22 2
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 6.2151
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic <max Uar/min Uar> = 2.27
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 <alpha = 0.01>
Used for Table H ==> R <# groups> = 4, df <# reps-1> = 12
Actual values ==> R <# groups> = 4, df <# avg reps-1> = 14.00
=====
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 3.59
=====
Table Chi-square value = 11.34 <alpha = 0.01, df = 3>
Table Chi-square value = 7.81 <alpha = 0.05, df = 3>
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION N MIN MAX MEAN
1 controle 15 45.000 75.000 61.000
2 0.0001 15 30.000 60.000 51.000
3 0.001 15 15.000 60.000 33.000
4 0.02 15 0.000 45.000 22.000
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION VARIANCE SD SEM C.V. %
1 controle 111.429 10.556 2.726 17.30
2 0.0001 122.143 11.052 2.054 21.67
3 0.001 231.429 15.213 3.928 46.10
4 0.02 252.857 15.901 4.106 72.28
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION TRANSFORMED MEAN MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS T STAT SIG
1 controle 61.000 61.000
2 0.0001 51.000 51.000 2.044
3 0.001 33.000 33.000 5.724 *
4 0.02 22.000 22.000 7.973 *
=====
Dunnett table value = 2.13 <1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3>
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION NUM OF REPS Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS> % of CONTROL DIFFERENCE FROM CONTROL
1 controle 15
2 0.0001 15 10.419 17.1 10.000
3 0.001 15 10.419 17.1 20.000
4 0.02 15 10.419 17.1 39.000
=====

```

I Ensaio – 72 horas

```

vermelho neutro radiacao
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 49.0000 CALCULATED t VALUE = -0.1885
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 50.0000 DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = -1.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2),28> = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2),28> = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
=====
EXPECTED 3.752 13.552 21.392 13.552 3.752
OBSERVED 1 15 23 11 6
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 4.1216
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic <max Var/min Var> = 1.93
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 <alpha = 0.01>
Used for Table H ==> R <# groups> = 4, df <# reps-1> = 12
Actual values ==> R <# groups> = 4, df <# avg reps-1> = 13.00
=====
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.48
=====
Bartlett's test using average degrees of freedom
Calculated B2 statistic = 1.38
Based on average replicate size of 13.00
=====
Table Chi-square value = 11.34 <alpha = 0.01, df = 3>
Table Chi-square value = 7.81 <alpha = 0.05, df = 3>
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
Data PASS B2 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION N MIN MAX MEAN
1 controle 15 15.000 75.000 49.000
2 0.0001 15 30.000 60.000 43.000
3 0.001 12 15.000 45.000 26.250
4 0.02 14 0.000 45.000 19.286
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION VARIANCE SD SEM C.U. %
1 controle 240.000 15.492 4.000 31.62
2 0.0001 124.286 11.148 2.878 25.93
3 0.001 168.750 12.990 3.750 49.49
4 0.02 187.912 13.708 3.664 71.08
=====
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION
BONFERRONI t-TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION TRANSFORMED MEAN MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS T STAT SIG
1 controle 49.000 49.000
2 0.0001 43.000 43.000 1.222
3 0.001 26.250 26.250 4.369 *
4 0.02 19.286 19.286 5.947 *
=====
Bonferroni t table value = 2.19 <1 Tailed Value, P=0.05, df=50.3>
vn deet e rad I
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION
BONFERRONI t-TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION NUM OF REPS Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS> % of CONTROL DIFFERENCE FROM CONTROL
1 controle 15
2 0.0001 15 10.744 21.9 6.000
3 0.001 12 11.396 23.3 22.750
4 0.02 14 10.934 22.3 29.714
=====

```

II Ensaio – 24 horas

```

vermelho neutro com radiacao
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN = 62.0000 CALCULATED t VALUE = 1.1412
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN = 58.0000 DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 4.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2),28> = 2.048 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2),28> = 2.763 NO significant difference at alpha=0.01
vn deet e rad II
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
EXPECTED 4.020 14.520 22.920 14.520 4.020
OBSERVED 6 14 21 17 2
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.5933
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn deet e rad II
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic (max Uar/min Uar) = 1.45
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00
=====
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
vn deet e rad II
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 0.49
=====
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn deet e rad II
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION N MIN MAX MEAN
1 controle 15 45.000 75.000 62.000
2 0.0001 15 30.000 60.000 49.000
3 0.001 15 15.000 45.000 26.000
4 0.02 15 0.000 30.000 20.000
vn deet e rad II
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION VARIANCE SD SEM C.U. %
1 controle 124.286 11.148 2.878 17.98
2 0.0001 111.429 10.556 2.726 21.54
3 0.001 111.429 10.556 2.726 40.60
4 0.02 85.714 9.258 2.390 46.29
vn deet e rad II
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION TRANSFORMED MEAN MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS T STAT SIG
1 controle 62.000 62.000
2 0.0001 49.000 49.000 3.422 *
3 0.001 26.000 26.000 9.477 *
4 0.02 20.000 20.000 11.057 *
Dunnett table value = 2.13 <1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3>
vn deet e rad II
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION NUM OF REPS Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS> % of CONTROL DIFFERENCE FROM CONTROL
1 controle 15
2 0.0001 15 8.091 13.0 13.000
3 0.001 15 8.091 13.0 36.000
4 0.02 15 8.091 13.0 42.000

```

II Ensaio – 48 horas

```

vermelho neutro com radiacao
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORM

=====
t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CRIL> MEAN = 61.0000    CALCULATED t VALUE = 0.8874
GRP2 <BLANK CRIL> MEAN = 58.0000    DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 3.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2),28> = 2.048    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2),28> = 2.763    NO significant difference at alpha=0.01
=====
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
=====
EXPECTED    4.020    14.520    22.920    14.520    4.020
OBSERVED    3        26        10        18        3
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 17.7111
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data FAIL normality test. Try another transformation.
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 1.60
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00
=====
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 1.01
=====
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
-----
1    controle        15    45.000  75.000  61.000
2    0.0001            15    30.000  60.000  50.000
3    0.001             15    15.000  30.000  22.000
4    0.02              15    15.000  30.000  20.000
=====
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP  IDENTIFICATION  VARIANCE  SD    SEM    C.V. %
-----
1    controle        79.286    8.904  2.299  14.60
2    0.0001            85.714    9.258  2.390  18.52
3    0.001             60.000    7.746  2.000  35.21
4    0.02              53.571    7.319  1.890  36.60
=====
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST          -          Ho:Control<Treatment
=====
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED MEAN  RANK SUM  CRIT. VALUE  df  SIG
-----
1    controle        61.000    170.00    182.00    15.00  *
2    0.0001            50.000    120.00    182.00    15.00  *
3    0.001             22.000    120.00    182.00    15.00  *
4    0.02              20.000    120.00    182.00    15.00  *
=====
Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

```

II Ensaio – 72 horas

vermelho neutro com radiacao					
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM					
t-test of Solvent and Blank Controls				Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
=====					
GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN	=	50.0000	CALCULATED t VALUE	=	0.2758
GRP2 (BLANK CRTL) MEAN	=	49.0000	DEGREES OF FREEDOM	=	28
DIFFERENCE IN MEANS	=	1.0000			
=====					
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) = 2.048			NO significant difference at alpha=0.05		
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) = 2.763			NO significant difference at alpha=0.01		
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies					
=====					
INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	4.020	14.520	22.920	14.520	4.020
OBSERVED	4	14	20	19	3
=====					
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.0318					
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277					
Data PASS normality test. Continue analysis.					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
Hartley's test for homogeneity of variance					
=====					
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 1.33					
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)					
Used for Table H ==>	R (# groups) =	4,	df (# reps-1) =	12	
Actual values ==>	R (# groups) =	4,	df (# avg reps-1) =	14.00	
=====					
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
Bartlett's test for homogeneity of variance					
Calculated B1 statistic = 0.36					
=====					
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)					
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)					
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2					
=====					
GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	15	30.000	60.000	50.000
2	0.0001	15	30.000	60.000	40.000
3	0.001	15	0.000	30.000	19.000
4	0.02	15	0.000	30.000	15.000
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2					
=====					
GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	85.714	9.258	2.390	18.52
2	0.0001	85.714	9.258	2.390	23.15
3	0.001	79.286	8.904	2.299	46.86
4	0.02	64.286	8.018	2.070	53.45
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment					
=====					
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	50.000	50.000		
2	0.0001	40.000	40.000	3.086	*
3	0.001	19.000	19.000	9.567	*
4	0.02	15.000	15.000	10.801	*
=====					
Dunnett table value = 2.13 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3)					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment					
=====					
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	15			
2	0.0001	15	6.902	13.8	10.000
3	0.001	15	6.902	13.8	31.000
4	0.02	15	6.902	13.8	35.000
=====					

III Ensaio – 24 horas

```

vermelho neutro com radiacao
File: vn rad          Transform: NO TRANSFORM
=====
t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
=====
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN = 60.0000    CALCULATED t VALUE = 0.3669
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN = 50.0000    DEGREES OF FREEDOM = 28
DIFFERENCE IN MEANS = 2.0000
=====
TABLE t VALUE <0.05 (2),28> = 2.048    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE <0.01 (2),28> = 2.763    NO significant difference at alpha=0.01
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
=====
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
=====
EXPECTED    4.020    14.520    22.920    14.520    4.020
OBSERVED     6        18        14        21        1
=====
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 10.4414
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
=====
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 3.00
Closest, conservative, Table H statistic = 6.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 12
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 14.00
=====
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 4.92
=====
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.01 (alpha = 0.05, df = 3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION    N    MIN    MAX    MEAN
=====
1    controle    15    30.000    90.000    60.000
2    0.0001    15    30.000    60.000    50.000
3    0.001    15    0.000    45.000    27.000
4    0.02    15    0.000    30.000    18.000
=====
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2
=====
GRP IDENTIFICATION    VARIANCE    SD    SEM    C.U. %
=====
1    controle    257.143    16.036    4.140    26.73
2    0.0001    85.714    9.258    2.390    18.52
3    0.001    231.429    15.213    3.928    56.34
4    0.02    135.000    11.619    3.000    64.55
=====
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2          Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION    TRANSFORMED MEAN    MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS    T STAT    SIG
=====
1    controle    60.000    60.000
2    0.0001    50.000    50.000    2.057
3    0.001    27.000    27.000    6.787 *
4    0.02    18.000    18.000    8.638 *
=====
Dunnett table value = 2.13 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3)
vn deet e rad
File: vn deet e rad    Transform: NO TRANSFORMATION
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2          Ho:Control<Treatment
=====
GROUP IDENTIFICATION    NUM OF REPS    Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>    % of CONTROL    DIFFERENCE FROM CONTROL
=====
1    controle    15
2    0.0001    15    10.357    17.3    10.000
3    0.001    15    10.357    17.3    33.000
4    0.02    15    10.357    17.3    42.000
=====

```

III Ensaio – 48 horas

vermelho neutro com radiacao					
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM					
t-test of Solvent and Blank Controls			Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN		
=====					
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN	=	57.0000	CALCULATED t VALUE	=	0.2870
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN	=	56.0000	DEGREES OF FREEDOM	=	28
DIFFERENCE IN MEANS	=	1.0000			
=====					
TABLE t VALUE <0.05 <2>,28> = 2.048			NO significant difference at alpha=0.05		
TABLE t VALUE <0.01 <2>,28> = 2.763			NO significant difference at alpha=0.01		
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies					
=====					
INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	4.020	14.520	22.920	14.520	4.020
OBSERVED	6	10	27	16	1
=====					
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 5.5282					
Table Chi-Square value <alpha = 0.01> = 13.277					
Data PASS normality test. Continue analysis.					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
Hartley's test for homogeneity of variance					
=====					
Calculated H statistic <max Var/min Var> =			2.94		
Closest, conservative, Table H statistic =			6.9 <alpha = 0.01>		
Used for Table H ==>	R <# groups> =	4,	df <# reps-1> =	12	
Actual values ==>	R <# groups> =	4,	df <# avg reps-1> =	14.00	
=====					
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
Bartlett's test for homogeneity of variance					
Calculated B1 statistic = 4.00					
=====					
Table Chi-square value = 11.34 <alpha = 0.01, df = 3>					
Table Chi-square value = 7.81 <alpha = 0.05, df = 3>					
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2					
=====					
GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	15	45.000	75.000	57.000
2	0.0001	15	30.000	60.000	49.000
3	0.001	15	0.000	45.000	26.000
4	0.02	15	0.000	30.000	18.000
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2					
=====					
GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	70.714	8.409	2.171	14.75
2	0.0001	111.429	10.556	2.726	21.54
3	0.001	207.857	14.417	3.723	55.45
4	0.02	135.000	11.619	3.000	64.55
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment					
=====					
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	57.000	57.000		
2	0.0001	49.000	49.000	1.912	
3	0.001	26.000	26.000	7.410	*
4	0.02	18.000	18.000	9.323	*
=====					
Dunnett table value = 2.13 <1 Tailed Value, P=0.05, df=40,3>					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment					
=====					
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	15			
2	0.0001	15	8.910	15.6	8.000
3	0.001	15	8.910	15.6	31.000
4	0.02	15	8.910	15.6	39.000
=====					

III Ensaio – 72 horas

vermelho neutro com radiacao					
File: vn rad Transform: NO TRANSFORM					
t-test of Solvent and Blank Controls			Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN		
=====					
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN	=	57.0000	CALCULATED t VALUE	=	1.3868
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN	=	52.0000	DEGREES OF FREEDOM	=	28
DIFFERENCE IN MEANS	=	5.0000			
=====					
TABLE t VALUE <0.05 (2),28> = 2.048			NO significant difference at alpha=0.05		
TABLE t VALUE <0.01 (2),28> = 2.763			NO significant difference at alpha=0.01		
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies					
=====					
INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	3.953	14.278	22.538	14.278	3.953
OBSERVED	2	13	30	7	7
=====					
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 9.6083					
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277					
Data PASS normality test. Continue analysis.					
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
Hartley's test for homogeneity of variance					
=====					
Calculated H statistic (max Var/min Var) =			2.81		
Closest, conservative, Table H statistic =			6.9 (alpha = 0.01)		
Used for Table H ==>	R <# groups> =	4,	df <# reps-1> =	12	
Actual values ==>	R <# groups> =	4,	df <# avg reps-1> =	13.75	
			(average df used)		
=====					
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.					
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
Bartlett's test for homogeneity of variance					
Calculated B1 statistic = 3.98					
=====					
Bartlett's test using average degrees of freedom					
Calculated B2 statistic = 4.05					
Based on average replicate size of 13.75					
=====					
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)					
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)					
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.					
Data PASS B2 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.					
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2					
=====					
GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	15	45.000	75.000	57.000
2	0.0001	15	30.000	60.000	46.000
3	0.001	14	0.000	45.000	19.286
4	0.02	15	0.000	30.000	14.000
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2					
=====					
GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	102.857	10.142	2.619	17.79
2	0.0001	79.286	8.904	2.299	19.36
3	0.001	222.527	14.917	3.987	77.35
4	0.02	143.571	11.982	3.094	85.59
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
BONFERRONI t-TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment					
=====					
GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	57.000	57.000		
2	0.0001	46.000	46.000	2.588	*
3	0.001	19.286	19.286	8.718	*
4	0.02	14.000	14.000	10.116	*
=====					
Bonferroni t table value = 2.19 (1 Tailed Value, P=0.05, df=50,3)					
=====					
vn deet e rad					
File: vn deet e rad Transform: NO TRANSFORMATION					
BONFERRONI t-TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment					
=====					
GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	15			
2	0.0001	15	9.302	16.3	11.000
3	0.001	14	9.467	16.6	37.714
4	0.02	15	9.302	16.3	43.000

APÊNDICE G – Resultados dos ensaios de citotoxicidade em organismos irradiados e não irradiados obtidos por meio do software TOXSTAT 3.4 (GULLEY, D.D. et al. 1991).

I Ensaio

radiacao File: rad Transform: NO TRANSFORM			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	61.0000	CALCULATED t VALUE =	3.0464
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	39.0000	DEGREES OF FREEDOM =	28
DIFFERENCE IN MEANS =	22.0000		
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) =	2.048	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) =	2.763	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10	
radiacao File: rad Transform: NO TRANSFORM			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	56.0000	CALCULATED t VALUE =	3.3158
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	39.0000	DEGREES OF FREEDOM =	28
DIFFERENCE IN MEANS =	17.0000		
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) =	2.048	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) =	2.763	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10	
radiacao File: rad Transform: NO TRANSFORM			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	50.0000	CALCULATED t VALUE =	2.3155
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	38.0000	DEGREES OF FREEDOM =	28
DIFFERENCE IN MEANS =	12.0000		
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) =	2.048	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) =	2.763	NO significant difference at alpha=0.01	

II Ensaio

radiacao File: rad Transform: NO TRANSFORM			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	56.0000	CALCULATED t VALUE =	7.3770
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	23.0000	DEGREES OF FREEDOM =	28
DIFFERENCE IN MEANS =	33.0000		
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) =	2.048	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) =	2.763	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10	
radiacao File: rad Transform: NO TRANSFORM			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	52.0000	CALCULATED t VALUE =	5.6831
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	25.0000	DEGREES OF FREEDOM =	28
DIFFERENCE IN MEANS =	27.0000		
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) =	2.048	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) =	2.763	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10	
radiacao File: rad Transform: NO TRANSFORM			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	50.0000	CALCULATED t VALUE =	4.1021
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	25.0000	DEGREES OF FREEDOM =	28
DIFFERENCE IN MEANS =	25.0000		
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) =	2.048	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) =	2.763	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10	

III Ensaio

radiacao File: rad Transform: NO TRANSFORM			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	50.0000	CALCULATED t VALUE =	4.9136
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	26.0000	DEGREES OF FREEDOM =	28
DIFFERENCE IN MEANS =	24.0000		
TABLE t VALUE (0.05 (2),28) =	2.048	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE (0.01 (2),28) =	2.763	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10	
radiacao File: rad Transform: NO TRANSFORM			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	51.0000	CALCULATED t VALUE =	5.0527
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	26.7857	DEGREES OF FREEDOM =	27
DIFFERENCE IN MEANS =	24.2143		
TABLE t VALUE (0.05 (2),27) =	2.052	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE (0.01 (2),27) =	2.771	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10	
radiacao File: rad Transform: NO TRANSFORM			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	49.0000	CALCULATED t VALUE =	5.9676
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	20.7692	DEGREES OF FREEDOM =	26
DIFFERENCE IN MEANS =	28.2308		
TABLE t VALUE (0.05 (2),26) =	2.056	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE (0.01 (2),26) =	2.779	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10	

APÊNDICE H – Resultados dos testes de estimativa pontual para cálculo da CI25 e CI50 em organismos irradiados e não irradiados obtidos por meio do software ICP.

Ensaio I – Organismos não irradiados

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 09/03/12 Test Ending Date: 10/03/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 24 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	66.000	7.606	66.000
2	15	0.100	58.000	11.148	58.000
3	15	1.000	36.000	9.487	36.000
4	15	20.000	26.000	6.866	26.000
The Linear Interpolation Estimate: 0.4477 Entered P Value: 25					
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.4366 Standard Deviation: 0.1002					
Original Confidence Limits: Lower: 0.2500 Upper: 0.6106					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -43122638					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 09/03/12 Test Ending Date: 10/03/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 24 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	66.000	7.606	66.000
2	15	0.100	58.000	11.148	58.000
3	15	1.000	36.000	9.487	36.000
4	15	20.000	26.000	6.866	26.000
The Linear Interpolation Estimate: 6.7000 Entered P Value: 50					
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 5.7248 Standard Deviation: 3.3663					
Original Confidence Limits: Lower: 0.9300 Upper: 11.0938					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -399106190					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 09/03/12 Test Ending Date: 11/03/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 48 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	62.000	7.746	62.000
2	15	0.100	56.000	8.904	56.000
3	15	1.000	38.000	7.746	38.000
4	15	20.000	28.000	9.599	28.000
The Linear Interpolation Estimate: 0.5750 Entered P Value: 25					
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.5507 Standard Deviation: 0.1033					
Original Confidence Limits: Lower: 0.3250 Upper: 0.7221					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -33721884					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 09/03/12 Test Ending Date: 11/03/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 48 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	62.000	7.746	62.000
2	15	0.100	56.000	8.904	56.000
3	15	1.000	38.000	7.746	38.000
4	15	20.000	28.000	9.599	28.000
The Linear Interpolation Estimate: 14.3000 Entered P Value: 50					
Number of Resamplings: 80 74 Resamples Generated					
Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -800904412					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 09/03/12 Test Ending Date: 12/03/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 72 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	54.000	7.606	54.000
2	15	0.100	49.000	6.866	49.000
3	15	1.000	24.000	11.052	24.000
4	15	20.000	18.000	8.409	18.000
The Linear Interpolation Estimate: 0.4060 Entered P Value: 25					
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.4061 Standard Deviation: 0.0773					
Original Confidence Limits: Lower: 0.2721 Upper: 0.5821					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 813666021					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 09/03/12 Test Ending Date: 12/03/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 72 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	54.000	7.606	54.000
2	15	0.100	49.000	6.866	49.000
3	15	1.000	24.000	11.052	24.000
4	15	20.000	18.000	8.409	18.000
The Linear Interpolation Estimate: 0.8920 Entered P Value: 50					
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 1.2042 Standard Deviation: 1.1552					
Original Confidence Limits: Lower: 0.7407 Upper: 5.4333					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 21191973					

Ensaio II – Organismos não irradiados

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: DEET
 Test Start Date: 13/03/12 Test Ending Date: 14/03/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 24 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	57.000	10.142	57.000
2	15	0.100	52.000	11.148	52.000
3	15	1.000	33.000	10.142	33.000
4	15	20.000	22.000	12.507	22.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.5382 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.5514 Standard Deviation: 0.1371
 Original Confidence Limits: Lower: 0.2625 Upper: 0.8023
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 679975853

Toxicant/Effluent: DEET
 Test Start Date: 13/03/12 Test Ending Date: 14/03/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 24 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	57.000	10.142	57.000
2	15	0.100	52.000	11.148	52.000
3	15	1.000	33.000	10.142	33.000
4	15	20.000	22.000	12.507	22.000

The Linear Interpolation Estimate: 8.7227 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 75 Resamples Generated
 Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.
 The Bootstrap Estimates Mean: 8.5700 Standard Deviation: 4.0919
 No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 496527469

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: DEET
 Test Start Date: 13/03/12 Test Ending Date: 15/03/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 48 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	60.000	13.887	60.000
2	15	0.100	53.000	7.746	53.000
3	15	1.000	34.000	11.982	34.000
4	15	20.000	24.000	13.654	24.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.4789 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.4844 Standard Deviation: 0.1350
 Original Confidence Limits: Lower: 0.2286 Upper: 0.7618
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 396753910

Toxicant/Effluent: DEET
 Test Start Date: 13/03/12 Test Ending Date: 15/03/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 48 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	60.000	13.887	60.000
2	15	0.100	53.000	7.746	53.000
3	15	1.000	34.000	11.982	34.000
4	15	20.000	24.000	13.654	24.000

The Linear Interpolation Estimate: 8.6000 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 79 Resamples Generated
 Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.
 The Bootstrap Estimates Mean: 8.3844 Standard Deviation: 5.0639
 No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 55127862

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: DEET
 Test Start Date: 13/03/12 Test Ending Date: 16/03/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 72 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	57.000	10.142	57.000
2	15	0.100	52.000	9.599	52.000
3	15	1.000	27.000	15.213	27.000
4	15	20.000	19.000	8.904	19.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.4330 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.4288 Standard Deviation: 0.0981
 Original Confidence Limits: Lower: 0.2174 Upper: 0.5950
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 186393350

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: DEET
 Test Start Date: 13/03/12 Test Ending Date: 16/03/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 72 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	57.000	10.142	57.000
2	15	0.100	52.000	9.599	52.000
3	15	1.000	27.000	15.213	27.000
4	15	20.000	19.000	8.904	19.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.9460 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 2.2904 Standard Deviation: 2.5797
 Original Confidence Limits: Lower: 0.7429 Upper: 9.6364
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -1530681786

Ensaio III – Organismos não irradiados

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 17/03/12 Test Ending Date: 18/03/12					
Test Species: Perna perna					
Test Duration: 24 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	59.000	11.982	59.000
2	15	0.100	54.000	7.606	54.000
3	15	1.000	34.000	18.342	34.000
4	15	20.000	21.000	18.632	21.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.5387	Entered P Value: 25	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.5661 Standard Deviation: 0.1774					
Original Confidence Limits: Lower: 0.2714 Upper: 0.8875					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -253329274					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 17/03/12 Test Ending Date: 18/03/12					
Test Species: Perna perna					
Test Duration: 24 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	59.000	11.982	59.000
2	15	0.100	54.000	7.606	54.000
3	15	1.000	34.000	18.342	34.000
4	15	20.000	21.000	18.632	21.000
The Linear Interpolation Estimate:			7.5769	Entered P Value: 50	
Number of Resamplings: 80 73 Resamples Generated					
Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.					
The Bootstrap Estimates Mean: 6.0140 Standard Deviation: 4.4997					
No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 1002013638					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 17/03/12 Test Ending Date: 19/03/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 48 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	62.000	11.148	62.000
2	15	0.100	53.000	7.746	53.000
3	15	1.000	30.000	13.887	30.000
4	15	20.000	25.000	13.496	25.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.3543	Entered P Value: 25	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.3831 Standard Deviation: 0.1196					
Original Confidence Limits: Lower: 0.2013 Upper: 0.6203					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 119853135					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 17/03/12 Test Ending Date: 19/03/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 48 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	62.000	11.148	62.000
2	15	0.100	53.000	7.746	53.000
3	15	1.000	30.000	13.887	30.000
4	15	20.000	25.000	13.496	25.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.9609	Entered P Value: 50	
Number of Resamplings: 80 79 Resamples Generated					
Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.					
The Bootstrap Estimates Mean: 3.8166 Standard Deviation: 4.1843					
No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.					
Resampling time in Seconds: 0.06 Random_Seed: -1991749489					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 17/03/12 Test Ending Date: 20/03/12					
Test Species: PernaPerna					
Test Duration: 72 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	58.000	11.148	58.000
2	15	0.100	49.000	8.904	49.000
3	15	1.000	24.000	7.606	24.000
4	15	20.000	17.000	11.148	17.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.2980	Entered P Value: 25	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.2835 Standard Deviation: 0.0944					
Original Confidence Limits: Lower: 0.0983 Upper: 0.4667					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 421683160					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET					
Test Start Date: 17/03/12 Test Ending Date: 20/03/12					
Test Species: PernaPerna					
Test Duration: 72 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	58.000	11.148	58.000
2	15	0.100	49.000	8.904	49.000
3	15	1.000	24.000	7.606	24.000
4	15	20.000	17.000	11.148	17.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.0200	Entered P Value: 50	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.0400 Standard Deviation: 0.1449					
Original Confidence Limits: Lower: 0.6932 Upper: 0.9827					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 2073107736					

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 14/05/12 Test Ending Date: 15/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 24 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	64.000	10.556	64.000
2	15	0.100	54.000	7.606	54.000
3	15	1.000	33.000	8.409	33.000
4	15	20.000	22.000	7.746	22.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.3571	Entered P Value: 25	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.3482 Standard Deviation: 0.1033					
Original Confidence Limits: Lower: 0.1587 Upper: 0.5304					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 127919453					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 14/05/12 Test Ending Date: 15/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 24 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	64.000	10.556	64.000
2	15	0.100	54.000	7.606	54.000
3	15	1.000	33.000	8.409	33.000
4	15	20.000	22.000	7.746	22.000
The Linear Interpolation Estimate:			2.7273	Entered P Value: 50	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 3.1321 Standard Deviation: 2.4782					
Original Confidence Limits: Lower: 0.8667 Upper: 8.9167					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -2895871075					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 14/05/12 Test Ending Date: 16/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 48 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	61.000	10.556	61.000
2	15	0.100	51.000	11.052	51.000
3	15	1.000	33.000	15.213	33.000
4	15	20.000	22.000	15.901	22.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.3625	Entered P Value: 25	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.4413 Standard Deviation: 0.4501					
Original Confidence Limits: Lower: 0.0984 Upper: 0.7485					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 4885990					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 14/05/12 Test Ending Date: 16/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 48 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	61.000	10.556	61.000
2	15	0.100	51.000	11.052	51.000
3	15	1.000	33.000	15.213	33.000
4	15	20.000	22.000	15.901	22.000
The Linear Interpolation Estimate:			5.3182	Entered P Value: 50	
Number of Resamplings: 80 79 Resamples Generated					
Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.					
The Bootstrap Estimates Mean: 5.0740 Standard Deviation: 4.5233					
No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.					
Resampling time in Seconds: 0.05 Random_Seed: 1679192358					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 14/05/12 Test Ending Date: 17/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 72 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	49.000	15.492	49.000
2	15	0.100	43.000	11.148	43.000
3	12	1.000	26.250	12.990	26.250
4	14	20.000	19.286	13.708	19.286
The Linear Interpolation Estimate:			0.4358	Entered P Value: 25	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.4853 Standard Deviation: 0.3712					
Original Confidence Limits: Lower: 0.0900 Upper: 0.8557					
Resampling time in Seconds: 0.06 Random_Seed: 339922440					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 14/05/12 Test Ending Date: 17/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 72 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	49.000	15.492	49.000
2	15	0.100	43.000	11.148	43.000
3	12	1.000	26.250	12.990	26.250
4	14	20.000	19.286	13.708	19.286
The Linear Interpolation Estimate:			5.7744	Entered P Value: 50	
Number of Resamplings: 80 75 Resamples Generated					
Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.					
The Bootstrap Estimates Mean: 5.5916 Standard Deviation: 5.0120					
No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.					
Resampling time in Seconds: 0.05 Random_Seed: 2037152904					

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 21/05/12 Test Ending Date: 22/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 24 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	62.000	11.148	62.000
2	15	0.100	49.000	10.556	49.000
3	15	1.000	26.000	10.556	26.000
4	15	20.000	20.000	9.258	20.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.1978	Entered P Value: 25	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.2088 Standard Deviation: 0.1082					
Original Confidence Limits: Lower: 0.0813 Upper: 0.4522					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -12186416					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 21/05/12 Test Ending Date: 22/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 24 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	62.000	11.148	62.000
2	15	0.100	49.000	10.556	49.000
3	15	1.000	26.000	10.556	26.000
4	15	20.000	20.000	9.258	20.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.8043	Entered P Value: 50	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 1.0703 Standard Deviation: 1.0004					
Original Confidence Limits: Lower: 0.6100 Upper: 4.6538					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -1627577840					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 21/05/12 Test Ending Date: 23/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 48 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	61.000	8.904	61.000
2	15	0.100	50.000	9.258	50.000
3	15	1.000	22.000	7.746	22.000
4	15	20.000	20.000	7.319	20.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.2366	Entered P Value: 25	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.2518 Standard Deviation: 0.0704					
Original Confidence Limits: Lower: 0.0926 Upper: 0.3672					
Resampling time in Seconds: 0.05 Random_Seed: -293108592					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 21/05/12 Test Ending Date: 23/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 48 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	61.000	8.904	61.000
2	15	0.100	50.000	9.258	50.000
3	15	1.000	22.000	7.746	22.000
4	15	20.000	20.000	7.319	20.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.7268	Entered P Value: 50	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.7370 Standard Deviation: 0.0670					
Original Confidence Limits: Lower: 0.6167 Upper: 0.8833					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 1037130192					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 21/05/12 Test Ending Date: 24/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 72 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	50.000	9.258	50.000
2	15	0.100	40.000	9.258	40.000
3	15	1.000	19.000	8.904	19.000
4	15	20.000	15.000	8.018	15.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.2071	Entered P Value: 25	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.2118 Standard Deviation: 0.1057					
Original Confidence Limits: Lower: 0.0820 Upper: 0.4202					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -242597355					
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***					
Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados					
Test Start Date: 21/05/12 Test Ending Date: 24/05/12					
Test Species: Perna Perna					
Test Duration: 72 horas					
DATA FILE:					
Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgramal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	50.000	9.258	50.000
2	15	0.100	40.000	9.258	40.000
3	15	1.000	19.000	8.904	19.000
4	15	20.000	15.000	8.018	15.000
The Linear Interpolation Estimate:			0.7429	Entered P Value: 50	
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated					
The Bootstrap Estimates Mean: 0.7459 Standard Deviation: 0.0930					
Original Confidence Limits: Lower: 0.5000 Upper: 0.9156					
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -1619984299					

Ensaio III – Organismos irradiados

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados
 Test Start Date: 28/05/12 Test Ending Date: 29/05/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 24 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgranal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	60.000	16.036	60.000
2	15	0.100	50.000	9.258	50.000
3	15	1.000	27.000	15.213	27.000
4	15	20.000	18.000	11.619	18.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.2957 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.2856 Standard Deviation: 0.1283
 Original Confidence Limits: Lower: 0.0917 Upper: 0.5500
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -66184664

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados
 Test Start Date: 28/05/12 Test Ending Date: 29/05/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 24 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgranal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	60.000	16.036	60.000
2	15	0.100	50.000	9.258	50.000
3	15	1.000	27.000	15.213	27.000
4	15	20.000	18.000	11.619	18.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.8826 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 1.9539 Standard Deviation: 2.4580
 Original Confidence Limits: Lower: 0.6538 Upper: 9.1429
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -1613404312

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados
 Test Start Date: 28/05/12 Test Ending Date: 30/05/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 48 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgranal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	57.000	8.409	57.000
2	15	0.100	49.000	10.556	49.000
3	15	1.000	26.000	14.417	26.000
4	15	20.000	18.000	11.619	18.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.3446 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.3349 Standard Deviation: 0.1123
 Original Confidence Limits: Lower: 0.1180 Upper: 0.5304
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -842577692

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados
 Test Start Date: 28/05/12 Test Ending Date: 30/05/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 48 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgranal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	57.000	8.409	57.000
2	15	0.100	49.000	10.556	49.000
3	15	1.000	26.000	14.417	26.000
4	15	20.000	18.000	11.619	18.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.9022 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 1.6707 Standard Deviation: 1.9762
 Original Confidence Limits: Lower: 0.7231 Upper: 6.1154
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -1984953820

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados
 Test Start Date: 28/05/12 Test Ending Date: 31/05/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 72 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgranal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	57.000	10.142	57.000
2	15	0.100	46.000	8.904	46.000
3	14	1.000	19.286	14.917	19.286
4	15	20.000	14.000	11.982	14.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.2095 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.2125 Standard Deviation: 0.0835
 Original Confidence Limits: Lower: 0.0853 Upper: 0.3545
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 933324

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: DEET com organismos irradiados
 Test Start Date: 28/05/12 Test Ending Date: 31/05/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 72 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration microgranal	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	57.000	10.142	57.000
2	15	0.100	46.000	8.904	46.000
3	14	1.000	19.286	14.917	19.286
4	15	20.000	14.000	11.982	14.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.6896 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.7543 Standard Deviation: 0.5454
 Original Confidence Limits: Lower: 0.5494 Upper: 0.9034
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -1871929764

Ensaio I – Organismos irradiados (sem DEET)

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
Test Start Date: 26/03/12 Test Ending Date: 27/03/12
Test Species: Perna Perna
Test Duration: 24 horas
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	61.000	15.492	61.000
2	15	10.700	39.000	15.834	39.000

*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the input data since none of the (possibly pooled) group response means were less than 50% of the control response mean.

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
Test Start Date: 26/03/12 Test Ending Date: 27/03/12
Test Species: Perna Perna
Test Duration: 24 horas
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	61.000	15.492	61.000
2	15	10.700	39.000	15.834	39.000

The Linear Interpolation Estimate: 7.4170 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 73 Resamples Generated

Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.
The Bootstrap Estimates Mean: 7.3039 Standard Deviation: 1.2884

No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.

Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 552798642

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
Test Start Date: 26/03/12 Test Ending Date: 28/03/12
Test Species: Perna Perna
Test Duration: 48 horas
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	56.000	11.982	56.000
2	15	10.700	39.000	15.834	39.000

*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the input data since none of the (possibly pooled) group response means were less than 50% of the control response mean.

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
Test Start Date: 26/03/12 Test Ending Date: 28/03/12
Test Species: Perna Perna
Test Duration: 48 horas
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	56.000	11.982	56.000
2	15	10.700	39.000	15.834	39.000

The Linear Interpolation Estimate: 8.8118 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 50 Resamples Generated

Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.
The Bootstrap Estimates Mean: 7.9023 Standard Deviation: 1.1858

No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.

Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -121532177

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
Test Start Date: 26/03/12 Test Ending Date: 29/03/12
Test Species: Perna Perna
Test Duration: 72 horas
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	50.000	12.247	50.000
2	15	10.700	38.000	15.901	38.000

*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the input data since none of the (possibly pooled) group response means were less than 50% of the control response mean.

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***

Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
Test Start Date: 26/03/12 Test Ending Date: 29/03/12
Test Species: Perna Perna
Test Duration: 72 horas
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	50.000	12.247	50.000
2	15	10.700	38.000	15.901	38.000

*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the input data since none of the (possibly pooled) group response means were less than 75% of the control response mean.

Ensaio II – Organismos irradiados (sem DEET)

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***						
Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co						
Test Start Date: 02/04/12 Test Ending Date: 03/04/12						
Test Species: Perna Perna						
Test Duration: 24 horas						
DATA FILE:						
Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means	
1	15	0.000	56.000	8.904	56.000	
2	15	10.700	23.000	14.856	23.000	
The Linear Interpolation Estimate:			4.5394	Entered P Value: 25		
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated						
The Bootstrap Estimates Mean: 4.6123 Standard Deviation: 0.5720						
Original Confidence Limits: Lower: 3.8214 Upper: 5.8850						
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 135655624						
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***						
Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co						
Test Start Date: 02/04/12 Test Ending Date: 03/04/12						
Test Species: Perna Perna						
Test Duration: 24 horas						
DATA FILE:						
Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means	
1	15	0.000	56.000	8.904	56.000	
2	15	10.700	23.000	14.856	23.000	
The Linear Interpolation Estimate:			9.0788	Entered P Value: 50		
Number of Resamplings: 80 75 Resamples Generated						
Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.						
The Bootstrap Estimates Mean: 8.9076 Standard Deviation: 0.8005						
No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.						
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 1520721768						
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***						
Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co						
Test Start Date: 02/04/12 Test Ending Date: 04/04/12						
Test Species: Perna Perna						
Test Duration: 48 horas						
DATA FILE:						
Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means	
1	15	0.000	52.000	12.507	52.000	
2	15	10.700	25.000	13.496	25.000	
The Linear Interpolation Estimate:			5.1519	Entered P Value: 25		
Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated						
The Bootstrap Estimates Mean: 5.2092 Standard Deviation: 0.7191						
Original Confidence Limits: Lower: 4.1341 Upper: 6.6875						
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -466222716						
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***						
Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co						
Test Start Date: 02/04/12 Test Ending Date: 04/04/12						
Test Species: Perna Perna						
Test Duration: 48 horas						
DATA FILE:						
Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means	
1	15	0.000	52.000	12.507	52.000	
2	15	10.700	25.000	13.496	25.000	
The Linear Interpolation Estimate:			10.3037	Entered P Value: 50		
Number of Resamplings: 80 42 Resamples Generated						
Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.						
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 1465820708						
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***						
Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co						
Test Start Date: 02/04/12 Test Ending Date: 05/04/12						
Test Species: Perna perna						
Test Duration: 72 horas						
DATA FILE:						
Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means	
1	15	0.000	50.000	15.698	50.000	
2	15	10.700	25.000	17.627	25.000	
The Linear Interpolation Estimate:			5.3500	Entered P Value: 25		
Number of Resamplings: 80 79 Resamples Generated						
Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.						
The Bootstrap Estimates Mean: 5.5202 Standard Deviation: 1.2540						
No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.						
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -422042500						
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***						
Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co						
Test Start Date: 02/04/12 Test Ending Date: 05/04/12						
Test Species: Perna perna						
Test Duration: 72 horas						
DATA FILE:						
Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means	
1	15	0.000	50.000	15.698	50.000	
2	15	10.700	25.000	17.627	25.000	
*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the input data since none of the (possibly pooled) group response means were less than 50% of the control response mean.						

Ensaio III – Organismos irradiados (sem DEET)

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
 Test Start Date: 09/04/12 Test Ending Date: 10/04/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 24 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	50.000	13.496	50.000
2	15	10.700	26.000	13.256	26.000

The Linear Interpolation Estimate: 5.5729 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 79 Resamples Generated
 Those resamples not used had estimates
 above the highest concentration/ %Effluent.
 The Bootstrap Estimates Mean: 5.7141 Standard Deviation: 1.0352

No Confidence Limits can be produced since the number of resamples
 generated is not a multiple of 40.
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 29477100

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
 Test Start Date: 09/04/12 Test Ending Date: 10/04/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 24 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	50.000	13.496	50.000
2	15	10.700	26.000	13.256	26.000

*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the
 input data since none of the (possibly pooled) group response means
 were less than 50% of the control response mean.

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
 Test Start Date: 09/04/12 Test Ending Date: 11/04/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 48 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	51.000	9.487	51.000
2	14	10.700	26.786	15.764	26.786

The Linear Interpolation Estimate: 5.6341 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 5.7623 Standard Deviation: 1.0442
 Original Confidence Limits: Lower: 4.3432 Upper: 7.8095
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 448044397

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
 Test Start Date: 09/04/12 Test Ending Date: 11/04/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 48 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	51.000	9.487	51.000
2	14	10.700	26.786	15.764	26.786

*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the
 input data since none of the (possibly pooled) group response means
 were less than 50% of the control response mean.

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
 Test Start Date: 09/04/12 Test Ending Date: 12/04/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 72 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	49.000	10.556	49.000
2	13	10.700	20.769	14.412	20.769

The Linear Interpolation Estimate: 4.6430 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 4.7348 Standard Deviation: 0.6735
 Original Confidence Limits: Lower: 3.7896 Upper: 6.1445
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 284147094

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Radiacao gama de 60-Co
 Test Start Date: 09/04/12 Test Ending Date: 12/04/12
 Test Species: Perna Perna
 Test Duration: 72 horas
 DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	15	0.000	49.000	10.556	49.000
2	13	10.700	20.769	14.412	20.769

The Linear Interpolation Estimate: 9.2860 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 65 Resamples Generated
 Those resamples not used had estimates
 above the highest concentration/ %Effluent.
 The Bootstrap Estimates Mean: 9.1312 Standard Deviation: 0.8968

No Confidence Limits can be produced since the number of resamples
 generated is not a multiple of 40.
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -645117226