

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Estatística
Especialização em Estatística

KAUANA SANTOS DE LIMA CIPRIANO

Avaliação da influência do efeito do gengibre nas variáveis hematológicas de peixe

Belo Horizonte
2017

Kauana Santos de Lima Cipriano

Avaliação da influência do efeito do gengibre nas variáveis hematológicas de peixe

Versão final

Monografia apresentada ao Programa de Pós Graduação em Estatística da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de especialista em Estatística Aplicada.

Orientador: Prof Dr. Gregorio Saravia
Atuncar

Belo Horizonte

2017

2017, Kauana Santos Lima Cipriano
Todos os direitos reservados

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Belkiz Inez Rezende
Costa CRB 6ª Região nº 1510

Cipriano, Kauana Santos Lima

C577a Avaliação da influência do efeito do gengibre nas
variáveis hematológicas de peixe/ Kauana Santos Lima
Cipriano.— Belo Horizonte, 2017.
xi,33f. . il.; 29 cm.

Monografia (especialização) - Universidade Federal
de Minas Gerais – Departamento de Estatística.

Orientador: Gregorio Saravia Atuncar

1. Estatística. 2. Gengibre.3. Hematologia .4. Análise
de variância.5. Treinamento da voz. I. Orientador. II.
Título.

CDU 519.2 (043)



Universidade Federal de Minas Gerais
 Instituto de Ciências Exatas
 Departamento de Estatística
 Programa de Pós-Graduação / Especialização
 Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG

E-mail: pgest@ufmg.br
 Tel: 3409-5923 – FAX: 3409-5924

ATA DO 171º. TRABALHO DE FIM DE CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ESTATÍSTICA DA ALUNA KAUANA SANTOS DE LIMA CIPRIANO.

Aos dezesseis dias do mês de novembro de 2017, às 15:00 horas, na Sala 2025 do Instituto de Ciências Exatas, reuniram-se os professores abaixo relacionados, formando a Comissão Examinadora homologada pela Comissão do Curso de Especialização em Estatística, para julgar a apresentação do trabalho de fim de curso da aluna **Kauana Santos de Lima Cipriano**, intitulado: “**Avaliação da Influência do Efeito do Gengibre nas Variáveis Hematológicas do Peixe**”, como requisito para obtenção do Grau de Especialista em Estatística. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Gregório Saravia Atuncar, Orientador, após dar conhecimento aos presentes do teor das normas regulamentares, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Após a defesa, os membros da banca examinadora reuniram-se sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foi atribuída a seguinte indicação: a candidata foi considerada Aprovada, condicional às modificações sugeridas pela banca examinadora no prazo de 30 dias a partir da data de hoje, por unanimidade. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente Ata, que será assinada por todos os membros participantes da banca examinadora. Belo Horizonte, 16 de novembro de 2017.

Prof. Gregório Saravia Atuncar (Orientador)
 Departamento de Estatística / UFMG

Profa. Ela Mercedes Medrano de Toscano
 Departamento de Estatística / UFMG

Profa. Sueli Aparecida Mingoti
 Departamento de Estatística / UFMG

Dedico a Ricardo Castelo Branco Albinati

AGRADECIMENTOS

Aos peixes que doaram as suas vidas em nome da ciência,

Ao meu esposo Filipe pela amizade, companheirismo e afeto,

Aos meus pais pelo apoio, ao meu avô Antônio pela ajuda e aos meus tios pela torcida

Ao professor Gregorio, pela paciência e pelos ensinamentos,

Ao professor Ricardo Castelo Branco Albinati pela confiança e por sempre acreditar nos meus sonhos,

Aos colegas da especialização pela amizade que perdurará por um longo período,

Aos colegas Fábio e Raquel pela fundamental ajuda na implementação dos comandos no R.

“Arriscado sempre é
só não pode o medo te paralisar”

Gessinger, H

Resumo

Objetivou-se com este estudo determinar o efeito de gengibre como um aditivo fitogênico em dietas para tilápia-do-nylo *Oreochornis niloticus* 440 juvenis de tilápia foram alocados em um delineamento inteiramente aleatorizado em 20 tanques com volume de 350 L, em cinco tratamentos com quatro repetições cada. Os tratamentos experimentais consistiram na inclusão de gengibre em pó nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 g Kg⁻¹ e uma dieta controle, isenta do aditivo. Após o período experimental de 60 dias foram coletadas amostras de sangue, 16 animais por tratamento, para as análises hematológicas. Nas variáveis hematócrito, baço e leucócitos aplicou-se teste de Kruskal Wallis. Já as variáveis eritrócito, neutrófilos, monócito, linfócitos e fígado foi aplicado análise de variância paramétrica. Avaliou-se a relação entre a variável peso do fígado e número de leucócitos totais por meio de núcleo estimador de Nadaraya- Watson utilizando o parâmetro de suavização conforme metodologia de Fan e Gijbels. A suplementação de dietas de tilápia com gengibre influenciou nas variáveis hematológicas estudadas, assim como no peso do fígado. Essa suplementação não acarreta diferença entre o peso do baço. O gengibre influenciou a relação entre peso do fígado e leucócitos totais.

Palavras- Chave: *Zingiber officinale*. Hematologia. ANOVA. Kruskal-Wallis. Núcleo estimador. Método de Nadaraya- Watson.

Abstract

The objective of this study was to determine the effect of ginger as a phyto-genic additive in diets for juvenile tilapia *Oreochornis niloticus* 440 tilapia were allocated in a completely randomized design in 20 tanks with volume of 350 L in five treatments with four replicates each. Experimental treatments consisted of the inclusion of powdered ginger at concentrations of 5, 10, 15 and 20 g Kg⁻¹ and a control diet free of the additive. After the 60-day experimental period, blood samples were collected, 16 animals per treatment, for hematological analysis. In the variables hematocrit, spleen and leukocytes, the Kruskal Wallis test was applied. The variables erythrocyte, neutrophils, monocytes, lymphocytes and liver were applied parametric analysis of variance. The relationship between liver weight and total leukocyte number was evaluated using the Nadaraya-Watson estimator core using the smoothing parameter according to Fan and Gijbels methodology. The supplementation of tilapia diets with ginger influenced the hematological variables studied, as well as the liver weight. This supplementation does not imply a difference between the weight of the spleen. Ginger influenced the relationship between liver weight and total leukocytes.

Keywords: *Zingiber officinale*. Hematology. ANOVA. Kruskal-Wallis. Kernel. Method Nadaraya- Watson.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta isenta de gengibre	28
Figura 2. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta contendo 5g Kg ⁻¹ de gengibre	28
Figura 3. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta contendo 10g Kg ⁻¹ de gengibre	29
Figura 4. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta contendo 15g Kg ⁻¹ de gengibre	30
Figura 5. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta contendo 20g Kg ⁻¹ de gengibre	30

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Análise de variância para um experimento de fator único	15
Tabela 2. Composição (g Kg ⁻¹) das dietas experimentais	22
Tabela 3. Estatística descritiva das variáveis estudadas variáveis	24
Tabela 4. <i>P</i> valores do teste de normalidade Anderson- Darling para os resíduos das variáveis estudadas conforme os níveis de inclusão de gengibre	25
Tabela 5. <i>P</i> valores do teste de igualdade de variância Levene para as variáveis estudadas	25
Tabela 6. Comparação não paramétrica (Kruskal- Wallis, $p \leq 0,05$) entre as variáveis hematológicas e baço de juvenis de tilápia- do-nilo alimentadas com dietas contendo níveis de gengibre	26
Tabela 7. Comparação paramétrica (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre as variáveis hematológicas e tecido hepático de juvenis de tilápia- do-nilo alimentadas com dietas contendo níveis de gengibre	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Tilápia- do- nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	13
2.2 Gengibre	13
2.3 Hematologia de peixes	14
2.4 Estatística experimental	14
2.5 Metodologia estatística	14
2.5.1 Análise de variância	14
2.5.2 Teste de Kruskal- Wallis	16
2.5.3 Regressão não paramétrica	18
2.5.3.1 Modelo estatístico	18
2.5.3.2 Esperança matemática contínua	18
2.5.3.3 Distribuição condicional	19
2.5.3.4 Esperança condicional	19
2.5.3.5 Estimador de Nadaraya- Watson	19
2.5.3.6 Parâmetro de suavização	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura consiste no cultivo para fins comerciais de organismos aquáticos, o que inclui peixe, camarão, moluscos dentre outras espécies. Essa prática no Brasil é bastante rentável, entretanto a produção nacional está aquém do seu potencial, contribuindo com apenas 1,1% na produção total mundial de pescados o que equivale a 611.343 toneladas (FAO, 2014).

Desde o século passado, aditivos alimentares são empregados na produção aquícola a fim de melhorar a produtividade do sistema de cultivo. Definem-se então como aditivos quaisquer substâncias que cause efeito benéfico ao hospedeiro.

Dentre os compostos mais utilizados até metade da década passada destacam-se os antibióticos, entretanto a utilização demasiada de tais aditivos acaba gerando risco a saúde do animal e do consumidor, além de causar danos ambientais, sendo que desde 2006 é proibida a utilização de antibióticos na produção animal como promotor de crescimento (ROMERO, 2012).

Em decorrência dessa proibição, foram intensificados os estudos com aditivos funcionais, ambientalmente corretos, que não deixem resíduos ou causem prejuízos à saúde humana e dos peixes, além de atuar como imunoestimulante, mitigando o efeito do estresse e tornando os animais mais resistentes a doenças (LIMA et al., 2015). Dentre estes aditivos inclui-se o gengibre *Zingiber officinale*, uma planta herbácea que apresenta rizomas, caules subterrâneos, ricos em compostos fenólicos, os quais conferem a este aditivo inúmeras funções, como na melhoria do sistema imune do animal (SINGH et al., 2008) influenciando positivamente nos elementos constituintes do sangue.

Um dos principais objetivos de estudos hematológicos na produção animal é avaliar a influência de determinado agente (tratamento) nas variáveis sanguíneas. Um ponto negativo quanto a essa análise é o fato da grande variabilidade da resposta devido a características de cada organismo, ocasionando dados heterocedásticos. Em um número grande de estudos, aplica-se análise estatística paramétrica, o teste estatístico F de Fisher da análise de variância (ANOVA), para assim determinar se as variações das diferenças entre as médias dos grupos experimentais são maiores do que as dos erros aleatórios, definindo se existe ao menos um grupo experimental com médias diferente dos demais. Entretanto, para a realização desta análise, os resíduos devem seguir alguns pressupostos como distribuição normal e variância constante. Quando estes pressupostos são violados,

a realização de testes paramétricos se torna inviável e quando utilizado pode gerar respostas errôneas.

Uma possibilidade é a utilização de testes estatísticos não paramétricos, onde não é necessário que as variáveis tenham distribuição normal. Dentre os testes mais utilizados para comparação de um resultado de uma variável medida em grupos (tratamentos) independentes, destaca-se o de Kruskal - Wallis, considerado um análogo ao teste F da ANOVA paramétrica.

Em determinadas ocasiões, a relação entre uma variável resposta e uma variável explicativa é plausível de mais estudos estatísticos, devido à grande relação entre elas. Para essa opção existe a análise de regressão que consiste em estudar a relação entre uma ou mais variáveis resposta com uma ou mais variáveis preditoras, por meio do uso de funções matemáticas. Tais funções permitem estimar o valor médio da variável resposta em função das variáveis explicativas, porém, por ser uma análise paramétrica, a utilização de regressão deve seguir alguns pressupostos e caso ocorra violação desses, a mesma não pode ser empregada, salvo exceções.

Como alternativa, a utilização da metodologia de Núcleo Estimador para estimar a função de regressão se torna uma possibilidade, pois para a sua aplicação não é necessário a suposição do conhecimento da distribuição da probabilidade da variável resposta, nem a normalidade dos erros, podendo também ser usada para estimar curvas de formatos distintos. Um ponto crucial quanto à aplicabilidade da regressão- não paramétrica é a escolha do parâmetro de suavização (h), por meio dele controla-se a suavidade da curva estimada (WATSON, 1964).

Existem distintos métodos não paramétricos para estimar uma função de regressão e neste trabalho utilizaremos o núcleo estimador, e em particular o estimador de Nadaraya- Watson.

Objetiva-se com este estudo verificar a influência da utilização do gengibre como aditivo na alimentação de tilápia-do-nilo nas variáveis hematológicas e nos tecidos hematopoiéticos, além de estudar a relação entre o peso do fígado e a variável leucócitos totais por meio de regressão não paramétrica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tilápia- do- nilo *Oreochromis niloticus*

A tilápia-do-nilo é uma espécie pertencente à família dos ciclídeos endêmica da África e do Oriente Médio e atualmente está inserida no grupo dos peixes mais produzidos no mundo (FAO, 2014).

A grande produtividade dessa espécie em todo o mundo está associada a características inerentes da espécie, como rápido crescimento, tolerância a alterações ambientais, como temperatura, concentração de oxigênio e amônia, resistência a estresse e doenças, facilidade da reprodução em cativeiro e hábito alimentar onívoro, aceitando uma gama de ingredientes e elevada porcentagem de inclusão de proteína vegetal nas rações.

2.2 Gengibre

O gengibre *Zingiber officinale* é uma planta herbácea que apresenta rizomas ricos em compostos fenólicos, dentre eles gingeróis e shagoais que atuam como antioxidante (SINGH et al., 2008), antimicrobiano (Andrade et al., 2012), antocolesterolêmico, além de auxiliar na redução de triglicerídeos sanguíneos (IWASHITA et al., 2001).

O efeito promotor de crescimento do gengibre foi observado por Arulvasu et al. (2013) ao suplementarem dietas de carpa *Catla catla* com 100, 500 e 1000 mg Kg⁻¹, obtendo melhor desempenho com o maior nível de inclusão do aditivo. Talpur et al. (2013) observaram maior ganho de peixe para juvenis de *Lates calcarifer* alimentados com dietas contendo 10 g Kg⁻¹ de gengibre quando comparados aos tratamentos sem a inclusão do aditivo.

O gengibre contém cerca de 1,0 a 3,0% de óleo essencial, sendo o maior constituinte o gingerol apresentando diferentes cadeias (n-6 a n-8) (ZICK et al., 2008), sendo estes compostos os responsáveis pelas ações anti-inflamatória (GRZANNA et al., 2005), hiperglicêmica, hipocolesterolêmica (SINGH et al., 2009) e imunoestimulantes (NYA e AUSTIN, 2009).

2.3 Hematologia de peixes

O estudo dos parâmetros sanguíneos de peixes permite o conhecimento de mecanismos distintos a fim de compreender o funcionamento do sistema imunológico, permitindo avaliar as condições fisiológicas e patológicas dos animais (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

O sangue dos peixes, assim como o dos humanos, é constituído por três tipos de células, os glóbulos vermelhos, também denominados eritrócitos ou hemácias, os glóbulos brancos ou leucócitos e os trombócitos ou plaquetas. Cada grupo apresenta uma função distinta, onde os eritrócitos são responsáveis pelo transporte de oxigênio aos tecidos. Esta célula é a que confere ao sangue a cor vermelha, devido ao fato de possuir na sua composição o mineral ferro. Os leucócitos fazem parte de um grupo de células que têm como função proteger o organismo, fazendo parte assim do sistema imunitário. Dentre as células que compõem os leucócitos estão os linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

2.4 Estatística experimental

A estatística é uma ciência matemática que objetiva obter conclusões a respeito de uma ou mais variáveis. Na experimentação agrícola, esta ciência teve início na década de 20, como um trabalho de Sir Ronald A. Fisher na estação experimental agrícola de Rothmsted, na Inglaterra (MONTGOMERY, 1991).

Atualmente a experimentação está difundida em todo o mundo, permitindo realizar experimentos, pesquisas planejadas com o intuito de validar ou não uma hipótese, ou coletar dados, obtendo assim conclusões válidas sobre uma população.

2.5 Metodologia estatística

2.5.1 Análise de variância

A análise de variância paramétrica (ANOVA) é um método estatístico de comparações múltiplas de dados que consiste na decomposição da variação total de uma variável resposta em partes, de acordo com as fontes de variação presentes nos dados, podendo ser resultante da ação dos tratamentos experimentais ou devido a causas desconhecidas. Para a validação deste método é necessário verificar os pressupostos de que os resíduos do modelo seguem uma distribuição normal, as variâncias dos grupos são homogêneas, além da independência dos resíduos entre os grupos (JOHNSON e BHATTACHARYYA, 2006).

Para esta análise o modelo estatístico é definido por:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, n \end{cases}$$

sendo:

Y_{ij} a variável aleatória medida na j -ésima observação do tratamento;

μ é parâmetro comum a todos os tratamentos;

τ_i é o efeito associado ao i -ésimo tratamento;

ε_{ij} é o erro aleatório relacionado à j -ésima observação do i -ésimo tratamento.

* τ e ε_{ij} são variáveis aleatórias independentes

Nesta inferência, tem-se como hipótese nula (H_0) que as médias dos tratamentos são iguais e como hipótese alternativa (H_1), que existe ao menos uma diferença entre as médias. Tal análise é realizada por meio do método de análise de variância e a decomposição das somas dos quadrados em efeito dos tratamentos e efeitos aleatórios (resíduos) (Tabela 1). Quando o quociente entre a soma dos quadrados dos tratamentos e dos erros for grande, há maior indicação de que a hipótese nula pode não ser verdadeira. Vale ressaltar que este quociente segue uma distribuição F_α com $a-1$ e $a(n-1)$ graus de liberdade (JOHNSON e BHATTACHARYYA, 2006; MONTGOMERY e RUNGER, 2010).

Tabela 1: Análise de variância para um experimento de fator único

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F_0
Tratamentos	$a-1$	SQ_{trat}	QM_{trat}	QM_{trat}/QM_{erro}
Erro	$a(n-1)$	SQ_{erro}	QM_{erro}	
Total	$an-1$	SQ_{total}		

onde:

$$SQ_{total} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{y^2_{..}}{N}$$

$$SQ_{trat} = \sum_{i=1}^a \frac{y_i^2}{n} - \frac{y^2_{..}}{N}$$

$$SQ_{\text{erro}} = SQ_{\text{total}} - SQ_{\text{trat}}$$

$$QM_{\text{trat}} = \frac{\sum_{i=1}^a \frac{y_{i.}^2}{n} - \frac{y^2}{N}}{a - 1}$$

$$Q_{\text{Merro}} = \frac{SQ_{\text{erro}}}{a(n - 1)}$$

$$F_0 = \frac{QM_{\text{trat}}}{Q_{\text{Merro}}} \sim F(a - 1, a(n - 1))$$

A hipótese nula é rejeitada para valores de F maiores ou iguais ao valor crítico $F_{a-1, n-a, \alpha}$ sendo α o nível de significância do teste ($0 < \alpha < 1$).

O teste formulado é:

$$\begin{cases} H_0: \tau_1 = \tau_2 \dots \tau_a \\ H_1: \tau_1, \tau_2 \dots \tau_n \text{ não são todos iguais} \end{cases}$$

2.5.2 Teste de Kruskal- Wallis

O teste de Kruskal- Wallis (KRUSKAL e WALLIS, 1952), também conhecido como análise de variância de uma classificação por postos, é um teste não-paramétrico utilizado quando as suposições para o uso da ANOVA paramétrica são violadas.

Seja Y_{ij} ($i = 1, \dots, a; j = 1, \dots, n_i$), um conjunto de variáveis e $F_i(y)$ a distribuição contínua de Y_{ij} . O modelo considerado neste caso é:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, n_i \end{cases}$$

onde:

μ é a média geral

τ_i 's são os efeitos dos tratamentos: $\sum_{i=1}^a n_i \tau_i$

ε_{ij} são considerados independentes e identicamente distribuídos

O teste formulado é:

$$\begin{cases} H_0: \tau_1 = \tau_2 \dots \tau_a \\ H_1: \tau_1, \tau_2 \dots \tau_n \text{ não são todos iguais} \end{cases}$$

Suponhamos que n_i elementos sejam submetidos respectivamente ao tratamento $i=1, 2, \dots, n_i$ e seja Y_{ij} a resposta do j -ésimo elemento no grupo i para $i=1, \dots, a$ e $j=1, \dots, n_i$.

Define R_{ij} o posto da observação de Y_{ij} na amostra ordenada pelos $N = n_1 + n_2 + \dots + n_a$ fatores observados e seja R_i a média dos postos no tratamento i .

A estatística do teste é dada por (1) no caso em que há empate entre os postos de observação:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^a n_i \left(R_i - \frac{N+1}{2} \right)^2 \quad (1)$$

onde:

a é o número de tratamentos;

n_i é o número de elementos na amostra i ;

$N = \sum n_i$ é o número de elementos entre as amostras combinadas;

R_i é o posto médio no tratamento i , na ordenação conjunta das observações amostrais de todos os tratamentos.

É possível mostrar que a estatística descrita em (1) é igual a (2) em casos onde não há empate entre os postos de observação:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^a \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1) \quad (2)$$

* sob a hipótese nula a estatística H tem uma distribuição qui-quadrado (assintoticamente) com $a-1$ graus de liberdade.

A comparação é obtida por meio de tabelas específicas quando o tamanho amostral e o número de grupos são pequenos (LEHMANN, 1998). Para tamanhos amostrais maiores a distribuição de H aproxima-se da distribuição qui-quadrado (χ^2), $a-1$ graus de liberdade. A hipótese nula é rejeitada para valores de H maiores que o valor crítico H^c , α , sendo α o nível de significância estatístico para o teste, indicando que há alguma diferença entre as medianas dos tratamentos.

2.5.3 Regressão não paramétrica

A utilização de estimadores não paramétricos de regressão tem como objetivo investigar a relação entre uma variável resposta e uma ou mais variáveis explicativas. Este método é uma alternativa para estimar a função de regressão quando a estimação por métodos paramétricos não pode ser realizada em função da não adequação a algumas suposições do modelo matemático como homogeneidade dos resíduos, distribuição normal dos erros ou independência dos resíduos. Vale ressaltar que, ao contrário da regressão paramétrica, ao utilizar regressão não paramétrica, permite-se estimar curvas sem forma específica, sendo este também uma das vantagens do método, além do fato de poder ser empregado em populações com distintas distribuições.

2.5.3.1 Modelo estatístico

Dado uma amostra aleatória de tamanho n das variáveis x e y , sendo essas medidas nos mesmos elementos amostrais, ou seja $(x_1, y_1), (x_2, y_2) \dots (x_n, y_n)$ o objetivo da regressão é estimar uma função que relacione a variável resposta Y e uma variável explicativa X , utilizando a equação:

$$y = m(x) + \varepsilon$$

sendo: $E(\varepsilon|X) = 0$ e $\text{Var}(Y|X) = \sigma^2(X)$, $E[\cdot]$ o operador esperança matemática.

2.5.3.2 Esperança matemática contínua

Seja X uma variável aleatória com função de distribuição acumulada F_x . A esperança de X , denotada por $E(X)$, é definida como:

$$E(X) = \int_{-\infty}^{\infty} x dF_x(x)$$

Caso X seja uma variável aleatória discreta, assumindo os valores $\{x_1, x_2, x_3 \dots\}$ e com função de probabilidade $p(x_i) = P(X = x_i)$, tem-se,

$$E(X) = \sum_{i=1}^{\infty} x_i p(x_i)$$

2.5.3.3 Distribuição condicional

Seja (X,Y) um vetor aleatório sendo X e Y variáveis discretas, com distribuição conjunta $p(x,y)$. A distribuição condicional de X dado $Y=y$ é definida como:

$$\Pr(Y = y_j|X = x_i) = \frac{\Pr(X = x_i, Y = y_j)}{\Pr(X = x_i)}$$

2.5.3.4 Esperança condicional

Para cada distribuição condicional, pode-se calcular a esperança condicional:

$$E(Y|X = x_i) = \sum_{j=i}^k y_j \Pr(Y = y_j|X = x_i)$$

Analogamente ao caso discreto, define-se no caso contínuo a esperança como:

$$\begin{aligned} E(Y|X = x_i) &= \int yf(y)dy \\ &= \int y \frac{f(x, y)}{f_x(x)} dy \end{aligned}$$

Se substituirmos $f(x,y)$ e $f(x)$ pelos seus correspondentes núcleo estimador, chega-se o estimador de Nadaraya- Watson.

2.5.3.5 Estimador de Nadaraya- Watson

O estimador de Nadaraya- Watson foi definido, em trabalhos independentes, por Nadaraya (1964) e Watson (1964) e corresponde a aproximar localmente $m(x)$ por uma constante β_0 ponderando usando os valores de y .

O estimador de Nadaraya- Watson, avaliado no ponto x é definido por:

$$\hat{m}(x) = \frac{\sum_{i=1}^n K_x \left(\frac{x - x_i}{h_x} \right) y_i}{\sum_{i=1}^n K_x \left(\frac{x - x_i}{h_x} \right)}$$

Ver Wand e Jones (1995).

onde: K_x a função núcleo

h_x parâmetro de suavização

Neste trabalho usaremos a função núcleo normal padrão, dada por:

$$K(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} z^2}$$

Este núcleo estimador segue as condições (WASSERMAN, 2006):

$$\int K(x)dx = 1$$

$$\int xK(x)dx = 0$$

$$\sigma_K^2 = \int x^2 K(x)dx = 1$$

2.5.3.6 Parâmetro de suavização

A escolha do parâmetro de suavização (h), também chamado de janela, influenciará na suavidade da curva da regressão, sendo um ponto crítico para uma boa estimativa, pois valores inadequados podem resultar em uma relação funcional imprecisa, e com valores muito pequenos, admite-se demasiado ruído amostral. Já, se este valor for muito grande, omite-se as características da curva. De um modo geral, a escolha da janela ótima consiste em minimizar o erro de predição.

Existem vários métodos para estimar o valor de h , dentre eles o proposto por Fan e Gijbels (1995), que consiste em selecionar a janela em dois estágios. No primeiro estima-se uma janela piloto e no segundo estima-se a janela mais refinada, método o qual foi empregado neste trabalho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Aquacultura da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil no período de seis de Junho de 2014 a seis de Agosto de 2014. Mil juvenis de tilápia-do-nilo da linhagem tailandesa com peso médio de 2g foram distribuídos em 20 tanques com volume de 350L em um sistema de recirculação, com temperatura controlada (29° C) e aeração constante por um período de 20 dias, onde foram alimentadas, com ração comercial, cinco vezes ao dia (8:00; 10:00; 12:00; 14:00 e 16:00) até a saciedade aparente, correspondendo ao período de adaptação.

Posteriormente a este período, foram escolhidos e alocados em um delineamento

aleatorizado 440 juvenis de tilápia-do-nilo com peso médio inicial de $8,46g \pm 0,30$ em 20 tanques (350 L), com densidade de 22 peixes por tanque, em cinco grupos experimentais e quatro repetições cada. Os tanques eram abastecidos com fluxo contínuo de água em um sistema de circulação fechada de água, com filtragem biológica, sistema de aquecimento e aeração constante individual através de soprador.

Os tanques eram sifonados duas vezes ao dia, após a primeira e a última alimentação para retirada de fezes. Semanalmente verificou-se as variáveis físicas e químicas da água como temperatura, O_2D , O_2 % e pH ficando em $28,5$ °C; $6,28$ mg L⁻¹, 80,75% e 7,15, respectivamente.

Para a confecção das dietas experimentais, formulou-se uma dieta basal (Tabela 2) conforme as necessidades nutricionais de tilápia-do-nilo com auxílio do programa computacional SUPER CRAC[®], sendo o grupo controle. Para os demais tratamentos, utilizou-se a fórmula da dieta basal acrescida dos diferentes níveis de gengibre em pó, 5; 10; 15 e 20 g Kg⁻¹, conforme cada tratamento.

Cada dieta experimental foi composta por ingredientes onde a soma da quantidade em gramas de cada ingrediente corresponde a 1 kg de ração, sendo assim é possível observar que há diferenças entre as fórmulas devido a inclusão do gengibre, entretanto isso não implica em alterações nas variáveis estudadas, pois as diferenças, em gramas, dos valores são mínimas, não alterando a composição da ração, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Composição (g Kg⁻¹) das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas experimentais				
	Controle	5	10	15	20
Farelo de soja 45%	396,98	394,98	392,98	390,98	388,98
Farinha de peixe 55%	235,0	233,0	232,0	231,0	230,0
Quirera de arroz	180,0	179,0	177,0	175,0	173,0
Farelo de trigo	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Fubá de milho	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Fosfato bicálcio	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
DL metionina	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Compl. min e vit ¹	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Sal comum	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
BHT ²	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Óxido de cromo	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Gengibre em pó	0	5,0	10,0	15,0	20,0
Valores analisada (*g Kg ⁻¹)					
Matéria seca	905,5	913,1	913,7	910,7	912,6
Proteína bruta	333,4	329,2	321,3	333,3	326,0
Extrato Etéreo	65,7	65,7	65,7	65,7	65,7

¹ Complexo mineral e vitamínico: Composição/Kg: Mg – 2.600 mg; Zn – 14.000 mg; Fe – 10.000 mg; Cu – 1.400 mg; Co – 20 mg; I – 60 mg; Se – 60 mg; Vit. A – 1.000.000 UI; Vit. D3 – 400.00 UI; Vit. E – 10.000 mg; Vit. K3 – 500 mg; Vit. B1 – 2.500 mg; Vit. B2 – 2.500 mg; Vit. B6 – 2.500 mg; Vit. B12 – 3.000 mcg; Vit. C – 35.000 mg; Ac. Fólico – 500 mg; Ac. Pantotênico – 5.000 mg; Niacina – 10.000 mg; Biotina – 80.000 mcg; Colina – 200.000 mg; Metionina – 130 g; Inositol – 5.000 mg; Etoxiquin – 15.000 mg. ² Butilhidroxitolueno. ³Energia digestível. * Quantidade em gramas do nutriente por kg de ração

Durante todo o período experimental, os peixes foram alimentados três vezes ao dia (8:00; 12:00 e 16:00) até a saciedade aparente e ao final dos 60 dias, os juvenis foram submetidos a jejum de 8 horas e de cada unidade experimental (tanques de 350 L) retirou-se aleatoriamente quatro peixes, perfazendo 16 peixes por tratamento, para coleta de 1 mL de sangue via punção cardíaca em seringas de 2mL contendo 0,1 mL de anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético sal dipotássico a 10%). Logo após a coleta, o material foi homogeneizado, posteriormente identificado e processado.

Determinou-se o hematócrito pelo método de microhematócrito, onde 2/3 do microcapilar foi preenchido com amostras sanguíneas e centrifugados a rotação de 10.000 rpm por cinco minutos e posterior leitura dos capilares. Realizou-se contagem total de

leucócitos e eritrócitos, com auxílio da câmara de Neubauer, utilizando-se solução de azul de toluidina a 0,01% (diluído em solução de cloreto de sódio). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada por meio de esfregações sanguíneas coradas pelo método Panótico rápido (Laborclin) e contados 200 leucócitos em cada esfregaço.

Com os dados verificou-se a normalidade dos resíduos por meio do teste estatístico Anderson-Darling e a homocedasticidade pelo teste Levene. Para as variáveis que os resíduos não ajustaram distribuição normal (hematócrito e baço) aplicou-se o teste de Kruskal- Wallis. Para as demais variáveis, aplicou-se análise de variância paramétrica (ANOVA). Para avaliar a relação entre a variável peso do fígado e número de leucócitos totais foi empregada a análise de regressão não paramétrica por meio do núcleo estimador de Nadaraya – Watson e o parâmetro de suavização escolhido conforme metodologia descrita por Fan e Gijbels (1995). As análises descritas foram empregadas utilizando os pacotes MINITAB e R.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram calculadas as estatísticas descritivas de cada variável com valores de média, desvio padrão, mediana, assimetria e curtose descritos na Tabela 3.

De modo geral, todas as variáveis estudadas obtiveram elevados valores de coeficiente de variação. Tal fenômeno é aceitável em estudos hematológicos em função das diferenças intrínsecas de cada indivíduo.

Tabela 3. Estatística descritiva das variáveis estudadas

Variáveis	Trat.*	Média	DP*	Mediana	Assimetria	Curtose
Hematócrito	0	25,375	3,44	25,5	-0,06	-1,18
	5	32,93	6,86	34	1	2,49
	10	30,54	3,82	30	0,75	0,73
	15	24,49	10,77	30	-1,04	-0,81
	20	28,36	9,14	30	-0,64	-0,18
Leucócitos	0	26367	3413	26500	0,05	-1,17
	5	33250	3207	34250	-0,78	-0,43
	10	29500	7363	32250	-0,9	-0,31
	15	19942	3250	21500	-1,2	0,33
	20	24250	6534	23750	-0,02	-0,84
Eritrócitos	0	80893	9790	81500	-0,71	-0,1
	5	102967	14935	107000	-0,34	-1,2
	10	101600	10317	103500	-0,7	-0,34
	15	99938	9322	97500	1,35	2,63
	20	108071	14964	103750	0,61	-0,2
Fígado	0	1,74	0,72	1,17	-0,01	-0,81
	5	2,31	0,641	1,835	0,6	0,32
	10	1,88	0,642	1,405	0,49	-0,48
	15	1,89	0,554	1,56	0,27	0,35
	20	1,66	0,538	1,2	0,14	-0,6
Baço	0	0,198	0,0676	0,19	0,75	0,04
	5	0,19	0,1138	0,15	1,78	4,23
	10	1,164	0,063	0,15	0,37	-1,03
	15	0,167	0,0887	0,165	0,97	0,59
	20	0,181	0,0656	0,18	0,5	-0,28
Neutrófilos	0	1326	424	1458	-1,16	1,68
	5	3767	1182	4030	-0,07	-0,55
	10	3444	1148	3713	-0,97	0,48
	15	2556	1515	2095	1,37	1,28
	20	3113	1465	2800	0,33	-0,94
Linfócitos	0	17946	5261	19356	-2,39	6,96
	5	20874	2530	206664	-0,45	1,01
	10	19370	5558	21440	-0,6	-0,48
	15	13452	2181	14117	-0,88	0,78
	20	15123	3186	14765	0,01	-1,35
Monócitos	0	2258	832	2230	0,24	-0,06
	5	2970	1282	2909	0,71	0,29
	10	2936	1042	2660	1,44	2,64
	15	1279	839	1127	0,82	0,38
	20	1890	805	1962	0,15	-0,97

*Trat= Tratamentos experimentais, DP=Desvio padrão

A Tabela 4 apresenta os resultados dos correspondentes testes de Anderson-

Darling. Assumindo $\alpha \leq 0,05$ pode-se observar que as variáveis hematócrito e baço não seguem uma distribuição normal, pois em ao menos um tratamento é possível observar p -valor menor que 0,05.

Tabela 4. P valores do teste de normalidade Anderson- Darling para os resíduos das variáveis estudadas conforme os níveis de inclusão de gengibre

Variáveis	Tratamentos experimentais (g Kg ⁻¹)				
	0	5	10	15	20
Hematócrito	0,951	<0,00	0,654	0,479	0,667
Leucócito total	0,797	0,292	0,012	0,903	0,859
Eritrócito total	0,068	0,486	0,497	0,352	0,195
Fígado	0,909	0,588	0,854	0,767	0,707
Baço	0,192	<0,00	0,018	0,114	0,254
Neutrófilos	0,119	0,804	0,085	0,278	0,980
Linfócitos	0,021	0,431	0,118	0,246	0,765
Monócitos	0,803	0,586	0,108	0,184	0,673

*Os resíduos foram gerados por através do modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$$

Onde: $\varepsilon_i \sim iid N(0, \sigma^2)$

O erro ε_i é estimado pelo resíduo e_i

$$e_i = \hat{Y}_i - Y_i$$

Foi verificado pelo teste de Levene a homocedasticidade das variâncias (Tabela 5), sendo possível afirmar que as variáveis hematócrito, leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos não apresentam variância homogênea a um nível de significância de 0,05.

Tabela 5. P valores do teste de igualdade de variância Levene para os resíduos estudados

	Hem.	Leuc.	Erit.	Fígado	Baço	Neut.	Linf.	Mon.
Teste de Levene	0,073	0,020	0,144	0,695	0,648	0,054	0,105	0,410

Hem: Hematócrito (%); Leuc: Leucócitos, Erit: Eritrócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$); Neut: Neutrófilos; Linf: Linfócitos; Mon: Monócitos (g dL⁻¹)

Em função dos resultados verificados nas Tabelas 4 e 5, empregou-se a análise de variância paramétrica (ANOVA) para as variáveis eritrócitos, fígado, monócitos e neutrófilos. Já para as variáveis leucócitos totais, hematócrito e baço foi adotado análise de variância não paramétrica, o teste de Kruskal Wallis, entretanto vale ressaltar que a

variável leucócitos totais é heterocedásticas, violando um pressuposto da análise.

Nas tabelas 6 e 7, pode-se observar que a suplementação das dietas de tilápia-do-nilo com gengibre alterou significativamente as variáveis hematológicas.

Tabela 6. Comparação não paramétrica (Kruskal- Wallis, $\alpha= 0,05$), composta pela mediana e distância interquartil, entre as variáveis hematológicas e baço de juvenis de tilápia- do-nilo alimentadas com dietas contendo níveis de gengibre

Variáveis	Tratamentos experimentais (g Kg ⁻¹)					p- valor
	0	5	10	15	20	
Hem	25,5 (6,0)	34 (10,0)	30,0 (5,0)	30,0 (23,0)	30,5 (13,0)	0,007
Leuc	26500 (6000)	34250 (5500)	32250 (11000)	21500 (4500)	23750 (10063)	0,000
Baço	0,19 (0,097)	0,15 (0,13)	0,15 (0,12)	0,16 (0,1)	0,18 (0,09)	0,574

Hem: Hematócrito (%); Leuc: Leucócitos totais (10³ µL⁻¹)

Conforme a Tabela 6, ao assumir o nível de significância $\alpha =0,01$, rejeita-se a hipótese nula pelo teste de Kruskal-Wallis, indicando que há alguma diferença entre as medianas dos tratamentos para as variáveis hematócrito, leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos. Entretanto, esta diferença não é observada para a variável baço,

Alterações leucocitárias também foram observadas por Talpur et al. (2013) onde encontraram maiores valores de leucócitos totais em tilápia-do-nilo alimentada com dieta contendo 5 g Kg⁻¹. Nya e Austin (2009) observaram maiores valores de leucócitos em truta alimentadas com 1 g Kg⁻¹ de gengibre. Os leucócitos podem ser indicadores de saúde dos peixes, tendo papel importante no sistema imune inato e um aumento nessa variável pode indicar efeito imuoestimulatório e propriedades anti infecciosas do gengibre (TALPUR et al., 2013). Redução nos valores dessa variável podem indicar que, a elevadas doses, o gengibre imunossuprime o animal.

Os neutrófilos são leucócitos com alta capacidade fagocítica, capaz de defender o organismo por meio da produção de radicais livres que destroem os invasores, sendo um indicativo de resposta imunitária (Aly e Mohamed, 2010). A inclusão de alguns aditivos fitogênicos em dietas para peixe tem demonstrado aumento significativo nessa variável, como demonstrado por Lima et al. (2015), Nya e Austin (2009) e Aly e Mohamed (2010) ao incluírem alho e canela, gengibre e alho e cúrcuma, respectivamente.

Os monócitos são células fagocíticas e a influência do gengibre na proliferação desta célula pode estar relacionada com maior expressão do fator de transcrição PU.1, que influencia na produção de macrófagos e células granulocíticas (HSU et al. 2001).

Tabela 7. Comparação paramétrica (ANOVA, $\alpha=0,05$), composta pela média e desvio padrão, entre as variáveis hematológicas e tecido hepático de juvenis de tilápia- do-nilo alimentadas com dietas contendo níveis de gengibre

Variáveis	Tratamentos experimentais (g Kg ⁻¹)					p- valor
	0	5	10	15	20	
Erit	80893±9790	102967±14935	101600± 10317	99938±9322	108071±14964	0,000
Mon	2258± 832	2970±1282	2936± 1042	1904± 2785	1890±805	0,000
Linf	17946±5261	20874±2530	19370±5558	13452±2181	15123±3186	0,000
Neut	1326± 424	3767 ±1182	3444±1148	2556±1515	3113±1465	0,000
Fig	1,74 ± 0,72	2,31 ± 0,64	1,88 ± 0,64	1,89 ± 0,55	1,66 ± 0,54	0,045

Erit: Eritrócitos (10³ µL⁻¹); Mon: Monócitos (g dL⁻¹); Linf: Linfócitos totais (g dL⁻¹); Neut : Neutrófilos (g dL⁻¹); Fig: Fígado (g)

É possível observar que, para as variáveis eritrócitos, monócitos e fígado, ao menos uma média difere dos demais tratamentos, assumindo nível de significância igual a 0,05.

Alterações nos valores dessas variáveis em peixes suplementados com dietas contendo gengibre ocorre devido ao fato do gengibre conter em sua composição compostos bioativos dentre eles os gingeróis. Estudos têm demonstrado que esses compostos afetam positivamente na transcrição de fatores regulatórios da eritropoiese, como demonstrado por Ferri-Lagneau et al. (2012) em larvas de zebra fish. Segundo esses autores, o gengibre influencia no fator de transcrição GATA-1, responsável pela formação de eritrócitos.

A influência do gengibre no peso do fígado pode ser resultante na maior deposição de gordura nesse órgão. O gengibre atua benéficamente na redução dos níveis sanguíneos de triglicerídeos e já possui a sua eficiência comprovada na redução de gordura visceral (MATSUDA et al., 2009). O fígado é um tecido altamente associado com a granulopoeise, formação de neutrófilo, eosinófilos e basófilos, em peixes teleósteos. Alterações demasiadas no peso do fígado podem indicar possível acúmulo de gordura visceral, patologia conhecida como esteatose hepática ou a hipertrofia dos hepatócitos causado por algum agente tóxico.

Nas figuras 1, 2, 3 ,4, 5 encontra-se a curva de regressão entre a variável peso do fígado e leucócitos totais, onde a linha tracejada indica a curva usando o valor de *h* no primeiro estágio e a linha sólida indica a curva usando o valor de *h* na janela final. O emprego de tal análise é justificado pela relação existente entre as variáveis, entretanto

ocorre a violação dos pressupostos para o emprego da regressão paramétrica.

No tratamento controle (Figura 1), observa-se grande dispersão dos dados e pequenas alterações na produção de leucócitos totais conforme o peso do fígado.

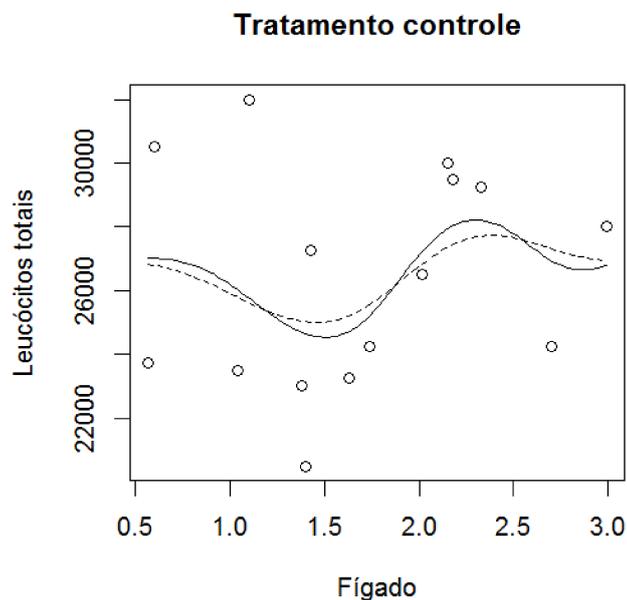


Figura 1. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta isenta de gengibre ($h_1=1,011$; $h_2=0,79$)

Na inclusão de 5 g Kg⁻¹ (Figura 2), observa-se maiores valores de leucócitos totais nos peixes que tiveram maior peso do fígado. Conforme a equação de regressão, a produção estimada de leucócitos nos peixes com o maior peso do fígado (3,77g) foi de 36488, valor próximo ao valor real de 36000.

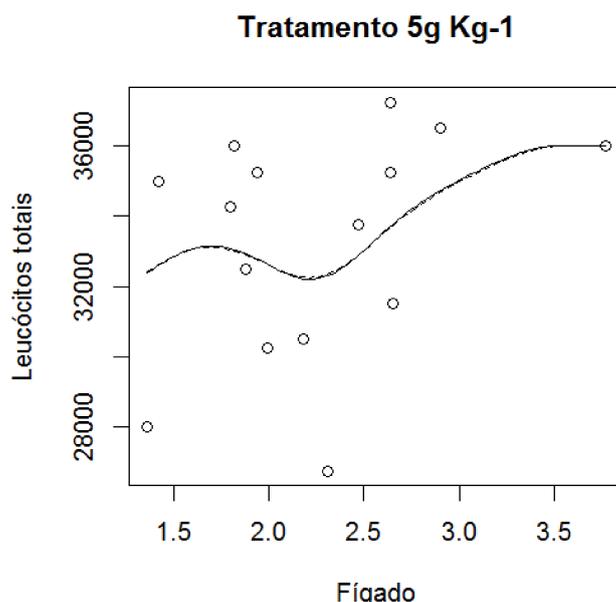


Figura 2. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta contendo 5 g Kg⁻¹ gengibre ($h_1=0,81$; $h_2=0,79$)

Para os peixes alimentados com a dieta contendo 10 g Kg^{-1} (Figura 3), observa-se aumento na produção de leucócitos até o peso do fígado variando entre 1,81 a 1,99 com produção média estimada de 32798. Posteriormente observa-se um declínio, sendo que o maior peso do fígado proporcionou menor número de leucócitos, como valor estimado de 17136, valor próximo ao observado de 17500. Este comportamento pode indicar possível efeito tóxico, como depleção no número de leucócitos.

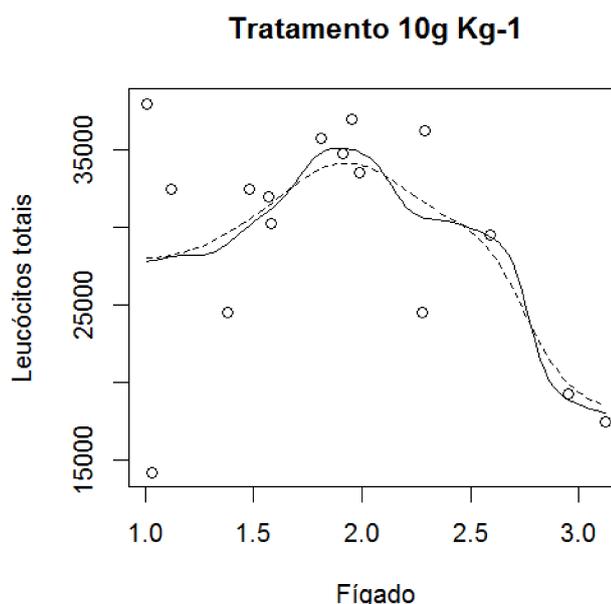


Figura 3. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta contendo 10 g Kg^{-1} gengibre ($h_1=0,58$; $h_2=0,36$)

No tratamento 15 g Kg^{-1} (Figura 4) foram observados os menores valores de leucócitos totais quando comparado aos demais tratamentos, tendo a maior produção com os maiores valores de peso de fígado. Neste tratamento é possível observar um ponto positivo quanto ao método de dois estágios de estimação. Observa-se que no primeiro estágio, o valor de $h=1,79$. Já no segundo estágio, esse valor reduziu para 0,57. Quando os dados são heterocedásticos, o valor de h tende a ser maior, prejudicando a qualidade do ajuste e o método proposto por Fan e Gijbels (1995) minimiza esse problema. Conforme os valores estimados pela regressão, a maior produção de leucócitos ocorre com o maior peso do fígado (2,71g) com valor estimado de 22422, já o valor observado foi de 21000.

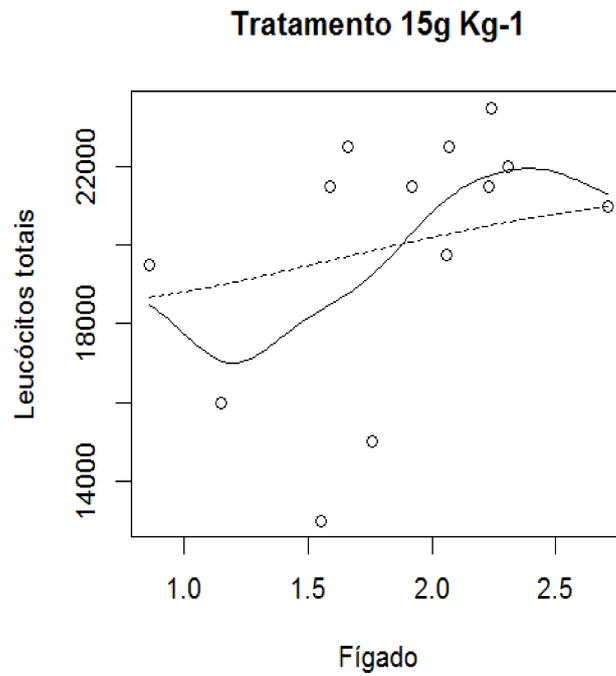


Figura 4. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta contendo 15g Kg⁻¹ gengibre ($h_1=1,79$; $h_2=0,57$)

No tratamento com inclusão de 20g Kg⁻¹ (Figura 5), observa-se uma redução no número de leucócitos com a aumento no peso do fígado. Maior número de leucócitos foi estimado com peso do fígado de 1,04g, valor correspondente a 30088 mantendo-se com poucas variações 1,8g, como produção média estimada de 22983.

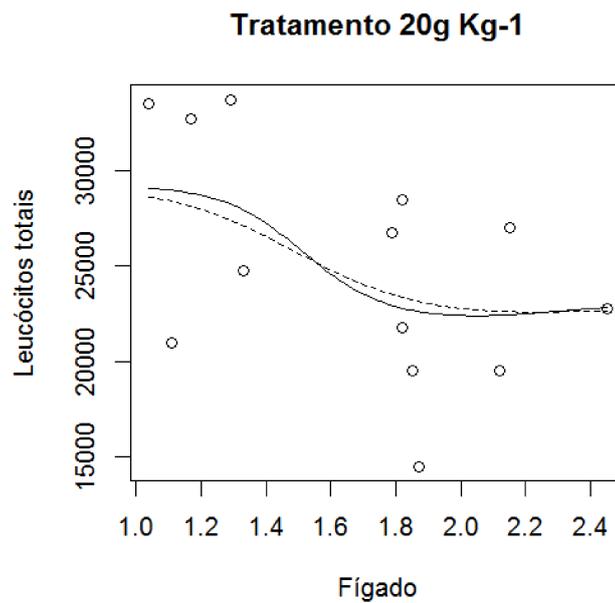


Figura 5. Relação entre o peso do fígado e o número total de leucócitos nos peixes alimentados com dieta contendo 20g Kg⁻¹ gengibre ($h_1=0,95$; $h_2=0,73$)

5. CONCLUSÃO

Conforme os resultados encontrados neste estudo, a inclusão de gengibre influencia na produção de células sanguíneas de tilápia-do-nylo e a relação entre o peso do fígado e a produção de leucócitos totais.

Os resultados aqui exposto ainda continuarão a serem analisados, onde responderemos os seguintes questionamentos:

- Qual o método mais adequado de comparação quando as variáveis são heterocedásticas?
- Será que existe diferença estatística entre os tratamentos para a relação entre as variáveis peso do fígado e produção de leucócitos totais? Isto é, se as curvas de regressão das figuras 1-5 são evidências significativas contra a hipótese de igualdade das correspondentes funções de regressão nos grupos de tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALY, S. M.; MOHAMED, M. F. Echinacea purpurea and Allium sativum as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 5, p. e31-e39, 2010.

ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLETT, A.C.T.; MACHADO, S.M.F. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ARULVASU, C.; MANI, K.; CHANDHIRASEKAR, D.; PRABHU, D.; SIVAGNANAM, S. Effect of dietary administration of *Zingiber officinale* on growth, survival and immune response of Indian major carp, *Catla catla* (Ham). **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 5, n. Suppl 2, p. 108-115, 2013.

FAN, J.; GIJBELS, I. Data-driven bandwidth selection in local polynomial fitting: variable bandwidth and spatial adaptation. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, p. 371-394, 1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. Fishery and aquaculture statistics, 2014.

GRZANNA, R.; LINDMARK, L.; FRONDOZA, C.G. Ginger-an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. **Journal of medicinal food**, v. 8, n. 2, p. 125-132, 2005.

HSU, K.; KANKI, J. P.; LOOK, A. T. Zebrafish myelopoiesis and blood cell development. **Current opinion in hematology**, v. 8, n. 4, p. 245-251, 2001.

IWASHITA, K.; YAMAKI, K.; TOJIRO, T. (*Zingiber mioga* Rosc.) Extract Prevents 3T3-L1 Differentiation into Adipocytes and Obesity in Mice. **Food and Science Technology Research**, v.7 (2) p.164–170, 2001.

JOHNSON, R. A.; BHATTACHARYYA, G. K. Statistics: Principles and methods, 6th Edition. 2006.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952.

LEHMANN, E. L. NONPARAMETRICS Statistical Methods based on ranks. Prentice Hall, N. Jersey, 1998

LIMA, K. S.; CIPRIANO, F.; OLIVEIRA JÚNIOR, F. M.; TONINI, W. C. T.; DE SOUZA, R. H. B.; SIMÕES, I. G. P. C.; BRAGA, L. G. T. Performance and hematological variables of piavuçu whose diets were supplemented with phytobiotic and probiotic additives. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, p. 2881-2892, 2015.

MATSUDA, A.; WANG, Z.; TAKAHASHI, S.; TOKUDA, T.; MIURA, N.; HASEGAWA, J. Upregulation of mRNA of retinoid binding protein and fatty acid binding protein by cholesterol enriched-diet and effect of ginger on lipid metabolism. **Life sciences**, v. 84, n. 25, p. 903-907, 2009.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of **Design and analysis of experiments** experiments. 3a ed. New York: Wiley; 1991

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. **Applied statistics and probability for engineers**. John Wiley & Sons, 2010.

NADARAYA, E. A. On estimating regression. **Theory of Probability & Its Applications**, v. 9, n. 1, p. 141-142, 1964.

NYA, E. J.; AUSTIN, B. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 11, p. 971-977, 2009.

ROMERO, J.; FEIJOÓ, C. G.; NAVARRETE, P. Antibiotics in aquaculture-use, abuse and alternatives. **INTECH** Open Access Publisher, 2012.

SINGH, A.B.; AKANKSHA, S. N; MAURYA, R., SRIVASTAVA, A.K., 2009. Anti-hyperglycaemic, lipid lowering and anti-oxidant properties of [6]-gingerol in db/db mice. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 1, n. 12, p. 536-544, 2009.

TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M.; BOLONG, A.M.A. 2013. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, v. 400, p. 46-52, 2013.

TAVARES, M. D.; MORAES, F. R. Hematologia de peixes teleósteos. **Hematologia de peixes teleósteos**, 2004.

WAND, M. P.; JONES, M. C. Kernel Smoothing. Chapman and Hall. London. 1995.

WASSERMAN, L. **All of nonparametric statistics**. Springer Science & Business Media, 2006.

WATSON, G. S. Smooth regression analysis. **Sankhyā: The Indian Journal of Statistics, Series A**, p. 359-372, 1964.

ZICK, S.M.; DJURIC, Z.; RUFFIN, M.T.; LITZINGER, A.J.; NORMOLLE, D.P.; ALRAWI, S.; FENG, M.R.; BRENNER, D.E. 2008. Pharmacokinetics of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 8, p. 1930-1936, 2008.