



LUIZ FERNANDO SILVA RESENDE

**MODELOS PARA EVENTOS RECORRENTES NA
MENSURAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MORTALIDADE
ENTRE ABELHAS EM EXPERIMENTOS LABORATORIAIS**

**LAVRAS – MG
2019**

LUIZ FERNANDO SILVA RESENDE

**MODELOS PARA EVENTOS RECORRENTES NA MENSURAÇÃO DA
INFLUÊNCIA DA MORTALIDADE ENTRE ABELHAS EM EXPERIMENTOS
LABORATORIAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Estatística e Experimentação, área de concentração em Análise de Sobrevivência, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Carla Regina Guimarães Brighenti
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Resende, Luiz Fernando Silva.

Modelos para eventos recorrentes na mensuração da influência da mortalidade entre abelhas em experimentos laboratoriais / Luiz Fernando Silva Resende. – 2019.

80 p. : il.

Orientadora: Carla Regina Guimarães Brighenti.

Dissertação (Mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Cox. 2. Estratificação. 3. Risco Basal. I. Brighenti, Carla Regina Guimarães. II. Título.

LUIZ FERNANDO SILVA RESENDE

**MODELOS PARA EVENTOS RECORRENTES NA MENSURAÇÃO DA
INFLUÊNCIA DA MORTALIDADE ENTRE ABELHAS EM EXPERIMENTOS
LABORATORIAIS**

**MODELS FOR RECURRENT EVENTS RELATED TO THE MEASUREMENT OF
BEE MORTALITY INFLUENCES IN LABORATORY EXPERIMENTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Estatística e Experimentação, área de concentração em Análise de Sobrevivência, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de Junho de 2019.

Prof. Dr. Paulo Henrique Sales Guimarães	UFLA
Prof. Dr. Stephan Malfitano Carvalho	UFLA
Profa. Dra. Luciane Teixeira Passos Giarola	UFSJ

Profa. Dra. Carla Regina Guimarães Brighenti
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Estatística, juntamente com seus docentes e funcionários, pela oportunidade de crescimento e aprendizado. À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro que foi de grande importância para concretização deste trabalho.

RESUMO

Ao se realizar experimentos com abelhas em laboratórios, as características de interesse são analisadas em grupos de abelhas confinadas em gaiolas, por se tratar de insetos que vivem em sociedade e, para evitar alterações fisiológicas e comportamentais, devem ser mantidos sempre em grupo. Normalmente, se avalia a mortalidade em intervalos de tempo pré-determinados. Assim, os dados obtidos são censurados, ou seja, não se conhece o tempo exato de ocorrência da característica de interesse. Então, se faz necessária a utilização de técnicas estatísticas de análise de sobrevivência, que consiste em um conjunto de métodos para a avaliação de dados em que a variável resposta é o tempo, até a ocorrência de algum evento de interesse. Além disso, a mortalidade de uma abelha ocorrida dentro da gaiola pode afetar os outros indivíduos. Assim, teríamos observações correlacionadas. Os modelos paramétricos em análise de sobrevivência são úteis quando a distribuição até o evento é supostamente conhecida, e os modelos mais conhecidos são o exponencial, Weibull, log-normal. Já o modelo semiparamétrico de Cox é robusto e flexível em diversos contextos, como estratificação, variáveis dependentes do tempo, eventos múltiplos. Na primeira parte deste trabalho, realizou-se a análise de experimento considerando dados de abelhas *Trigona spinipes* submetidas a duas vias de intoxicação do repelente natural Neem: por contato (pulverização) ou oral (ingestão). Os dados foram coletados a cada 12 horas, sendo a variável resposta o tempo até a ocorrência da morte da abelha e o método de aplicação do repelente considerado como covariável. Foi realizada a análise não paramétrica, o ajuste pelo modelo paramétrico de Weibull e a técnica semiparamétrica por modelos proporcionais de Cox utilizando o pacote *icenReg* no R. Pode-se dizer que a ingestão do repelente causa menor dano às abelhas-irapuá do que a pulverização do mesmo, principalmente nas primeiras 288 horas, com o melhor ajuste sendo o semiparamétrico. Concluiu-se que a via de intoxicação das abelhas, ou seja, a forma de aplicação do repelente é o fator de maior significância, sendo a pulverização a via de intoxicação que causa mortalidade. Assim, recomenda-se que o horário de aplicação do produto seja diferente do horário de forrageamento da *Trigona spinipes*. Na segunda parte deste trabalho, estudou-se algumas variações do modelo de Cox para eventos recorrentes em dados de bioensaio de toxicidade oral, ao longo do tempo, com abelhas africanizadas. Em estudos de sobrevivência em abelhas africanizadas raramente são consideradas as proporções de mortalidade, dentro das unidades experimentais, nos ajustes dos modelos. Isso é importante, em razão das características de comportamento higiênico destas. A morte de cada abelha constituiu o evento de interesse e o seu intervalo de tempo foi registrado. Foram considerados os modelos clássicos de Cox e suas adaptações para eventos recorrentes denominadas AG, LWA, GT-UR, PWP-CP, PWP-GT e TT-R. Para selecionar o modelo que melhor se ajuste aos dados, foram utilizados os testes de Wald, da razão de verossimilhança, Logrank e o critério de informação de AIC. Para avaliar a suposição básica de riscos proporcionais para o uso do modelo de regressão de Cox, foram utilizadas técnicas de análise gráfica do risco acumulado, dos Resíduos de Schoenfeld, dos Resíduos de Martingale e Resíduo Deviance. Os modelos estratificados que consideram a dependência da proporção de mortalidade em abelhas africanizadas dentro da gaiola mostraram-se superiores aos não estratificados, sendo o modelo PWP-CP, com intervalo do tipo Counting Process, o que apresentou melhor ajuste.

Palavras-chave: Cox. Estratificação. Risco Basal. *Trigona spinipes*. *Apis mellifera*.

ABSTRACT

When bee experiments are conducted in laboratories, the interested features are analyzed in groups of caged bees, and typically, the mortality is evaluated considering specific periods of time. Therefore, since all the data is censored, the exact period of the interested feature is unknown. This happens because bees are insects that live in society, and in order to avoid any physiologic and behavioral changes, they should always be kept in groups. Thus, statistical techniques are required for survival analysis, consisting in a set of methods for data evaluation in which the variable is the time until the occurrence of some event of interest. The death of an individual inside the cage could affect all the other bees, leading to correlated observations. The parametric models in survival analysis are useful when the distribution until the event is supposedly known, and the best-known models are: the exponential, Weibull, lognormal and the Cox semiparametric model, with the latter being robust and flexible in several contexts, such as stratification, time dependent variables and multiple events. In the first part of this research, it was performed the analysis of experiments considering data from *Trigona spinipes* bees, with two routes of intoxication using the natural Neem repellent: by contact (spray) or oral (ingestion). The data from the experiment were collected at every 12 hours, having the time until the occurrence of bee death as variable and the method of how the repellent was applied as covariate. Non-parametric analysis was performed, adjusting the parametric model of Weibull and a semiparametric technique by proportional models of Cox, using the IceReg package in R. It can be stated that the repellent ingestions causes less damage to *T. spinipes* than the contact (or spraying) of it, especially in the first 288 hours, with the best adjustments being the semiparametric model. It was concluded that the most significant route for bee intoxication was the way that the repellent was applied; the highest mortality was caused by spraying. Thus, it is recommended that the product application time should differ from the foraging time of *T. spinipes*. In the second part of this research some variations of the Cox model were studied over time for recurrent events in bio-assay data of oral toxicity in Africanized bees. Survival studies using Africanized bees almost never consider proportions of mortalities within experimental units. This is relevant due to the hygienic behavior of this species. The death of each bee created an event of interest and its time interval was recorded. The classic Cox models and their adaptations for recurrent events denominated AG, LWA, GT-UR, PWP-CP, PWP-GT and TT-R were considered. In order to select the model that best fits the data, it was used: the Wald test, the verisimilitude ratio, Logrank, and the AIC information criteria. Moreover, for the basic risk analysis for the use of the Cox regression model, techniques of graphical analysis of accumulated risk - Schoenfeld Residual, Martingale Residual and Deviance Residual - were used. The stratified models, which consider the dependence of the proportion of mortality on Africanized Bees inside the cage, were higher than those that were not stratified, being the The PWP-CP model, with a Counting Process type interval, the best fit.

Keywords: Cox. Stratification. Hazard. *Trigona spinipes*. *Apis mellifera*.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 2.1 - Representação gráfica de censura à direita.....	16
Figura 2.2 - Representação gráfica de censura à esquerda.....	17
Figura 2.3 - Representação gráfica de censura intervalar.	18
Figura 2.4 - Representação gráfica de dados grupados.....	19
Figura 2.5 - Exemplo eventos recorrentes.....	31
Figura 2.6 - Total time (TT).	32
Figura 2.7 - <i>Counting Process</i> (CP).....	33
Figura 2.8 - Gap Time (GT).	34

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1. Curva de Sobrevivência ($S(t)$) de abelhas <i>Trigona spinipes</i> em função dos produtos químicos de diferentes repelentes Neem para as duas vias de intoxicação. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.....	55
Figura 2. Comparação entre os modelos paramétricos para sobrevivência de abelhas <i>Trigona spinipes</i> e as estimativas de Turnbull. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.	56
Figura 3. QQPlot entre os modelos paramétricos e as estimativas de Turnbull para sobrevivência de abelhas <i>Trigona spinipes</i> . Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.	56
Figura 4. Curva de Sobrevivência semiparamétrica $St = [S_0(t)]\exp 0,3154$ de abelhas <i>Trigona spinipes</i> submetidas ao repelente Neem. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.....	57
Figura 5. Curva de Sobrevivência $S(t) = \exp - t150,2 + 1,366 * x11,142$ de abelhas <i>Trigona spinipes</i> em função de diferentes vias de intoxicação do repelente Neem, sendo $x_1=0$ intoxicação via oral e $x_1=1$ intoxicação via contato. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.	57
Figura 6. Modelo de Cox $St = [S_0(t)]\exp 0,21653 * x1$ de sobrevivência das abelhas <i>Trigona spinipes</i> em função de diferentes vias de intoxicação do repelente	

Neem, sendo $x_1=0$ intoxicação via oral e $x_1=1$ intoxicação via contato.
 Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ,
 São João del Rei-MG, 2018. 58

ARTIGO 2

- Figura 1. Resíduos de Schoenfeld, Martingale e Deviance para verificar a pressuposição de riscos proporcionais..... 71
- Figura 2. Função de sobrevivência do modelo PWP-CP $Sx|ti = \lambda 0ktiexpc'0,33054$ para cada estrato. 74

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 2.1 - Equações dos modelos recorrentes e seus respectivos riscos basais, intervalos sob risco e estratificação.	36
---	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1. Sobrevivência ($S(t)$) de abelhas <i>Trigona spinipes</i> em função de diferentes vias de intoxicação do repelente Neem ($x_1=0$ intoxicação via oral e $x_1=1$ intoxicação via contato) e suas diferenças d_i em função do tempo t_i . Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.	53
Tabela 2. Estimativas dos modelos paramétricos para sobrevivência de abelhas <i>Trigona spinipes</i> . Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.	54
Tabela 3. Estimativas obtidas para o modelo de regressão paramétrico de sobrevivência ($S(t)$) de abelhas <i>Trigona spinipes</i> . Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.	54
Tabela 4. Modelos de regressão semiparamétrico de sobrevivência ($S(t)$) de abelhas <i>Trigona spinipes</i> . Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.	55

ARTIGO 2

Tabela 1. Equações dos modelos recorrentes e seus respectivos riscos basais, interval sob risco e estratificação.	66
Tabela 2. Valores dos parâmetros, erro padrão e valores p no teste de Wald para cada modelo.	69
Tabela 3. Teste da razão de verossimilhança (LHR), Logrank e Akaike (AIC) para seleção do melhor modelo.	70
Tabela 4. Valores do risco basal $\lambda_{0k t_i}$ do modelo $\lambda_{x t_i} = \lambda_{0k t_i} \exp x * 0,33054$ para cada estrato e tempo.	72
Tabela 5. Estimativas globais dos parâmetros, Limite Inferior (LI) e Limite Superior (LS) associados ao modelo PWP-CP $\lambda_{x t_i} = \lambda_{0k t_i} \exp x * 0,33054$	72

Tabela 6. Estimativas globais dos parâmetros associados ao modelo PWP-CP $\lambda_{x ti} = \lambda_0 k t i \exp x * 0,33054$	73
--	----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Dados de sobrevivência	14
2.2	Dados censurados	15
2.3	Dados grupados	18
2.4	Técnicas não paramétricas.....	19
2.4.1	Estimador de Kaplan-Meier	19
2.4.2	Estimador de Turnbull	20
2.5	Modelos paramétricos	21
2.5.1	Distribuição exponencial	21
2.5.2	Distribuição Weibull.....	22
2.5.3	Distribuição log-normal	24
2.5.4	Seleção do modelo paramétrico	24
2.5.4.1	Critério de informação de AIC	25
2.5.4.2	Teste de Wald	25
2.5.4.3	Teste da razão de verossimilhança	26
2.5.4.4	Teste logrank.....	26
2.5.4.5	Resíduos Martingale.....	27
2.5.4.6	Resíduos Deviance	27
2.6	Modelos semiparamétrico	27
2.6.1	Riscos proporcionais de Cox	27
2.6.2	Método de máxima verossimilhança parcial	28
2.7	Seleção do modelo semiparamétrico	29
2.7.1	Resíduos de Schoenfeld	29
2.8	Eventos recorrentes	30
2.8.1	Intervalo sob risco	31
2.8.2	Risco basal	34
2.8.3	Estratificação	34
2.8.3.1	Modelos não estratificados.....	35
2.8.3.2	Modelos estratificados.....	35
2.8.4	Modelos	35
	REFERÊNCIAS	37
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	40
	ARTIGO 1 - MODELOS DE SOBREVIVÊNCIA PARA A AVALIAÇÃO DE DIFERENTES VIAS DE INTOXICAÇÃO DO REPELENTE NEEM EM ABELHAS <i>Trigona spinipes</i>.....	40
	ARTIGO 2 - MODELOS PARA EVENTOS RECORRENTES NA MENSURAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MORTALIDADE ENTRE ABELHAS DE UMA MESMA GAIOLA EM EXPERIMENTOS LABORATORIAIS.....	59

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Na realização de experimentos laboratoriais com abelhas, é usual o registro do tempo de vida destas em diferentes tratamentos. No entanto, há dificuldade na condução dos experimentos, visto que, por se tratar de insetos sociais, é necessário que, nos experimentos, esses indivíduos sejam mantidos em grupos. Outro agravante é a dificuldade em realizar anotações individuais, em razão da capacidade de voo. Além disso, muitos dos registros são realizados em intervalos de tempos pré-determinados.

Do ponto de vista estatístico, o tipo de experimento descrito anteriormente é caracterizado como um evento de interesse típico, passível de reavaliação da análise de sobrevivência na qual há censura intervalar e dados grupados.

Para trabalhar com tais dados, é possível utilizar estimativas não paramétricas, modelos paramétricos ou semiparamétricos, tais como: Kaplan-Meier, regressão de Weibull ou modelo de Cox. No entanto, um fator que tem despertado interesse nessa área de pesquisa, é que a unidade experimental pode ser a própria abelha, ou um grupo de abelhas mantidas confinadas em uma gaiola. Quando se considera um grupo de abelhas, deve-se levar em conta que pode ocorrer uma dependência entre tempo e a mortalidade ocorrida nos diferentes tempos de avaliação. Isso pode ocorrer, em razão dos fatores intrínsecos do inseto, tais como: características de grooming e comportamento higiênico. Para modelar tal dependência, não há na literatura, proposta de análise que contemple tal efeito aleatório.

Na análise de sobrevivência há sugestões para modelar os chamados eventos múltiplos que correspondem à ocorrência de eventos de interesse mais de uma vez para a mesma unidade experimental. Existem alguns modelos adaptados do modelo de Cox para dados de eventos múltiplos, todos utilizando três estruturas principais: intervalo sob risco, risco basal e estratificação. O intervalo sob risco corresponde aos limites de tempo considerados, podendo ser registrados de três maneiras distintas: Total Time, Counting Process e Gap Time. Já o risco basal é uma função dependente do tempo que pode ser comum ou variável a todos os eventos. Quanto à estratificação, os modelos podem ser estratificados ou não.

Assim sendo, objetivou-se, neste trabalho, avaliar diferentes modelos de análise de sobrevivência em experimentos com abelhas. Inicialmente apresentam-se os principais conceitos para análise de eventos únicos ou múltiplos em análise de sobrevivência. Posteriormente, realizou-se a análise de dois experimentos. Primeiro, que trata da avaliação de

diferentes vias de intoxicação do repelente natural Neem em abelhas sem ferrão, da espécie *Trigona spinipes*.

Neste primeiro artigo, utilizaram-se técnicas não paramétricas, paramétricas e semiparamétricas, considerando como covariáveis a exposição ao Neem por contato ou via oral.

No segundo artigo, realizou-se a análise de diferentes concentrações de glifosato, um herbicida muito utilizado para a proteção de infestação de pragas em culturas, que pode causar prejuízos às colmeias. Nessa análise, considerou-se a gaiola como unidade experimental, sendo os eventos múltiplos a mortalidade das abelhas ocorrida ao longo do tempo. Diferentes modelos considerando as correlações entre as taxas de mortalidade foram ajustados e comparados, por meio de análises gráficas e de resíduos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dados de sobrevivência

A análise de sobrevivência é um ramo da estatística que se originou a partir de pesquisas biomédicas, na qual o objetivo dos pesquisadores era estudar a mortalidade (DELEN; WALKER; KADAM, 2005). Atualmente, o estudo de sobrevivência analisa dados cuja variável resposta é o tempo (t) até a ocorrência de um evento de interesse em determinado indivíduo (i), e requer dois dados que são considerados simultaneamente: o tempo durante o qual o acompanhamento foi disponibilizado e o status do acompanhamento de cada indivíduo ($Y_i(t)$). A primeira variável é contínua (tempo) e a segunda, categórica, especificando se o ponto final foi o evento de interesse, ou se ainda não ocorreu no instante t . Frequentemente, a duração do acompanhamento varia entre os indivíduos, porque o recrutamento do estudo geralmente ocorre ao longo do tempo, mas o status pode ser avaliado posteriormente para todos os indivíduos no mesmo ponto no tempo (RANSTAM; COOK, 2017). Segundo Silva (2016), o acompanhamento de cada indivíduo é feito por:

$$Y_i(t) = \begin{cases} 0 & \text{se indivíduo } i \text{ não estiver sob risco no instante } t \\ 1 & \text{se indivíduo } i \text{ estiver sob risco no instante } t \end{cases} \quad (2.1)$$

Sendo o tempo de sobrevivência (T) uma variável aleatória contínua e não negativa, pode-se definir três funções para descrever os diferentes aspectos apresentados pelos dados de sobrevivência. As três funções são: a função densidade de probabilidade, $f(t)$, a função de sobrevivência, $S(t)$, e a função de risco, $\lambda(t)$ (TOMAZELLA, 2003).

a) Função densidade de probabilidade

A função densidade será $f(t) > 0$ para todo t e é definida como o limite da probabilidade da ocorrência do evento de um indivíduo no intervalo de tempo $[t, t + dt)$ e é expressa por (COX; OAKES, 1984):

$$f(t) = \lim_{dt \rightarrow 0} \frac{P(t \leq T \leq t + dt)}{dt} \quad (2.2)$$

b) Função de sobrevivência

A função $S(t)$ descreve a forma distribucional dos tempos de sobrevivência através da probabilidade da não ocorrência do evento de interesse até o instante t , e é denominada função de sobrevivência. $S(t)$ é uma função não crescente, com $S(0) = 1$ e $S(\infty) = \lim_{t \rightarrow \infty} S(t) = 0$. $S(t)$ é dada por (LAWLESS, 1982):

$$S(t) = P(T \geq t) \quad (2.3)$$

c) Função de risco

A função de risco, ou função de taxa de falha, é definida pelo limite da probabilidade de um indivíduo falhar no intervalo de tempo $[t, t + dt)$ para dt tendendo a zero, dado que o mesmo não tenha falhado, até o instante t , e é expressa por (COX; OAKES, 1984):

$$\lambda(t) = \lim_{dt \rightarrow 0} \frac{P(t \leq T < t + dt | T \geq t)}{dt} = \frac{f(t)}{S(t)} \quad (2.4)$$

2.2 Dados censurados

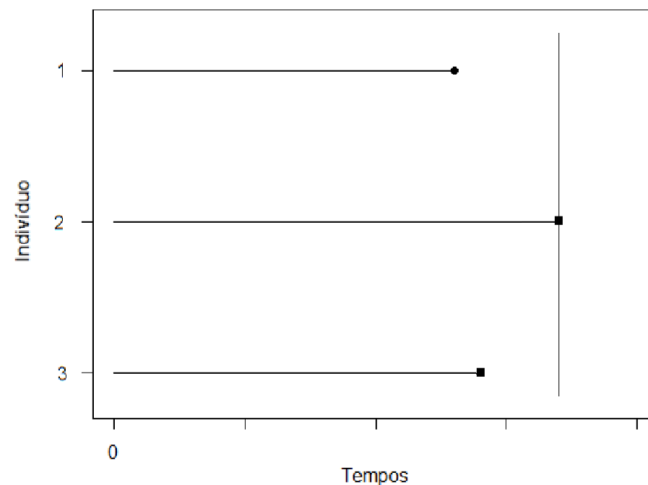
Uma dificuldade na análise de dados de sobrevivência é a possibilidade de alguns indivíduos não serem observados até a falha, ou seja, obter apenas uma observação parcial da resposta. Essa observação incompleta do tempo de falha é chamada de censura. É importante ressaltar que a censura é um evento de suma importância e que o período de observação para indivíduos censurados deve ser registrado. A censura é dividida em três tipos: censura à direita, censura à esquerda e censura intervalar (KALBFLEISCH; PRENTICE, 2011).

a) Censura à direita

Censura à direita acontece quando o evento de interesse ocorre após o término do estudo. A censura à direita pode acontecer em três situações específicas, quando o estudo é encerrado após um período pré-estabelecido de tempo, chamada também de censura tipo I, quando o estudo é encerrado após ter ocorrido o evento de interesse em um número pré-estabelecido de indivíduos, chamada de censura tipo II, se quando a observação for retirada no decorrer do estudo, em razão de a falha ter ocorrido por uma razão diferente da estudada, nesses casos a censura à direita é classificada como censura aleatória (TOMAZELLA, 2003).

Na Figura 2.1 somente o indivíduo 1 teve a ocorrência do evento antes do fim do estudo, o indivíduo 2 não teve ocorrência do evento, durante o prazo estabelecido pelo estudo. Caso o prazo tenha sido determinado por uma unidade de tempo pré-estabelecida, trata-se de censura à direita do tipo I; se o prazo tiver sido determinado por uma quantidade pré-determinada de falhas, então se trata de censura à direita do tipo II. O indivíduo 3 foi retirado do experimento por um motivo diferente do evento de interesse, então se trata de uma censura à direita aleatória.

Figura 2.1 - Representação gráfica de censura à direita



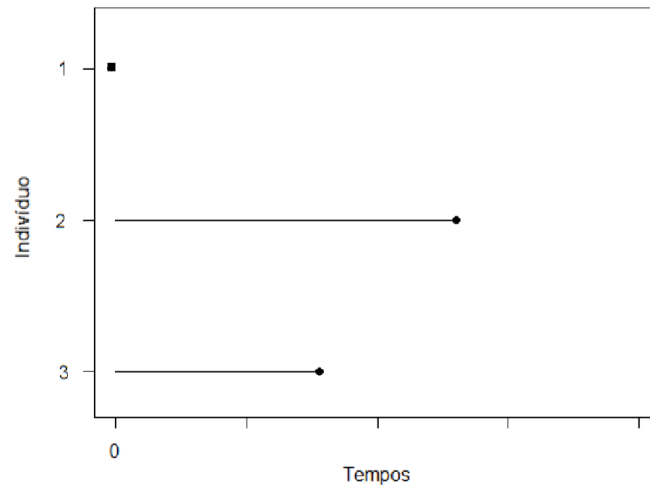
Legenda: Exemplo com três indivíduos em um estudo de análise de sobrevivência, em que o fim do estudo é representado por uma reta vertical, falhas pelo círculo, e censura pelo quadrado. Indivíduo 1 teve ocorrência do evento, indivíduo 2 censura à direita do tipo I e o indivíduo 3 censura à direita aleatória.

Fonte: Giolo e Colosimo (2006).

b) Censura à esquerda

Quando não se conhece o momento da ocorrência do evento de interesse, mas sabe-se que houve a ocorrência antes do tempo observado, acontece censura à esquerda (SILVA, 2016). Na Figura 2.2, percebe-se que, enquanto os indivíduos 2 e 3 tiveram ocorrência do evento durante o experimento, ao iniciar o estudo, o indivíduo 1 já havia ocorrido o evento, representado pela censura no tempo $t = 0$.

Figura 2.2 - Representação gráfica de censura à esquerda.



Legenda: Exemplo com três indivíduos em um estudo de análise de sobrevivência. Indivíduo 1 foi marcado como censura à esquerda, indivíduo 2 e 3 tiveram a ocorrência do evento.

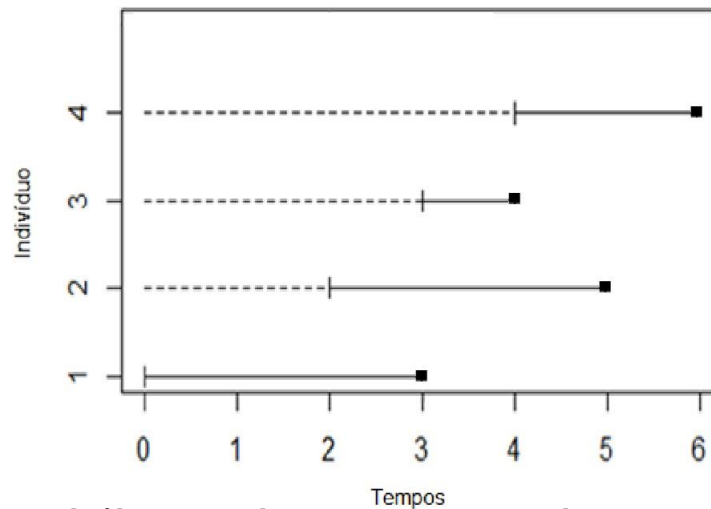
Fonte: Giolo e Colosimo (2006).

c) Censura intervalar

Censura intervalar são dados nos quais o limite inferior (T_0) de tempo informa o último tempo em que se sabe que não houve ocorrência da falha e o limite superior (T_F) informa o instante em que foi verificado que a falha já havia ocorrido, ou seja, $T \in [T_0; T_F]$. Os dados censurados, por intervalo, surgem comumente na prática quando apenas o tempo de falha é conhecido em algum intervalo. Esses são analisados, adequadamente, usando métodos que respondem por essa incerteza na medição do tempo do evento (FU; SIMONOFF, 2015).

Na Figura 2.3, nenhum indivíduo teve a ocorrência de seu evento marcada no exato momento da falha. O indivíduo 1 entre $T_0 = 0$ e $T_F = 3$, o indivíduo 2 entre $T_0 = 2$ e $T_F = 5$, o indivíduo 3 entre $T_0 = 3$ e $T_F = 4$ e o indivíduo 4 entre $T_0 = 4$ e $T_F = 6$. Ou seja, nesse exemplo, todos os casos são de censura intervalar. Também é possível dizer que o indivíduo 1 não foi avaliado nos tempos $t = 1$ e $t = 2$, uma vez que o último tempo em que se sabe que não houve ocorrência da falha foi em $T_0 = 0$ e o instante em que foi verificado que a falha já havia ocorrido foi em $T_F = 3$, de maneira análoga pode-se afirmar que o indivíduo 2 não foi avaliado nos tempos $t = 3$ e $t = 4$ e o indivíduo 4 não foi avaliado no tempo $t = 5$.

Figura 2.3 - Representação gráfica de censura intervalar.



Exemplo com quatro indivíduos marcado como censura intervalar em um estudo de análise de sobrevivência. Em que a linha horizontal pontilhada mostra os tempos em que o indivíduo estava sobre risco e a linha contínua representa o intervalo da censura intervalar.

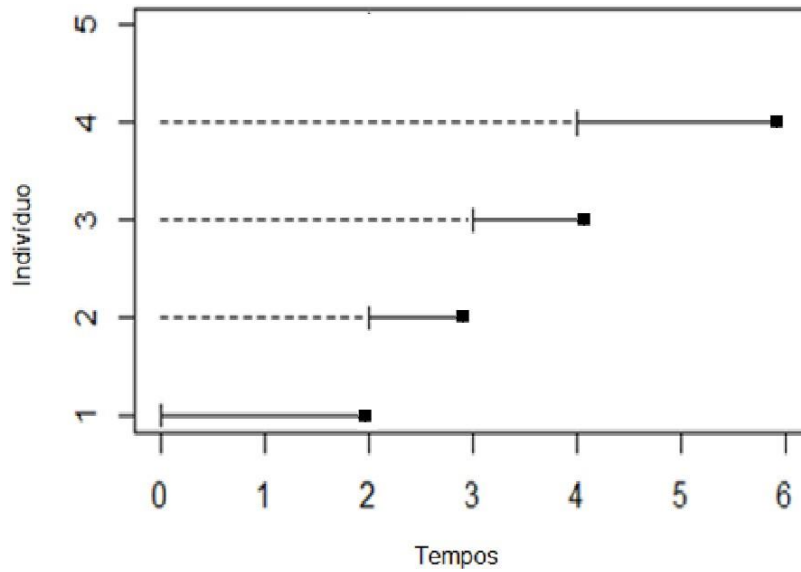
Fonte: Giolo e Colosimo (2006).

2.3 Dados grupados

Dados de sobrevivência grupados são casos particulares de censura intervalar quando os indivíduos são avaliados nos mesmos tempos. O agrupamento, na maioria das vezes, ocorre por limitações de instrumentos de medidas (STRAPASSON, 2007) ou por necessidade dos indivíduos avaliados, como é o caso de experimentos realizados com abelhas. Nesse caso, o recomendado é que as características de interesse sejam analisadas em grupo de abelhas confinadas em gaiolas (PIRK et al., 2013). Isto ocorre por se tratar de inseto que vive em sociedade e, para evitar alterações fisiológicas e comportamentais deve ser mantido sempre em grupo (JESUS, 2017).

Na Figura 2.4, tem-se um caso em que todos os indivíduos são dados grupados, uma vez que todos foram avaliados nas mesmas unidades de tempo, $t = 0$, $t = 2$, $t = 3$, $t = 4$ e $t = 6$. Por se tratarem de dados grupos é possível afirmar que nenhum indivíduo foi avaliado nos tempos $t = 1$ e $t = 5$.

Figura 2.4 - Representação gráfica de dados agrupados.



Legenda: Exemplo com quatro indivíduos marcado como dados agrupados.
Fonte: Giolo e Colosimo (2006).

2.4 Técnicas não paramétricas

As técnicas não paramétricas são estimativas obtidas para $S(t)$ em cada tempo t_i , obtendo-se percentis em determinados tempos e estatísticas básicas como média e mediana. Ao estimar a função de sobrevivência, também é possível resumir, visualmente, os dados de tempo para o evento de interesse (RANSTAM; COOK, 2017). A seguir, serão apresentadas duas técnicas não paramétricas utilizadas neste estudo.

2.4.1 Estimador de Kaplan-Meier

O estimador não paramétrico de Kaplan e Meier (1958) é uma estimativa para a função de sobrevivência $\hat{S}(t)$ que, considera na sua construção, tantos intervalos de tempo quantos forem o número de falhas distintas. Os limites dos intervalos de tempo são os tempos de falha da amostra. O estimador de Kaplan-Meier se reduz então, a estimar:

$$\hat{S}(t) = \prod_{k:t_k < t} \left(\frac{n_k - d_k}{n_k} \right) = \prod_{k:t_k < t} \left(1 - \frac{d_k}{n_k} \right) \quad (2.5)$$

Em que $t_1 < t_2 < \dots < t_K$, com K sendo o numero total de eventos distintos e ordenados, k variando de 1 à K , e d_k é o número de falhas em t_k , $k=1, \dots, K$ (KAPLAN; MEIER, 1958).

2.4.2 Estimador de Turnbull

Para casos em que os dados apresentam censura intervalar, assumir tempos de falhas intervalares como tempos exatos de falhas, pode conduzir a vícios, bem como a resultados e conclusões não muito confiáveis. Assim, a estimação não paramétrica de uma função de sobrevivência pode ser realizada a partir de um algoritmo simples denominado estimador de Turnbull (1976).

Considere uma sequência inicial de tempos $\pi_1, \pi_2, \pi_3, \dots, \pi_K$ que inclui todos os pontos do intervalo $(T_0, T_F]$, para $i = 1, 2, \dots, n$ representando uma amostra de tamanho n . Para o indivíduo i , defina o peso a_{ik} de modo que esse seja igual a 1, se o intervalo $(\pi_{k-1}, \pi_k]$, para $k = 1, \dots, K$, estiver contido em $(T_0, T_F]$, e 0 caso contrário. O peso a_{ik} indica se o evento ocorreu em $(T_0, T_F]$ poderia ter ocorrido em π_k . O valor inicial em $\hat{S}(\pi_k)$ será o obtido pelo estimador de Kaplan-Meier.

Algoritmo:

Passo 1: Encontre a probabilidade de um evento ocorrer no tempo π_k por:

$$p_k = \hat{S}(\pi_{k-1}) - \hat{S}(\pi_k) \quad (2.6)$$

Passo 2: Estime o número de eventos ocorridos em π_k por:

$$b_k = \sum_{i=1}^n \left(\frac{a_{ik} p_k}{\sum_{i=1}^n a_{ik} p_k} \right) \quad (2.7)$$

Passo 3: Obtenha o número estimado em risco no tempo π_k por:

$$\hat{S}(k) = \sum_{k=1}^K b_k \quad (2.8)$$

Passo 4: Atualize o estimador limite produto, usando os resultados obtidos nos passos 2 e 3. Se a estimativa de $\hat{S}(k)$ estiver próxima da anterior para todo π_k , pare o procedimento iterativo, caso contrário, repita os passos 1 a 3, usando os estimadores atuais de $\hat{S}(k)$ (GIOLO; COLOSIMO, 2006).

2.5 Modelos paramétricos

Os modelos de sobrevivência podem ser também paramétricos, ou seja, a $S(t)$ será determinada por parâmetros com distribuições de probabilidade conhecidas. As vantagens de se presumir que os dados são provenientes de uma determinada distribuição de probabilidade são as inferências que podem ser feitas sobre os parâmetros da distribuição (MONCHARMONT et al., 2003).

Para estimar os parâmetros, na presença de censura, há um consenso na utilização do método da máxima verossimilhança, na qual os estimadores $\hat{\theta}$ são os valores que maximizam a função $L(\theta)$ (SILVA, 2016) dada por:

$$L(\alpha) = \prod_{i=1}^n [f(t_i; \theta)]^{\delta_i} [S(t_i; \theta)]^{1-\delta_i} \quad (2.9)$$

em que δ_i corresponde a variável indicadora de falha, se houver falha $\delta_i = 1$, senão $\delta_i = 0$ e t_i é o tempo de falha do indivíduo i .

2.5.1 Distribuição exponencial

A distribuição exponencial tem um único parâmetro (α) e foi o primeiro modelo amplamente discutido em análise de sobrevivência, em razão da disponibilidade de métodos estatísticos simples para tal. Uma de suas principais características é o fato de ter função de risco constante, sendo assim muito restritiva limitando a aplicabilidade do modelo (LAWLESS, 1982).

A função de densidade de probabilidade que descreve o tempo de vida é dada por:

$$f(t) = \frac{1}{\alpha} \exp \left\{ -\left(\frac{t}{\alpha} \right) \right\}, \quad (2.10)$$

A função de sobrevivência é dada por:

$$S(t) = \exp \left\{ -\left(\frac{t}{\alpha} \right) \right\}, \quad (2.11)$$

em que α é o parâmetro de escala e tem a mesma unidade do tempo de falha t , sendo $\alpha > 0$ e α corresponde ao instante em que $S(\alpha) = 0,3679$, ou seja quando $t = \alpha$ restam 36,79% da amostra inicial (SCHULA, 2015).

A distribuição exponencial é caracterizada pela propriedade de falta de memória por apresentar uma função de risco que não depende do tempo, ou seja, $\lambda(t)$ é constante (LAWLESS, 1982). Como definido na equação (2.4):

$$\lambda(t) = \frac{f(t)}{S(t)} = \frac{\frac{1}{\alpha} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)\right\}}{\exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)\right\}} = \frac{1}{\alpha}, \quad (2.12)$$

A função de verossimilhança para uma distribuição exponencial é obtida a partir das expressões (2.9), (2.10) e (2.11) e é dada por:

$$L(\alpha) = \prod_{i=1}^n \left[\frac{1}{\alpha} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)\right\} \right]^{\delta_i} \left[\exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)\right\} \right]^{1-\delta_i} \quad (2.13)$$

Seja β_0 o intersepto, β_1 a inclinação da reta e ζ o erro, para explorar a relação entre covariáveis e a variável resposta, o modelo de regressão linear $Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \zeta$, pode ser estendido para o caso multivariado e será combinado com a distribuição exponencial produzindo o seguinte modelo (GIOLO; COLOSIMO, 2006):

$$S(t|x) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\exp\{x'\beta\}}\right)\right\}, \quad (2.14)$$

em que β é o vetor de parâmetros associado ao vetor de covariáveis $\mathbf{x}$.

2.5.2 Distribuição Weibull

A distribuição proposta por Weibull et al. (1951) tem dois parâmetros, em que α é o parâmetro de escala e γ o parâmetro de forma. E tem a função de densidade de probabilidade é dada por:

$$f(t) = \frac{\gamma}{\alpha^\gamma} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\gamma\right\}, \quad (2.15)$$

A função de sobrevivência para os indivíduos cujo tempo de vida segue uma distribuição Weibull é dada por:

$$S(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\gamma\right\}, \quad (2.16)$$

Pode-se dizer que a distribuição exponencial é um caso particular da distribuição Weibull em que o parâmetro de forma $\gamma=1$. Portanto, α também corresponde ao instante em que $S(\alpha) = 0,3679$ e, bem como α , γ é sempre positivo (SCHULA, 2015). A função de risco é dada por:

$$\lambda(t) = \frac{f(t)}{S(t)} = \frac{\gamma}{\alpha^\gamma} (t^{\gamma-1}) \quad (2.17)$$

Diferentemente da distribuição exponencial que tem função de risco constante, a distribuição de Weibull apresenta uma grande variedade de formas para a sua função de risco, podendo ser decrescente se $\gamma < 1$ e crescente se $\gamma > 1$. Como dito anteriormente a distribuição exponencial é um caso particular da distribuição Weibull, logo se $\gamma = 1$, a função de risco será constante como a função de risco da distribuição exponencial (TOMAZELLA, 2003).

A função de verossimilhança para uma distribuição Weibull é obtida a partir das expressões (2.9), (2.15) e (2.16) e é dada por:

$$L(\alpha) = \prod_{i=1}^n \left[\frac{\gamma}{\alpha^\gamma} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\gamma\right\} \right]^{\delta_i} \left[\exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\gamma\right\} \right]^{1-\delta_i} \quad (2.18)$$

Já o modelo de regressão de Weibull para t condicional a x é dado por:

$$S(t|x) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\exp\{x'\beta\}}\right)^\delta\right\}, \quad (2.19)$$

em que β é o vetor de parâmetros associados ao vetor de covariáveis x (GIOLO; COLOSIMO, 2006).

2.5.3 Distribuição log-normal

A distribuição log-normal tem dois parâmetros, em que μ é a média do logaritmo do tempo de falha e σ o desvio padrão. A função de densidade de probabilidade é dada por:

$$f(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left\{\frac{1}{2}\left(\frac{\log(t)-\mu}{\sigma}\right)^2\right\}, \quad (2.20)$$

A função de sobrevivência é dada por:

$$S(t) = \Phi\left(\frac{-\log(t)+\mu}{\sigma}\right), \quad (2.21)$$

em que Φ é a função de distribuição acumulada de uma normal padrão.

Existe uma relação entre as distribuições log-normal e normal, dados provenientes de uma distribuição log-normal podem ser analisados segundo uma distribuição normal, desde que se considere o logaritmo dos dados em vez dos valores originais, assim $\exp(\mu)$ corresponde ao instante em que $S(\exp(\mu)) = 0,5$, ou seja em $t = \exp(\mu)$ restam 50% da amostra inicial (GIOLO; COLOSIMO, 2006). A função de risco será:

$$\lambda(t) = \frac{f(t)}{S(t)} \quad (2.22)$$

Já o modelo de regressão da distribuição log-normal para t condicional a x é dado por:

$$S(t|x) = e\Phi\left(\frac{-\log(t)+\exp\{x'\beta\}}{\sigma}\right), \quad (2.23)$$

2.5.4 Seleção do modelo paramétrico

A forma mais simples e eficiente de selecionar o melhor modelo a ser usado para um conjunto de dados é por meio de técnicas gráficas. A primeira será pela comparação da estimativa Turnbull ($\hat{S}(t)$) com o modelo paramétrico escolhido ($S(t)$) em função do tempo. Se elas ficarem próximas, há indícios de que se tem um bom ajuste de $S(t)$ pelo modelo paramétrico escolhido. A segunda técnica gráfica é denominada Q-Q Plot, um gráfico que também compara

$\hat{S}(t)$ com $S(t)$, porém agora estimativa Turnbull ficará no eixo horizontal do plano cartesiano e a estimativa com o modelo paramétrico escolhido no eixo vertical, quanto mais próximos os pontos formados pelos pares ordenados $[\hat{S}(t), S(t)]$ ficarem da reta formada pelos pontos $[t, t]$, com $t = 0, 1, 2$, melhor será o ajuste do modelo paramétrico escolhido.

Entretanto, as conclusões a partir de técnicas gráficas podem diferir para diferentes analistas, e já que existe nas interpretações gráficas, um componente subjetivo. Para certificarmos que os indícios observados pelos métodos gráficos sejam verdadeiros, será utilizado o critério de informação de Akaike (AIC) para as distribuições de probabilidade. Para seleção dos modelos de regressão serão utilizados o teste de Wald e o teste de razão de verossimilhança, a partir de comparações entre os modelos (SILVA, 2016). Para avaliar a adequação do modelo ajustado e pontos atípicos os gráficos dos resíduos Deviance e Martingale serão analisados.

2.5.4.1 Critério de informação de AIC

O critério de informação de AIC, baseado na função de máxima verossimilhança é definido por:

$$AIC = -2\log(L_\theta) + 2p, \quad (2.24)$$

em que L_θ é a função de máxima verossimilhança do modelo e p é o número de variáveis explicativas consideradas no modelo (AKAIKE, 1987). Segundo esse critério, o melhor modelo probabilístico será aquele com o menor valor de AIC.

2.5.4.2 Teste de Wald

Para a seleção do modelo paramétrico de regressão, pode-se fazer comparações aos diferentes modelos de regressão, os testes utilizados serão o teste de Wald e o teste de razão de verossimilhança (SILVA, 2016).

O teste de Wald (WALD, 1943) é fundamentado em amostras grandes dos estimadores de máxima verossimilhança $\hat{\beta}$ que têm distribuição normal multivariada, e é definido por:

$$W = (\hat{\theta} - \theta_0)' t [-\kappa(\theta_0)] (\hat{\theta} - \theta_0), \quad (2.25)$$

em que $\kappa(\theta_0)$ é a matriz de derivadas segundas do logaritmo da função de verossimilhança. As hipóteses serão $H_0 : \theta = 0$ e $H_1 : \theta \neq 0$, com região crítica definida pelos valores superiores ao tabelado pelo quantil de 97,5% da distribuição normal padrão com um nível de significância de 5%, a hipótese nula H_0 será rejeitada, por se tratar de um teste bilateral, caso $|W|$ pertença a região crítica do teste com distribuição qui-quadrado com p graus de liberdade para amostras grandes.

2.5.4.3 Teste da razão de verossimilhança

O teste da razão de verossimilhança é baseado na estatística assintótica qui-quadrada com p graus de liberdade sob hipótese nula (SILVA, 2016). Definida pela diferença entre os logaritmos da função de verossimilhança:

$$TRV = -2 \log \left[\frac{L(\theta_0)}{L(\hat{\theta})} \right] \quad (2.26)$$

O teste da razão de verossimilhança faz uma comparação nos modelos aninhados, verificando-se, quando houver inclusão de uma ou mais covariáveis no modelo, a verossimilhança de um modelo aumenta significativamente, em relação ao modelo parcimonioso. A razão de verossimilhança é assintoticamente semelhante à estatística de Wald, quando o número de observações for grande (CARVALHO et al., 2011).

2.5.4.4 Teste logrank

A estatística do teste é obtida a partir da função escore:

$$S = U'(\theta_0) [-\kappa(\theta_0)]^{-1} U(\theta_0), \quad (2.27)$$

em que $U'(\theta_0) = \frac{d \log L(\theta)}{d\theta}$ e $H_0 : \theta = \theta_0$ é rejeitada se $S > \chi_p^2$ à 5% de significância (GIOLO; COLOSIMO, 2006).

2.5.4.5 Resíduos Martingale

Para verificar a necessidade de transformação das covariáveis e identificar observações que não são preditas adequadamente pelo modelo ajustado, são realizados os Resíduos Martingale. Esse método de avaliação do modelo de regressão é realizado pelo gráfico dos resíduos de Martingale no eixo vertical e no eixo horizontal cada uma das observações, em que o esperado para um modelo bem ajustado são pontos aleatoriamente distribuídos em torno de zero. Com os resíduos de Martingale definidos por:

$$\hat{m}_i = \delta_i - \hat{\Lambda}_0(t_i|x_i) \quad (2.28)$$

em que $\hat{\Lambda}_0$ é a função de taxa de falha acumulada obtida do modelo ajustado (FERREIRA, 2016).

2.5.4.6 Resíduos Deviance

Segundo Giolo e Colosimo (2006), para a detecção de pontos atípicos o gráfico é composto pelos resíduos de Deviance no eixo vertical e no eixo horizontal cada uma das observações, em que os pontos atípicos, se houver, serão aqueles de distância considerável de zero. Com os resíduos de Deviance definidos por:

$$\hat{d}_i = \sin(\hat{m}_i) \sqrt{[-2(\hat{m}_i + \delta_i \log(\delta_i - \hat{m}_i))]}, \quad (2.29)$$

2.6 Modelos semiparamétrico

Após o estudo de técnicas não paramétricas e paramétricas, será apresentado o modelo semiparamétrico, composto de uma parte paramétrica, que contém o vetor de parâmetros da regressão β associado às covariáveis, e $\lambda_0(t)$ que corresponde a parte não paramétrica (MARTINS, 2003).

2.6.1 Riscos proporcionais de Cox

Segundo Giolo e Colosimo (2006), para dados com tempos exatos, a comparação dos tempos de falha de dois grupos é dada, pela região entre a função de taxa de falha do primeiro

grupo, representada por $\lambda_0(t)$ e a do segundo grupo $\lambda_1(t)$. A suposição básica para o uso do modelo de regressão de Cox (1972) é, portanto, que as taxas de falha sejam proporcionais. Assim, assumindo proporcionalidade entre essas funções, tem-se que:

$$\frac{\lambda_0(t)}{\lambda_1(t)} = K, \quad (2.30)$$

em que K é a razão das taxas de falhas ou risco relativo, constante para todo tempo t de acompanhamento do estudo. Para todo x , I será a variável indicadora do grupo:

$$x = \begin{cases} I = 0 & \text{se grupo 0} \\ I = 1 & \text{se grupo 1} \end{cases}$$

$$K = \exp\{x'\beta\}$$

Assim podemos escrever a expressão geral do risco no modelo semiparamétrico como:

$$\lambda(t|x) = \lambda_0(t) * \exp\{x'\beta\} \quad (2.31)$$

ou seja,

$$\lambda(t|x) = \begin{cases} \lambda_1(t) = \lambda_0(t) * \exp\{x'\beta\}, & \text{se } x = 1 \\ \lambda_0(t), & \text{se } x = 0 \end{cases} \quad (2.32)$$

A expressão (2.32) define o modelo de Cox (1972) sendo $\lambda_0(t)$ comum a todos os indivíduos e $\exp\{x'\beta\}$ a influência, com efeito multiplicativo, que as covariáveis exercem sobre a função de risco (FERREIRA, 2016).

2.6.2 Método de máxima verossimilhança parcial

Proposta por Breslow (1972) e Peto (1972) o método de máxima verossimilhança parcial trata da razão entre o risco do indivíduo apresentar a falha em t_i e a soma dos riscos até a ocorrência da falha de todos os indivíduos. Considere que em uma amostra de n indivíduos, a função de verossimilhança parcial leva em conta $h \leq n$ falhas distintas nos tempos $t_1 < t_2 < \dots < t_h$ (SILVA, 2016).

$$\frac{\lambda(t|x_i)}{\sum_{h \in R(t_h)} \lambda(t|x_h)} = \frac{\lambda_0(t) \exp\{x_i' \beta\}}{\sum_{h \in R(t_h)} \lambda_0(t) \exp\{x_h' \beta\}} = \frac{\exp\{x_i' \beta\}}{\sum_{h \in R(t_h)} \exp\{x_h' \beta\}} \quad (2.32)$$

em que $R(t_h)$ é o conjunto dos índices das observações sob risco no tempo t_h . Observe que condicional a histórias de falhas e censuras até o tempo t_i , o componente não paramétrico $\lambda_0(t)$ desaparece.

A função de verossimilhança $L(\beta)$ a ser utilizada para se fazer inferência acerca dos parâmetros do modelo é então, formada pelo produtório de todos os termos representados anteriormente associados aos tempos distintos de falha, isto é:

$$L(\beta) = \prod_{i=1}^n \left(\frac{\exp\{x_i' \beta\}}{\sum_{j \in R(t_h)} \exp\{x_h' \beta\}} \right)^{\delta_i} \quad (2.34)$$

em que δ_i é o indicador de falha. Os valores de β que maximizam a função de verossimilhança parcial, $L(\beta)$, são obtidos resolvendo-se o sistema de equações definido por $U(\beta) = 0$, em que $U(\beta)$ é o vetor escore de derivadas de primeira ordem da função $l(\beta) = \log(L(\beta))$ (GIOLO; COLOSIMO, 2006).

2.7 Seleção do modelo semiparamétrico

Para seleção do modelo semiparamétrico, primeiro o modelo deve atender à pressuposição básica de proporcionalidade. Após isso, pode-se fazer comparações aos diferentes modelos de regressão de Cox, assim como na seleção do modelo paramétrico de regressão.

2.7.1 Resíduos de Schoenfeld

A violação da suposição básica, que é a de taxas de falha proporcionais, pode acarretar em sérios vícios na estimação dos coeficientes do modelo. Os Resíduos de Schoenfeld (1982) averiguam a proporcionalidade de cada covariável z_p , definidos para cada i -ésimo indivíduo como:

$$r_{pi} = \delta_i(z_{pi} - \Delta_{pi}), \quad (2.35)$$

em que δ_i corresponde a variável indicadora de falha, portanto, se a observação for censurada, o resíduo tem valor zero. E que Δ_{pi} é definido por:

$$\Delta_{pi} = \frac{\sum_{P \in R(t_h)} z_{pi} \exp\{x_i' \beta\}}{\sum_{P \in R(t_h)} \exp\{x_i' \beta\}}, \quad (2.36)$$

Para análise do gráfico dos resíduos de Schoenfeld versus o tempo de vida, verifica-se se os dados estão distribuídos igualmente, ao longo do tempo e dispostos numa nuvem de pontos aleatórios, centrados em zero, numa linha horizontal. Sendo assim, a suposição de riscos proporcionais permite um modelo adequado para os dados (SILVA, 2016). Há possíveis evidências de proporcionalidade quando houver inclinação zero, uma curva suavizada é adicionada com bandas de confiança, facilitando a identificação de possíveis falhas da suposição de riscos proporcionais (GIOLO; COLOSIMO, 2006).

2.8 Eventos recorrentes

A maioria das análises de sobrevivência são realizadas para modelar o tempo até o primeiro evento, porém, em muitos estudos, o evento de interesse pode ocorrer mais de uma vez em um indivíduo, esses eventos são denominados eventos recorrentes (AMORIM; CAI, 2015). Alguns exemplos de situações desse tipo surgem, por exemplo, nas ciências da saúde, onde se estudam repetidas internações hospitalares entre pessoas idosas (WESTBURY et al., 2016); nas ciências forenses, como no estudo da relação entre emprego e a reincidência criminal (TRI- PODI; KIM; BENDER, 2010); e nas ciências esportivas, em que se tem o interesse em avaliar as razões que levam a reincidência de lesões e a ausência resultante de jogos e treinamentos na elite do rugby (WILLIAMS et al., 2017). Assim, tem-se verificado um crescente empenho em desenvolver metodologia estatística capaz de dar resposta a esses cenários complexos (SOUSA-FERREIRA; ABREU; ROCHA, 2017).

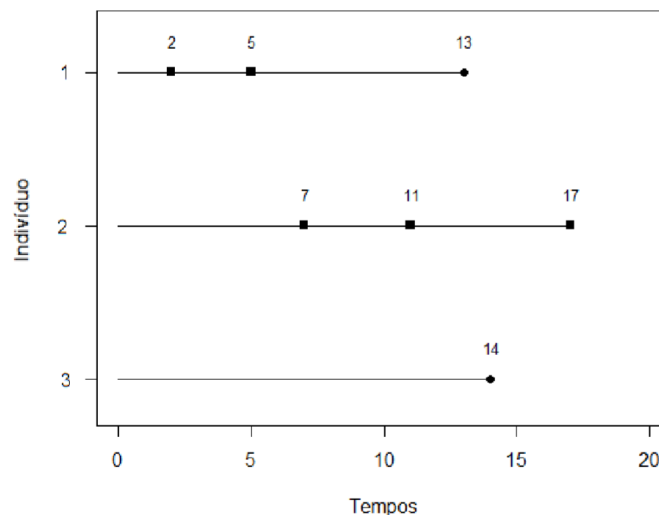
A diferença entre o modelo de Cox clássico e os modelos para eventos recorrentes está na definição do conjunto de indivíduos em risco. No modelo clássico, o indivíduo deixa de estar em risco quando os eventos ocorrem. Contudo, para eventos recorrentes, o indivíduo permanece em risco quando os eventos ocorrem (TOMAZELLA, 2003).

Muitas extensões de modelos de sobrevivência, baseadas na abordagem de riscos proporcionais de Cox, foram propostas para lidar com dados de eventos recorrentes (KELLY; LIM, 2000). Kelly e Lim (2000) propuseram uma maneira sistemática de caracterizar esses

modelos baseados em Cox, usando três estruturas principais: intervalos sob risco, risco basal e estratificação. Destacam-se sete modelos baseados em Cox para dados de eventos recorrentes: modelo AG de Andersen e Gill (1982); LWA de Lee et al. (1992); PWP-TT e PWP-GT de Prentice, Williams e Peterson (1981); WLW de Wei, Lin e Weissfeld (1989); GT-UR e TT-R de Kelly e Lim (2000).

Na Figura 2.5, apresenta-se um exemplo em que são estudados três indivíduos ($n = 3$) com presença de eventos recorrentes, tais como a ocorrência de infarto após tempo em meses do início do tratamento cardíaco. O indivíduo $i = 1$ teve ocorrência do evento de interesse nos tempos 2 e 5, e censura no tempo 13. O indivíduo $i = 2$ teve ocorrência de eventos nos tempos 7, 11 e 17. O indivíduo $i = 3$ não teve ocorrência de evento, apenas uma censura no tempo 14.

Figura 2.5 - Exemplo eventos recorrentes.



Legenda: Exemplo com três indivíduos em um estudo de análise de sobrevivência com eventos recorrentes. Os indivíduos 1 e 2 tiveram a ocorrência de três eventos e o indivíduo três somente um evento.

Fonte: Kelly e Lim (2000).

2.8.1 Intervalo sob risco

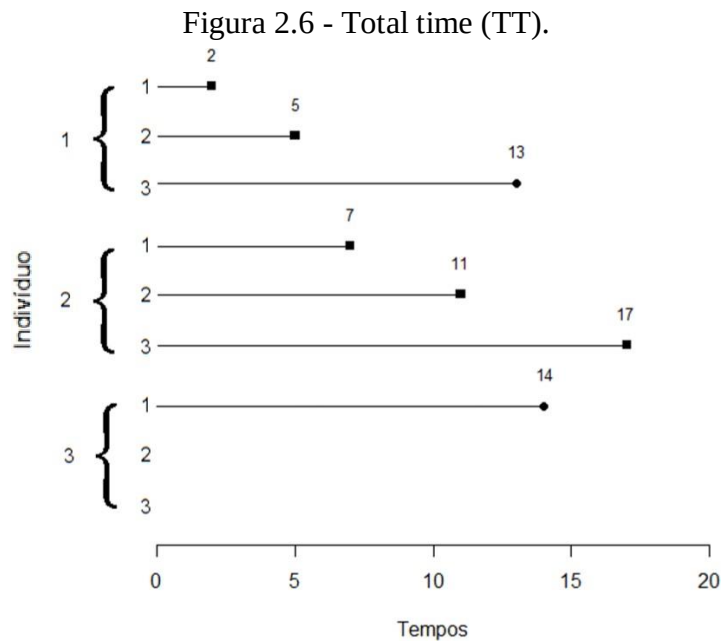
O intervalo sob risco corresponde aos limites de tempo, inicial (T_0) e final (T_F), nos quais a unidade experimental está em risco de que ocorra determinado evento. Há três métodos de registro usuais:

a) Total Time (TT)

O método de registro Total Time (TT) representa o intervalo sob risco de um evento independente dos outros eventos, pressupondo que não exista interação entre eles, o intervalo

de risco de um evento acontecerá a partir do início do estudo ($T_0 = 0$) até a ocorrência do evento ($T_F = t_k$), logo os intervalos de ocorrência acontecerão no intervalo $(0; t_k)$.

Na Figura 2.6, mostram-se os intervalos sob risco, considerando o método Total Time (TT) da situação apresentada na Figura 2.5. O primeiro indivíduo teve o primeiro evento no intervalo $(0;2)$, o segundo no intervalo $(0;5)$ e censura em $(0;13)$. O segundo indivíduo teve o primeiro evento no intervalo $(0;7)$, o segundo evento no intervalo $(0;11)$ e o terceiro evento no intervalo $(0;17)$. O terceiro indivíduo apenas censura no intervalo $(0;14)$.



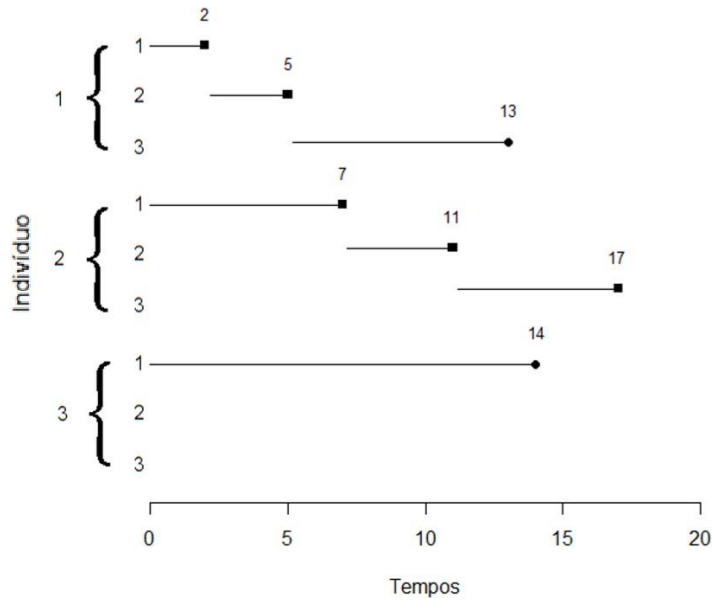
Legenda: Representação visual dos intervalos sob risco, para os indivíduos apresentados na Figura 2.5 pelo método Total Time.

Fonte: Kelly e Lim (2000).

b) *Counting Process* (CP)

O método de registro *Counting Process* (CP) representa o intervalo sob risco de um evento com dependência de eventos anteriores. O intervalo sob risco de um evento será registrado a partir da ocorrência do evento anterior ($T_0 = t_{k-1}$) até a ocorrência do evento propriamente dito ($T_F = t_k$), logo os intervalos serão registrados como $(t_{i-1}; t_i)$.

Na Figura 2.7, exibem-se os intervalos sob risco, considerando o método *Counting Process* (CP) referente à Figura 2.5. O primeiro indivíduo teve o primeiro evento no intervalo $(0;2)$, o segundo no intervalo $(2;5)$ e censura em $(5;13)$. O segundo indivíduo teve o primeiro evento no intervalo $(0;7)$, o segundo evento no intervalo $(7;11)$ e o terceiro evento no intervalo $(11;17)$. O terceiro indivíduo, uma censura no intervalo $(0;14]$.

Figura 2.7 - *Counting Process (CP)*.

Legenda: Representação visual dos intervalos sob risco para os indivíduos apresentados na Figura 2.5 pelo método Counting Process.

Fonte: Kelly e Lim (2000).

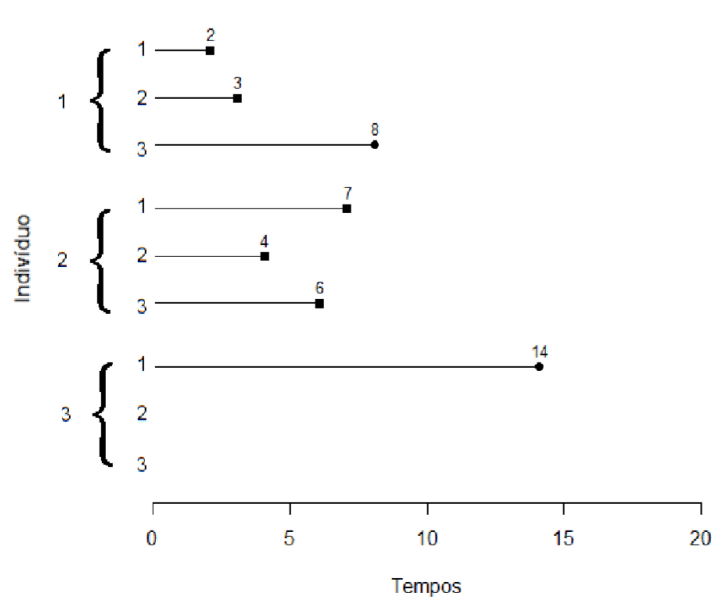
No processo de contagem, um indivíduo só pode contribuir para o risco basal apenas em um dado evento (KELLY; LIM, 2000).

c) Gap Time (GT)

O método de registro Gap Time (GT), assim como ocorre o CP, considera a dependência do evento k em relação a $k-1$, ou seja, o intervalo sob risco de um evento k apenas se inicia após a ocorrência do evento anterior $k-1$. É reiniciado, para cada novo evento, sendo assim, tem-se $T_0 = 0$ e para T_F tem-se a diferença de tempo entre o evento anterior e o atual ($T_F = t_k - t_{k-1}$), logo os intervalos de ocorrência acontecerão no intervalo $(0; t_k - t_{k-1})$.

Na Figura 2.8, apresentam-se os intervalos sob risco, para o método Gap Time (GT) referente à Figura 2.5. O primeiro indivíduo teve o primeiro evento no intervalo $(0; 2)$, o segundo no intervalo $(0; 3]$, pois ele ocorreu no tempo 5 e, considerando o tempo anterior em 2 a diferença corresponderá ao tempo final registrado nesse método. Da mesma forma, é registrada a censura em $(0; 8)$. De maneira análoga, tem-se que o segundo indivíduo teve o primeiro evento no intervalo $(0; 7)$, o segundo evento no intervalo $(0; 4)$ e o terceiro evento no intervalo $(0; 6)$. O terceiro indivíduo uma censura no intervalo $(0; 14)$.

Figura 2.8 - Gap Time (GT).



Legenda: Representação visual dos intervalos sob risco para os indivíduos apresentados na Figura 2.5 pelo método Gap Time.

Fonte: Kelly e Lim (2000).

2.8.2 Risco basal

A estrutura do modelo chamada risco basal é uma função não negativa, dependente do tempo que pode ser comum ou variável a todos os eventos (BELLERA et al., 2010). No modelo Cox clássico, ela é comum a todos os k eventos, no entanto, nas variações do modelo para o caso de eventos recorrentes, é possível realizar uma estratificação ou restrição que permite especificar um risco basal para cada estrato (evento) pré-determinado (FERREIRA, 2016) Para a definição do risco basal, utilizou-se a equação (2.32).

a) Risco basal comum: Risco basal $\lambda_{0k}(t)$ é igual para todo k .

b) Risco basal variável: Risco basal $\lambda_{0k}(t)$ é calculado para cada k .

2.8.3 Estratificação

Para inferir a respeito dos parâmetros, usou-se a equação (2.34) do método da máxima verossimilhança parcial cálculo.

2.8.3.1 Modelos não estratificados

Se o conjunto de risco for não estratificado, considera-se que todos os intervalos sob risco, de todas as unidades experimentais em estudo, podem estar incluídos no conjunto de risco de qualquer evento, seja qual for o número de eventos observados para cada unidade experimental (FERREIRA, 2016). Os três modelos não estratificados são denominados AG, LWA e GT-UR, com a seguinte Função de Verossimilhança:

$$L(\theta) = \prod_{i=1}^n \prod_{k=1}^K \left(\frac{e^{\{\beta x_{ik}\}}}{\sum_{j=1}^n \sum_{l=1}^K Y_{jl}(t_{ik}) e^{\{\beta x_{lk}\}}} \right)^{\delta_{ik}} \quad (2.37)$$

Em que Y_{ik} é o acompanhamento de cada indivíduo i em cada evento k como definido na Equação (2.1).

2.8.3.2 Modelos estratificados

Se o conjunto de risco for estratificado, considera-se que as contribuições para o conjunto de risco de ordem k , estão restritas à inclusão de informação proveniente dos k -ésimos intervalos de risco (KELLY; LIM, 2000). Os quatro modelos estratificados são PWP-GT, PWP-CP, WLW e TT-R com a seguinte Função de Verossimilhança:

$$L(\theta) = \prod_{i=1}^n \prod_{k=1}^K \left(\frac{e^{\{\beta x_{jk}\}}}{\sum_{j=1}^n Y_{jk}(t_{jk}) e^{\{\beta x_{jk}\}}} \right)^{\delta_{ik}} \quad (2.38)$$

2.8.4 Modelos

Os modelos para eventos recorrentes visam a estudar tempos que estão naturalmente agrupados. Considera-se que os eventos recorrentes são observados dentro de um mesmo grupo, podendo ser aplicado a duas situações: i) quando para cada indivíduo são observados vários eventos, sendo, então, cada indivíduo visto como um grupo; ou ii) quando os grupos são compostos por indivíduos que têm características semelhantes e para cada um deles observa-se um único evento (FERREIRA, 2016). E esses são classificados de acordo com os riscos basais, intervalos sob risco e estratificação, conforme a Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Equações dos modelos recorrentes e seus respectivos riscos basais, intervalos sob risco e estratificação.

Modelos	Estratificação	Verossimilhança parcial	Registro	Intervalo	Risco
AG	Não estratificado	$L(\beta) = \prod_{i=1}^n \prod_{k=1}^K \left[\frac{\exp\{\beta x_{ik}\}}{\sum_{j=1}^n \sum_{l=1}^K Y_{il}(t_{ik}) \exp\{\beta x_{jl}\}} \right]^{\delta_{ik}}$	CP	$(t_{k-1}; t_k)$	$\lambda_0(t)$
LWA			TT	$(0; t_k)$	$\lambda_0(t)$
GT-UR			GT	$(0; t_k - t_{k-1})$	$\lambda_{0k}(t)$
PWP-CP	Estratificado	$L(\beta) = \prod_{i=1}^n \prod_{k=1}^K \left[\frac{\exp\{\beta x_{ik}\}}{\sum_{j=1}^n Y_{jk}(t_{jk}) \exp\{\beta x_{jk}\}} \right]^{\delta_{ik}}$	CP	$(t_{k-1}; t_k)$	$\lambda_{0k}(t)$
PWP-GT			GT	$(0; t_k - t_{k-1})$	$\lambda_{0k}(t)$
TT-R			TT	$(0; t_k)$	$\lambda_{0k}(t)$

Fonte: Kelly e Lim (2000).

REFERÊNCIAS

- AKAIKE, H. Factor analysis and aic. In: _____. **Selected papers of Hirotugu Akaike**. New York: Springer, 1987. p. 371-386.
- AMORIM, L. D.; CAI, J. Modelling recurrent events: a tutorial for analysis in epidemiology. **International Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 324-333, 2015.
- ANDERSEN, P. K.; GILL, R. D. Cox's regression model for counting processes: a large sample study. **The Annals of Statistics**, Hayward, v. 10, n. 4, p. 1100-1120, Dec. 1982.
- BELLERA, C. A. et al. Variables with time-varying effects and the cox model: some statistical concepts illustrated with a prognostic factor study in breast cancer. **BMC Medical Research Methodology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2010.
- BRESLOW, N. Contribuição à discussão do artigo de dr cox. **Journal of the Royal Statistical Society**, Series B, London, v. 34, p. 216-217, 1972.
- CARVALHO, M. S. et al. **Análise de sobrevivência: teoria e aplicações em saúde**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 2011.
- COX, D. R. Regression models and life-tables: with discussions. **Journal of the Royal Statistical Society B: Statistical**, London, v. 34, p. 187-220, 1972.
- COX, D. R.; OAKES, D. **Analysis of survival data**. London: Chapman and Hall, 1984.
- DELEN, D.; WALKER, G.; KADAM, A. Predicting breast cancer survivability: a comparison of three data mining methods. **Artificial Intelligence in Medicine**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 113-127, June 2005.
- FERREIRA, I. M. S. **Modelos para acontecimentos múltiplos**. 2016. 134 p. Dissertação (Mestrado em Matemática)-Universidade da Madeira, Funchal, 2016.
- FU, W.; SIMONOFF, J. S. Unbiased regression trees for longitudinal and clustered data. **Computational Statistics & Data Analysis**, New York, v. 88, p. 53-74, 2015.
- GIOLO, S. R.; COLOSIMO, E. A. **Análise de sobrevivência aplicada**. São Paulo: E. Blucher, 2006.
- JESUS, F. T. de. **Sistema de calefação para ninhos de abelhas-sem-ferrão com controle e leitura de temperatura interna por sistema remoto**. 2017. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- KALBFLEISCH, J. D.; PRENTICE, R. L. **The statistical analysis of failure time data**. New York: J. Wiley, 2011.
- KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, London, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958.

- KELLY, P. J.; LIM, L. L. Y. Survival analysis for recurrent event data: an application to childhood infectious diseases. **Statistics in Medicine**, New York, v. 19, n. 1, p. 13-33, 2000.
- LAWLESS, J. F. **Statistical models and methods for lifetime data**. New York: Wiley, 1982.
- LEE, E. W. et al. Cox-type regression analysis for large numbers of small groups of correlated failure time observations. In: _____. **Survival analysis: state of the art**. Dordrecht: Springer, 1992. p. 237-247.
- MARTINS, M. S. **A previsão de insolvência pelo modelo de cox: uma contribuição para a análise de companhias abertas brasileiras**. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado em Administração)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- MONCHARMONT, F. X. D. et al. Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 22, n. 12, p. 3088-3094, 2003.
- PETO, R. Contribuição à discussão do artigo de dr cox. **Journal of the Real Statistics Society B**, London, v. 34, p. 205-207, 1972.
- PIRK, C. W. et al. Statistical guidelines for apis mellifera research. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 52, n. 4, p. 1-24, 2013.
- PRENTICE, R. L.; WILLIAMS, B. J.; PETERSON, A. V. On the regression analysis of multivariate failure time data. **Biometrika**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 373-379, 1981.
- RANSTAM, J.; COOK, J. Kaplan-meier curve. **British Journal of Surgery**, Guildford, v. 104, n. 4, p. 442-442, 2017.
- SCHOENFELD, D. Partial residuals for the proportional hazards regression model. **Biometrika**, Oxford, v. 69, n. 1, p. 239-241, 1982.
- SCHULA, S. Festigkeit von glas im bauwesen. In: _____. **Charakterisierung der Kratzanfälligkeit von Gläsern im Bauwesen**. Berlin: Springer, 2015. p. 109-127.
- SILVA, D. P. da. **Introdução ao modelo de cox com aplicação a dados de pneus 11.00 r22**. 2016. 40 p. Monografia (Graduação em Estatística)-Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- SOUSA-FERREIRA, I.; ABREU, A. M.; ROCHA, C. S. **Modelos de sobrevivência aplicados à análise de acontecimentos múltiplos**. Lisboa: Universidade de Lisboa, 2017.
- STRAPASSON, E. **Comparação de modelos com censura intervalar em análise de sobrevivência**. 2007. 135 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- TOMAZELLA, V. L. D. **Modelagem de dados de eventos recorrentes via processo de Poisson com termo de fragilidade**. 2003. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências da Computação e Matemática Computacional)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TRIPODI, S. J.; KIM, J. S.; BENDER, K. Is employment associated with reduced recidivism?: the complex relationship between employment and crime. **International Journal of Offender Therapy and Comparative Criminology**, Los Angeles, v. 54, n. 5, p. 706-720, 2010.

TURNBULL, B. W. The empirical distribution function with arbitrarily grouped, censored and truncated data. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, London, v. 38, n. 3, p. 290-295, 1976.

WALD, A. Tests of statistical hypotheses concerning several parameters when the number of observations is large. **Transactions of the American Mathematical Society**, Bethesda, v. 54, n. 3, p. 426-482, 1943.

WEI, L. J.; LIN, D. Y.; WEISSFELD, L. Regression analysis of multivariate incomplete failure time data by modeling marginal distributions. **Journal of the American Statistical Association**, London, v. 84, n. 408, p. 1065-1073, 1989.

WEIBULL, W. et al. A statistical distribution function of wide applicability. **Journal of Applied Mechanics**, Fairfield, v. 18, n. 3, p. 293-297, 1951.

WESTBURY, L. D. et al. Identification of risk factors for hospital admission using multiple-failure survival models: a toolkit for researchers. **BMC Medical Research Methodology**, London, v. 16, n. 1, p. 46, 2016.

WILLIAMS, S. et al. How much rugby is too much? a seven-season prospective cohort study of match exposure and injury risk in professional rugby union players. **Sports Medicine**, Auckland, v. 47, n. 11, p. 2395-2402, 2017.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - MODELOS DE SOBREVIVÊNCIA PARA A AVALIAÇÃO DE
DIFERENTES VIAS DE INTOXICAÇÃO DO REPELENTE NEEM EM ABELHAS**

Trigona spinipes

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo formatado conforme as normas da revista Ciência Agrícola.

MODELOS DE SOBREVIVÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE INTOXICAÇÃO POR REPELENTES A BASE DE NEEM EM *Trigona spinipes*

RESUMO: A abelha irapuá (*Trigona spinipes*) é uma espécie de abelha sem ferrão, polinizadora de várias espécies vegetais, mas que tem causado danos a algumas culturas, tais como: a flor copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica*). Isso porque, as abelhas, ao coletarem o pólen ou resinas nessa espécie, danificam suas inflorescências, deixando-as inviáveis para a comercialização. Para evitar esse dano, uma alternativa é aplicar um repelente natural que não ocasione mortalidade às abelhas, tanto pelo contato direto durante a aplicação do produto por pulverização quanto por ingestão ao coletar o pólen. Objetivou-se ajustar modelos para avaliação da sobrevivência de abelhas *T. spinipes*, submetidas a bioensaios de intoxicação utilizando diferentes produtos químicos, contendo o repelente natural Neem (*Azadirachta indica*). Foram distribuídas 400 abelhas em gaiolas com grupos de 10 abelhas cada, sendo considerado um delineamento inteiramente casualizado em ensaio fatorial 2x4, considerando duas vias de intoxicação, utilizando três produtos químicos como repelentes e uma testemunha, com cinco repetições cada. Para a construção das curvas de sobrevivência, foi avaliado o número de abelhas mortas a cada 12 horas, considerando como covariáveis a via de intoxicação e o produto químico repelente. Compararam-se os resultados por análise não paramétrica, utilizando-se estimador limite-produto modificado (Turnbull), pelo ajuste por modelo paramétrico de Weibull e pela técnica semiparamétrica de modelos proporcionais de Cox. O melhor ajuste foi obtido pelo modelo semiparamétrico, com valores bem próximos aos obtidos pela estimativa de Turnbull. Não se obteve diferença significativa entre os produtos químicos avaliados ao nível de 5% de significância. No entanto, conclui-se que a via de intoxicação das abelhas, ou seja, a forma de aplicação do repelente é o fator de maior significância, sendo aguda por contato a via de intoxicação que causa maior mortalidade. Assim, recomenda-se que o horário de aplicação do produto seja diferente do horário de forrageamento da *T. spinipes*.

Palavras-chave: Abelha sem ferrão, modelos de Cox, *Azadirachta indica*, meliponíneos, polinizadores, inseticida.

SURVIVAL MODELS TO EVALUATE THE INTOXICATION BY REPELLENTS IN *Trigona spinipes*

ABSTRACT: The Irapuá bee (*Trigona spinipes*) is a stingless bee that pollinates several plant species, but has caused damage to some crops such as Calla Lily (*Zantedeschia aethiopica*). It happens because while collecting the pollen, they damage the flowers inflorescence, making them unviable for commercialization. To avoid these damages, an alternative is to apply a natural repellent that does not cause mortality, neither while being sprayed nor by being ingested when the bees collect the pollen. The objective of this study was to adjust models to evaluate the survival of *T. Spinipes* bees, submitted to poisoning bioassays using different chemical products containing the natural Neem repellent (*Azadirachta indica*). Four hundred bees were divided into groups of 10 bees each, being considered a completely randomized design in a 2x4 factorial test, considering two routes of intoxication using three chemicals as repellents and one witness, with five replicates each. To construct the survival curves, it was studied the number of bees killed every 12 hours, and the variables considered were the route of intoxication and the chemical repellent used. The results by non-parametric analysis using modified limit-product estimator (Turnbull) were compared by setting Weibull parametric model and semi-parametric technique of Cox proportional models. The best result was obtained by the semi-parametric model, with values very close to those obtained by Turnbull's estimation. There was no significant difference between the evaluated chemicals at the 5% level of significance. However, it is concluded that the bee's route of intoxication is the form in which the repellent is applied, causing mortality by contact. Thus, the application of the repellent should be different from the *T. Spinipes* foraging schedule.

Key words: Stingless bee, Cox models, *Azadirachta indica*, *meliponines*, pollinators, insecticide.

INTRODUÇÃO

Abelhas *Trigona spinipes* são insetos sociais de colônias perenes, com centenas a milhares de operárias. A abelha adulta apresenta coloração preta, mandíbulas desenvolvidas, asas transparentes, com ferrão atrofiado, portanto são chamadas de abelhas sem ferrão. Medem cerca de 5 à 7,5 mm de comprimento e enrolam-se nos cabelos das pessoas quando são perturbadas, sendo conhecidas também como abelhas cachorro ou irapuás (ZUCCHI; SILVEIRA NETO; NAKANO, 1993).

É descrita como agente polinizador de diversas culturas, podendo ser utilizada inclusive como agente polinizador comercial (SANCHES et al., 2001). No entanto, são consideradas pragas de outras culturas, principalmente frutíferas (COELHO et al., 2008) e também de ornamentais como rosas, crisântemos, camélias e copo de leite, provocando abertura das pétalas e danos nos botões florais. Na flor copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica*), a abelha irapuá, ao coletar o pólen danifica a inflorescência da flor deixando-a inviável para a comercialização (CARVALHO; BUENO; ALMEIDA, 2009). Moura et al. (2017) observaram também a *T. spinipes*, predando a parte apical do caule jovem de *Khaya ivorensis* (Mogno africano), causando atrofia e brotação, provocando ramificações que irão depreciar o fuste se não manejado. Muitos são os trabalhos encontrados relatando os prejuízos causados por abelhas *T. spinipes* em diversas culturas, tais como: banana, uva, manga, citrus (AGROFIT, 2019) e maracujazeiro amarelo (BOIÇA JUNIOR; SANTOS; PASSILONGO, 2014), porém poucas são as estratégias de controle.

Chiaradia et al. (2003) relatam como estratégia, pulverizar as plantas atacadas com substâncias que possuem cheiros fortes e desagradáveis, como a creolina. Porém, não há eficácia comprovada, cientificamente relatada, acerca dessas práticas bem como não é possível qualificar ou quantificar os danos causados às colônias. Outros autores ainda sugerem o controle cultural realizado pela destruição dos ninhos (BRASIL, 2005).

É importante ressaltar que não existe um produto de controle químico registrado, no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT, 2019), especificamente para a *T. spinipes* na cultura de copo-de-leite, sendo indicado no sistema apenas o uso de inseticidas no geral. Entretanto, deve-se ressaltar que cerca de 60% dos inseticidas comercializados no Brasil apresentam toxicidade para abelhas (PINHEIRO; FREITAS, 2010).

As abelhas podem ser afetadas por inseticidas, por meio das duas principais vias de intoxicação: pulverização (toxicidade aguda por contato) ou ingestão (toxicidade oral crônica) e, seus efeitos variam conforme as concentrações e as doses utilizadas, modo de intoxicação e tempo de exposição ao inseticida (ROSSI et al., 2013).

Para a produção de defensivos agrícolas, os óleos essenciais ocupam um lugar de destaque, uma vez que apresentam propriedades fungicidas e inseticidas contra pragas que causam prejuízos aos agricultores, acarretando perdas na produtividade e qualidade das culturas (SIMÕES et al., 2004). Dentre os óleos essenciais, o produzido a partir da planta Neem (*Azadirachta indica*) tem grande destaque.

O Neem (Nim) é uma planta que pertence à família do mogno e do cedro. São árvores de grande porte, podendo atingir até 30m de altura e 2,5m de diâmetro. Além de fornecer madeira, é muito conhecida por suas propriedades medicinais e terapêuticas encontradas nas sementes, folhas e casca. É bastante utilizada na agricultura, no combate a lagartas e pragas como nematoides, fungos e bactérias. É uma das plantas de maior potencial no controle de pragas, atuando sobre 95% dos insetos nocivos (PREVIERO et al., 2010).

O óleo de Neem possui propriedades fungicidas e bactericidas, além de ser um óleo que é facilmente disponível para seu uso como uma erva medicinal de baixo custo (SANTOS et al., 2017). É relatado seu uso em alguns estudos com polinizadores, a maior parte deles citando a abelha *Apis mellifera* e negligenciando outras espécies importantes de polinizadores (BARBOSA et al., 2015). Boeke et al. (2004) e Nisbet (2000) avaliaram a segurança do uso de pesticidas derivados de Neem como inseticida, incentivando sua aplicação. O óleo de Neem, aplicado topicamente, ofereceu proteção significativa das abelhas contra a infestação por *Acarapis woodi*, embora não tenha resultado em mortalidade direta do ácaro (MELATHOPOULOS et al., 2000). Finalmente, é importante ressaltar que o *A. indica* ainda não é registrado no Brasil para uso agrícola (FREITAS; PINHEIRO, 2012).

Ao realizar experimentos com abelhas em laboratórios, as características de interesse são analisadas em grupos de abelhas confinadas em gaiolas e, normalmente, avalia-se a mortalidade em intervalos de tempo pré-determinados (PIRK et al., 2013). Isso ocorre, por se tratar de insetos que vivem em sociedade e, para evitar alterações fisiológicas e comportamentais devem ser mantidos sempre em grupo. Já que os dados são coletados em intervalos de tempo, não se conhece o tempo exato de ocorrência da característica de interesse, nesse caso, a morte do inseto. Assim, tem-se uma informação incompleta denominada de dado “censurado” e, por isso, faz-se necessária a utilização de técnicas estatísticas de análise de sobrevivência.

Os modelos de sobrevivência podem ser estimados de forma não paramétrica seguindo, por exemplo, o estimador limite-produto modificado de Turnbull, paramétrica, realizando o ajuste por modelos como Weibull ou log-normal ou, ainda, semiparamétricos como os modelos de risco proporcionais de Cox, tal como utilizado por Moncharmont et al. (2003).

Diante do exposto, objetivou-se ajustar modelos para avaliação da sobrevivência de abelhas *T. spinipes*, submetidas a formas de aplicação do repelente natural Neem (*Azadirachta indica*).

MATERIAL E MÉTODOS

Os adultos de abelhas irapuá foram obtidos diretamente da colônia localizada em condições naturais no Campus Tancredo de Almeida Neves da Universidade Federal de São João del-Rei, MG (UFSJ). Para realizar a captura dos indivíduos, foi projetado um coletor de abelhas feito com cano de PVC com uma das extremidades fechadas com duas camadas de tecido organza, visando a evitar fuga por cortes provocados por suas mandíbulas. O coletor foi posicionado na entrada da colônia e à medida que iam saindo para forrageamento ou defesa do ninho, ficaram presas no coletor. Assim que uma quantidade adequada de abelhas foi capturada, procedeu-se o fechamento com um tampão, repetindo-se o processo, se necessário.

Posteriormente, foram transportadas para o Laboratório de Práticas Apícolas do Departamento de Zootecnia. Para montagem das unidades experimentais, foram utilizadas gaiolas de PVC cilíndricas com 10 cm de diâmetro por 5 cm de altura, revestidas com tecido duplo de organza para a contagem dos insetos. As abelhas foram anestesiadas por abaixamento de temperatura e separadas em grupos de 10 indivíduos, para cada unidade experimental e mantidas em câmara climatizada a $30 \pm 2^\circ \text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

O estudo de toxicidade realizou-se em dois bioensaios em abelhas adultas de *T. spinipes*: aguda por contato e oral crônica, utilizando três diferentes produtos químicos repelentes, contendo Neem Fertbom[®], I Go[®] e o extrato pirolenhoso Biopiro1[®], além do tratamento testemunha apenas com a solução aquosa de sacarose, totalizando oito tratamentos, sendo utilizadas cinco repetições de cada.

Para o bioensaio de toxicidade oral crônica, foi preparada uma solução aquosa à 50% de sacarose PA, após o preparo foi feita a contaminação do alimento com a dosagem de 5mL/L do repelente, conforme recomendação dos fabricantes. Estas foram colocadas no interior das gaiolas em uma tampa plástica de três centímetros de diâmetro por 1,5 cm de altura, contendo um chumaço de algodão para evitar afogamento. Todos os tratamentos receberam água *ad libitum* em tampa plástica de mesma característica.

Para o bioensaio de toxicidade aguda por contato foram utilizados pulverizadores manuais para a aplicação dos inseticidas naturais. A taxa de aplicação média por pulverizador foi de $8,4 \times 10^{-4} \text{ mL/cm}^2$. Em cada repetição, foram realizadas dez borrifadas, a uma distância de $\pm 25 \text{ cm}$ do alvo (CARVALHO; BUENO; ALMEIDA, 2009). Os insetos foram alimentados

com solução aquosa à 50% de sacarose PA e água em recipientes semelhantes ao bioensaio de toxicidade oral.

Avaliou-se o número de abelhas mortas a cada 12 horas, sendo esta a variável resposta, ou seja, o tempo t_i até a ocorrência da morte da abelha, gerando dados com censura intervalar. O experimento teve duração de 20 dias (480 horas), após isso, o tempo de mortalidade foi considerado como censurado. Não foi avaliado o consumo nos bioensaios.

Para a análise de sobrevivência, utilizou-se inicialmente o estimador limite-produto, também denominado estimador não paramétrico de Kaplan-Meier (KM), definido como:

$$S(t) = \prod_{j: t_j < t} \left(\frac{n_j - d_j}{n_j} \right) = \prod_{i: t_i < t} \left(1 - \frac{d_i}{n_i} \right) \quad (1)$$

em que $t_1 < t_2 < \dots < t_k$, são os k tempos distintos e ordenados de morte, d_i o número de mortes em t_i , $i = 1, \dots, k$; e n_i o número de abelhas que não morreram e não foram censuradas até o instante imediatamente anterior a t_i . Dados que as respostas do tempo de vida são obtidas em sua totalidade com censura intervalar, ocorreram com frequência os empates, ou seja, número de mortes considerando o mesmo tempo de ocorrência. Na ocorrência de empates, Giolo e Colosimo (2006), sugerem a utilização do estimador de Turnbull que é uma adaptação do método KM e corresponde a um processo iterativo que considera uma ponderação de cada ocorrência de mortalidade nos intervalos no instante t_i em relação ao t_{i-1} .

Para a modelagem paramétrica foi inicialmente selecionada a melhor distribuição a ser ajustada ao tempo de vida considerando as distribuições exponencial, Weibull e log-normal e posteriormente considerado o ajuste do modelo de regressão, incluindo as covariáveis. No caso do modelo Weibull, sabe-se que, para a variável Tempo (t) condicional ao vetor de covariáveis x , a função de sobrevivência correspondente é $S(t|x) = \exp \left\{ - \left(\frac{t}{\exp\{x'\beta\}} \right)^\delta \right\}$ em que x' é a matriz de covariáveis; δ o parâmetro de forma da distribuição e β corresponde ao vetor de parâmetros associado às covariáveis estimados pelo método da máxima verossimilhança. Salienta-se que se $\delta = 1$ a modelagem paramétrica passa a ser a distribuição exponencial (ARCHER et al., 2014).

O uso de um modelo paramétrico pode gerar resultados viesados ou inconsistentes. Assim, para comparação, considerou-se ainda o modelo semiparamétrico de riscos proporcionais de Cox que propõe a modelagem, na presença de covariáveis, por meio da função de risco dada por $\lambda(t|x) = \lambda_0(t) \exp\{x'\beta\}$ (MAIA; EDUARDO, 2016). Sua vantagem é

modelar e testar hipóteses independentes da forma da distribuição do tempo de sobrevivência e o método de estimação de parâmetros é baseado na verossimilhança parcial (LIN, 1994). As análises foram adaptadas para a utilização do pacote *icenReg* do software R (R TEAM, 2019).

Consideraram-se como covariáveis a via de intoxicação x_1 , sendo $x_1 = 0$ para oral crônica e $x_1 = 1$ quando a intoxicação ocorreu por contato, e o produto químico do repelente como covariável x_2 . Para o produto químico do repelente, consideraram-se quatro categorias: $x_2 = 0$ para testemunha, na ausência de repelente, $x_2 = 1$ para o produto químico Fertbom®, $x_2 = 2$ para I Go®, e $x_2 = 3$ para Biopiro1®.

Para selecionar o melhor modelo, foram utilizadas técnicas gráficas, seja pela comparação da estimativa Turnbull com os modelos paramétricos ou, pelo Q-Q Plot (GIOLO; COLOSIMO, 2006). Para evitar componente subjetivo na interpretação gráfica, foi utilizado também o critério de informação de AIC dado por $AIC = -2 \log(L_q) + 2p$ em que L_q é a função de máxima verossimilhança do modelo e p é o número de covariáveis.

Ressalta-se que os dados de sobrevivência das abelhas não podem ser estudados por meio de técnicas de regressão múltipla, em razão da distribuição não normal dos tempos de sobrevivência, presença de censura, e as covariáveis dependentes do tempo. No entanto, se considerarmos apenas um tempo fixo, ou seja, uma resposta univariada, como realizado tradicionalmente na área experimental, poderia ser considerado um delineamento inteiramente casualizado em ensaio fatorial 2x4 (2 vias de intoxicação e 3 produtos químicos e testemunha). Mas, neste caso, a informação da variação temporal da mortalidade seria perdida. Para fins de comparação, essa situação foi analisada determinando-se o tempo fixo para a obtenção da taxa de mortalidade igual 48h e 96h, conforme recomendações para testes de toxicidade em abelhas (MEDRZYCKI et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A intoxicação aguda por contato, ocasionou maior mortalidade até 288 horas, a partir da qual restavam menos de 10% de abelhas no experimento. É evidenciada a maior diferença dos métodos de intoxicação nas primeiras 48 horas, quando o método por contato se mostra mais agressivo (Tabela 1).

Nos tempos 24, 36 e 48 horas as diferenças entre os métodos de intoxicação são as mais altas, sendo de 26,4%, 24,9%, e 23,0%, respectivamente. Até as 276 h de observação, a mortalidade de abelhas submetidas à intoxicação por contato, teve diferença da intoxicação da oral variando entre 8% e 18%. Após esse período, os dois métodos tornaram-se praticamente

semelhantes, restando aproximadamente, apenas 10% dos indivíduos. Xavier et al. (2015) concluíram que a intoxicação oral do repelente causa menor dano às abelhas *Trigona spinipes* do que quando o mesmo é administrado, via contato, principalmente nas primeiras 72 horas.

Considerando as curvas de sobrevivência com a covariável produto químico do repelente nas diferentes vias de intoxicação, percebe-se que a variação de mortalidade inicial entre os diferentes produtos químicos e a testemunha é reduzida, sendo mais acentuada apenas após 180 horas de experimento. Entre as duas vias de intoxicação não há também diferença de comportamento entre os produtos químicos (Figura 1a e 1b).

Para ajuste paramétrico dos erros, fez-se necessário, avaliar inicialmente a melhor distribuição. Para tal, testou-se, por meio de comparação com o ajuste paramétrico, as distribuições exponencial, Weibull e log-normal, obtendo-se as estimativas apresentadas na Tabela 2 e seus respectivos valores de AIC. Entre os modelos candidatos, o que apresentou menor valor de AIC foi o de Weibull. O mesmo resultado pode ser obtido, ao avaliar os gráficos ajustados comparados com o ajuste não paramétrico de Turnbull (Figura 2). Quanto ao ajuste obtido pela distribuição de Weibull, este é o que mais se aproxima da estimativa de Turnbull. Por meio do Q-Q Plot o que mais se aproxima de reta $x = y$ é também referente à distribuição de Weibull (Figura 3). Tal resultado está de acordo com o obtido por Brighenti, Brighenti e Carvalho (2017), ao trabalhar dietas para abelhas *Apis mellifera*. Assim, para a modelagem, considerando as covariáveis, utilizou-se o modelo de regressão de Weibull.

Pela análise do parâmetro α verifica-se que em $t_i = 140,1$ a mortalidade atinge 63,21%, ou seja, $S(140,1) = 36,79\%$. Nota-se, na Figura 2, que o ajuste fica muito próximo das estimativas de Turnbull, porém, não tão satisfatórios entre $t_i = 72$ e $t_i = 132$. Um modelo semiparamétrico foi ajustado para obter resultado melhor que o ajuste paramétrico, principalmente no intervalo mencionado anteriormente. O modelo semiparamétrico ajustado foi igual a $S(t) = [S_0(t)]^{exp\{0,3154\}}$. A curva de sobrevivência semiparamétrica, ajustada sem considerar as covariáveis, pelo modelo de regressão discreto tem maior proximidade com a estimativa de Turnbull (Figura 4).

Considerando as covariáveis x_1 , referentes à via de intoxicação, e x_2 , os produtos químicos do repelente, no modelo de regressão Weibull, obtiveram-se os resultados das estimativas dos parâmetros apresentados na Tabela 3, para os modelos, considerando as covariáveis e interação, conforme a Tabela 4.

Considerando os valores-p de log-verossimilhança, o modelo 2, com a inclusão da covariável via de intoxicação (x_1), é o único na qual há evidência estatísticas à 5% de significância, em que os parâmetros de forma (γ) e escala (α) estimados são respectivamente

1,142 e 150,2. A vantagem do modelo paramétrico reside no fato de permitir a interpretação dos coeficientes. Assim, o valor positivo obtido para o parâmetro $\beta_1 = 1,366$, implica que as abelhas submetidas a intoxicação via oral ($x_1=0$) apresentam probabilidade de sobrevivência maior do que as submetidas à intoxicação por contato ($x_1=1$), o que pode ser observado claramente nas curvas de sobrevivência estimadas (Figura 5). É possível também notar um distanciamento entre as vias de intoxicação logo nas primeiras horas e, após, aproximadamente 140 horas de experimento. O mesmo não ocorre no tempo intermediário e, por isso, realizou-se também o ajuste semiparamétrico, considerando também apenas a covariável x_1 , na qual ajustou-se o modelo: $S(t) = [S_0(t)]^{\exp\{0,21653 * x_1\}}$, que corresponde a curva de sobrevivência apresentada na Figura 6. A avaliação da toxicidade, em longo prazo, para abelhas de exposição crônica a pesticidas por meio de um modelo de risco proporcional revelou que a análise não deve negligenciar a variação temporal da mortalidade.

Se fosse considerada a análise de variância tradicional, o resultado, após 48 horas, indicaria diferença entre as vias de intoxicação ($p=0,0013$), mas não entre os repelentes ($p=0,5882$), e nem interação entre os fatores considerados ($p=0,4564$). Já para o tempo fixo de 96 horas não haveria significância em nenhum dos fatores ($p>0,05$). Isso evidencia a perda de informação nesse tipo de análise.

A toxicidade oral crônica do repelente causa menor dano às abelhas irapuá do que o seu contato, sendo que o melhor ajuste foi obtido pelo modelo semiparamétrico de Cox, com valores bem próximos aos obtidos pela estimativa de Turnbull.

Assim, independente dos produtos químicos dos repelentes administrados via contato, existe um efeito significativo na sobrevivência da abelha irapuá *T. spinipes* e recomenda-se que o horário de aplicação do produto seja diferente do horário de forrageamento da *T. spinipes*, segundo Macieira e Proni (2004) entre 10 e 15 horas. Isso possibilita traçar estratégias com esses repelentes no controle desse inseto nas culturas de interesse comercial. O teste de Log-rank (valor $t=8,73$) detectou diferença significativa ($p=0,003124$), em nível de significância $\alpha = 0,05$ entre as curvas semiparamétricas referentes à intoxicação via oral e por contato.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao CNPq e Fapemig, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 jul. 2019.
- ARCHER, C. R. et al. Nutrition affects survival in African honeybees exposed to interacting stressors. **Functional Ecology**, Oxford, v. 28, p. 913-923, 2014.
- BARBOSA, W. F. et al. Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera:Apidae). **Ecotoxicology**, New York, v. 24, n. 1, p. 130-142, 2015.
- BOEKE, S. J. et al. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, n. 1, p. 25-41, 2004.
- BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SANTOS, T. M.; PASSILONGO, J. *Trigona spinipes* (Fabr.) (Hymenoptera: Apidae) em espécies de maracujazeiro: flutuação populacional, horário de visitação e danos às flores. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 135-139, mar./abr. 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 258, de 10 de dezembro de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 nov. 2005. Seção 1, p. 4. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/858452/pg-4-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-14-11-2005>>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- BRIGHENTI, D. M.; BRIGHENTI, C. R. G.; CARVALHO, C. F. Life spans of Africanized honey bees fed sucrose diets enhanced with citric acid or lemon juice. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 56, n. 2, p. 91-99, 2017.
- CARVALHO, L. M.; BUENO, V. H. P.; ALMEIDA, E. F. A. Pragas do copo-de-leite: identificação e danos. **Revista Plasticultura**, Campinas, v. 4, n. 17, p. 26-28, 2009.
- CHIARADIA, L. A. et al. Dano e controle da abelha-'irapuá' em eucalipto. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 16, n. 1, p. 60-62, 2003.
- COELHO, L. R. et al. Controle de pragas do pessegueiro através do ensacamento dos frutos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 1743-1747, 2008.
- FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. **Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros**. Brasília, DF: MMA, 2012. 112 p.
- GIOLO, S. R.; COLOSIMO, E. A. **Análise de sobrevivência aplicada**. São Paulo: E. Blucher, 2006. 392 p.
- LIN, D. Y. Cox regression analysis of multivariate failure time data: the marginal approach. **Statistics in Medicine**, New York, v. 13, n. 21, p. 2233-2247, 1994.
- MACIEIRA, O. J. D.; PRONI, E. A. Capacidade de resistência a altas e baixas temperaturas em operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille)(Hymenoptera, Apidae) durante os períodos

de verão e inverno. **Revista Brasileira de Zoologia**, Viçosa, MG, v. 21, n. 4, p. 893-896, 2004.

MAIA, M. A.; EDUARDO, Y. N. Análise do tempo até a re-hospitalização de pacientes com esquizofrenia via modelo de riscos proporcionais de Cox. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 51-58, 2016.

MEDRZYCKI, P. et al. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 52, n. 4, p. 1-60, 2013.

MELATHOPOULOS, A. P. et al. Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera: Apidae), their mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascophaera apis*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, n. 2, p. 199-209, 2000.

MONCHARMONT, F. X. D. et al. Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 22, n. 12, p. 3088-3094, 2003.

MOURA, R. et al. Dano em *Khaya ivorensis* provocado por *Trigona spinipes* na savana brasileira. **Acta Brasiliensis**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 40-42, 2017.

NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 4, p. 615-632, 2000.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 266-281, 2010.

PIRK, C. W. et al. Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 52, n. 4, p. 1-24, 2013.

PREVIERO, C. A. et al. **Receita de plantas com propriedades inseticidas no controle de pragas**. Palmas: CEULP/ULBRA, 2010. 31 p.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<https://www.r-project.org>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

ROSSI, C. A. et al. Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 76, p. 552-558, 2013.

SANCHES, A. L. et al. Use of stingless bees for commercial pollination in enclosures: a promise for the future. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 561, p. 219-223, 2001.

SANTOS, E. P. et al. Atuação carrapaticida do neem e manejo consorciado de pastagem no controle do carrapato: revisão sistemática de literatura. **Caderno de Ciências Agrárias**, Teresina, v. 9, n. 2, p. 79-91, 2017.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2004.

XAVIER, V. M. et al. Acute toxicity and sublethal effects of botanical insecticides to honey bees. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 15, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jinsectscience/article/15/1/137/2583443>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. Piracicaba: FEALQ, 1993.

Tabela 1. Sobrevivência ($S(t)$) de abelhas *Trigona spinipes* em função de diferentes vias de intoxicação do repelente Neem ($x_1=0$ intoxicação via oral e $x_1=1$ intoxicação via contato) e suas diferenças d_i em função do tempo t_i . Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.

t_i	$S(t_i x_1)$		d_i	t_i	$S(t_i x_1)$		d_i
	$x_1=0$	$x_1=1$			$x_1=0$	$x_1=1$	
0	1,000	1,000	0,000	228	0,263	0,113	0,149
12	0,975	0,820	0,155	240	0,242	0,098	0,144
24	0,939	0,675	0,264	252	0,222	0,093	0,129
36	0,904	0,655	0,249	264	0,187	0,077	0,110
48	0,854	0,624	0,230	276	0,157	0,072	0,084
60	0,753	0,577	0,176	288	0,101	0,062	0,039
72	0,722	0,557	0,165	300	0,066	0,052	0,014
84	0,682	0,536	0,146	312	0,056	0,046	0,010
96	0,621	0,469	0,152	324	0,051	0,046	0,005
108	0,596	0,459	0,137	336	0,035	0,036	-0,001
120	0,545	0,428	0,118	372	0,035	0,036	-0,001
132	0,485	0,351	0,134	384	0,030	0,036	-0,006
144	0,414	0,268	0,146	396	0,025	0,036	-0,011
156	0,394	0,247	0,147	408	0,025	0,026	-0,001
168	0,374	0,222	0,152	420	0,015	0,021	-0,005
180	0,354	0,196	0,158	432	0,010	0,021	-0,011
192	0,278	0,165	0,113	444	0,010	0,015	-0,005
204	0,273	0,129	0,144	456	0,010	0,010	0,000
216	0,263	0,119	0,144	480	0,010	0,010	0,000

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 2. Estimativas dos modelos paramétricos para sobrevivência de abelhas *Trigona spinipes*. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.

Distribuição	S(t)	Parâmetros estimados		AIC
Exponencial	$S(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)\right\}$	$\alpha = 134,3$		2670
Weibull	$S(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\gamma\right\}$	$\alpha = 140,1$	$\gamma = 1,141$	2678
Log-normal	$S(t) = \phi\left(\frac{-\log(t)+\mu}{\sigma}\right)^2$	$\mu = 4,460$	$\sigma = 1,089$	2761

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 3. Estimativas obtidas para o modelo de regressão paramétrico de sobrevivência (S(t)) de abelhas *Trigona spinipes*. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.

Modelo	Covariáveis	Estimativa	Erro padrão	Wald	p-valor
1	Nenhuma	-	-	-	-
2	$\mathbf{x}_1 = 1$	$\beta_1 = 1,36600$	0,1011	3,268	0,00108
	$\mathbf{x}_2 = 1$	$\beta_1 = 0,30660$	0,1431	2,143	0,03213
3	$\mathbf{x}_2 = 2$	$\beta_2 = 0,07501$	0,1423	0,527	0,59810
	$\mathbf{x}_2 = 3$	$\beta_3 = -0,29050$	0,1442	-2,015	0,04393
	$\mathbf{x}_1 = 1$	$\beta_1 = 0,31920$	0,1024	3,119	0,00182
4	$\mathbf{x}_2 = 1$	$\beta_2 = 0,32100$	0,1433	2,240	0,02511
	$\mathbf{x}_2 = 2$	$\beta_3 = 0,03288$	0,1429	0,230	0,81800
	$\mathbf{x}_2 = 3$	$\beta_4 = -0,26910$	0,1444	-1,864	0,06232
	$\mathbf{x}_1 = 1$	$\beta_1 = 0,34800$	0,1999	1,741	0,08173
	$\mathbf{x}_2 = 1$	$\beta_2 = 0,24250$	0,2001	1,212	0,22540
	$\mathbf{x}_2 = 2$	$\beta_3 = 0,33990$	0,2002	1,698	0,08948
5	$\mathbf{x}_2 = 3$	$\beta_4 = -0,39040$	0,2015	-1,938	0,05261
	$\mathbf{x}_1 = 1 * \mathbf{x}_2 = 1$	$\beta_5 = 0,17930$	0,2822	0,635	0,52530
	$\mathbf{x}_1 = 1 * \mathbf{x}_2 = 2$	$\beta_6 = -0,54930$	0,2834	-1,938	0,05263
	$\mathbf{x}_1 = 1 * \mathbf{x}_2 = 3$	$\beta_7 = 0,2658$	0,2864	0,928	0,35350

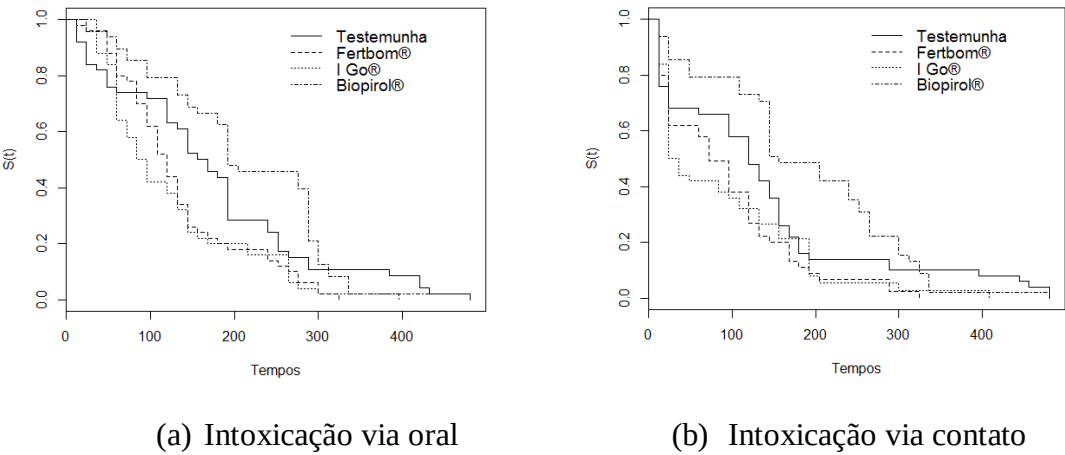
Fonte: Do autor (2019).

Tabela 4. Modelos de regressão semiparamétrico de sobrevivência (S(t)) de abelhas *Trigona spinipes*. Temperatura de 30 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.

Modelo	$\hat{S}(t)$
1	$exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\gamma}\right\}$
2	$exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha + \beta_1 * x_1}\right)^{\gamma}\right\}$
3	$exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha + \beta_2 * x_2}\right)^{\gamma}\right\}$
4	$exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha + \beta_1 * x_1 + \beta_2 * x_2}\right)^{\gamma}\right\}$
5	$exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha + \beta_1 * x_1 + \beta_2 * x_2 + (\beta_1 * x_1)(\beta_2 * x_2)}\right)^{\gamma}\right\}$

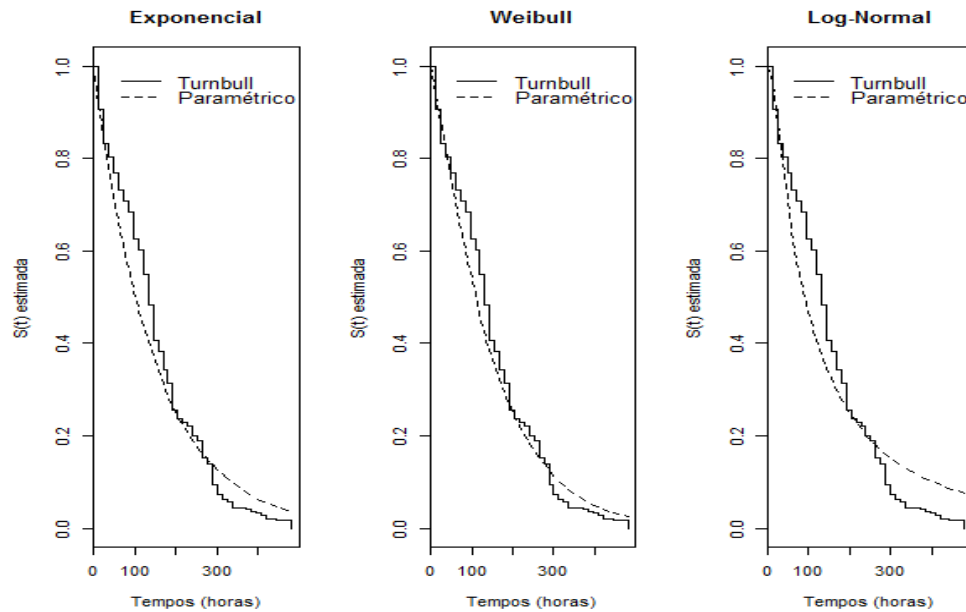
Fonte: Do autor (2019).

Figura 1. Curva se Sobrevivência (S(t)) de abelhas *Trigona spinipes* em função dos produtos químicos de diferentes repelentes Neem para as duas vias de intoxicação. Temperatura de 30 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.



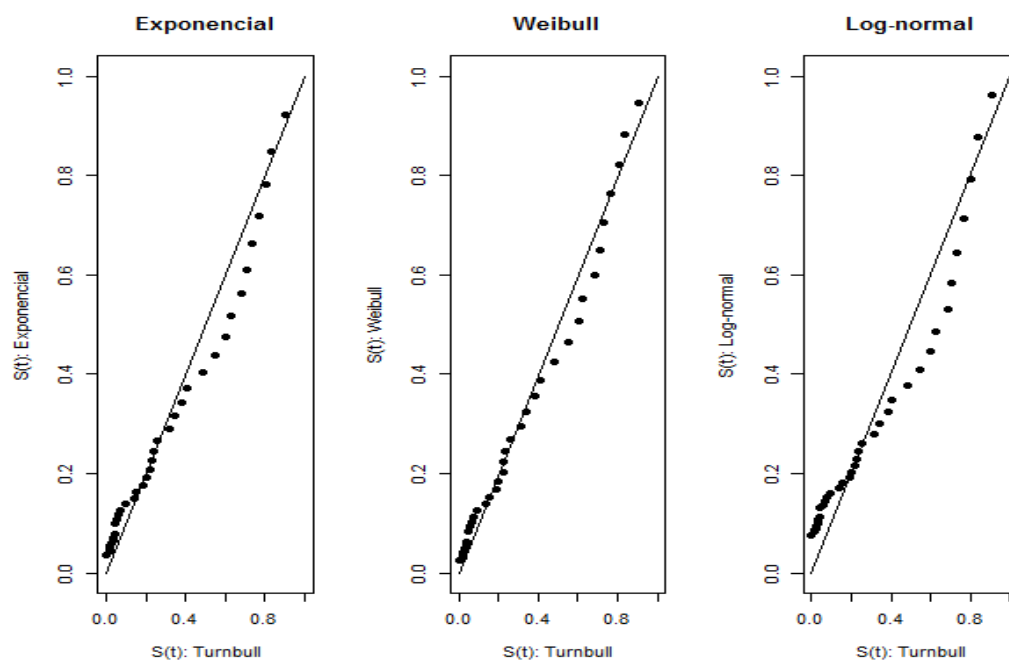
Fonte: Do autor (2019).

Figura 2. Comparação entre os modelos paramétricos para sobrevivência de abelhas *Trigona spinipes* e as estimativas de Turnbull. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.



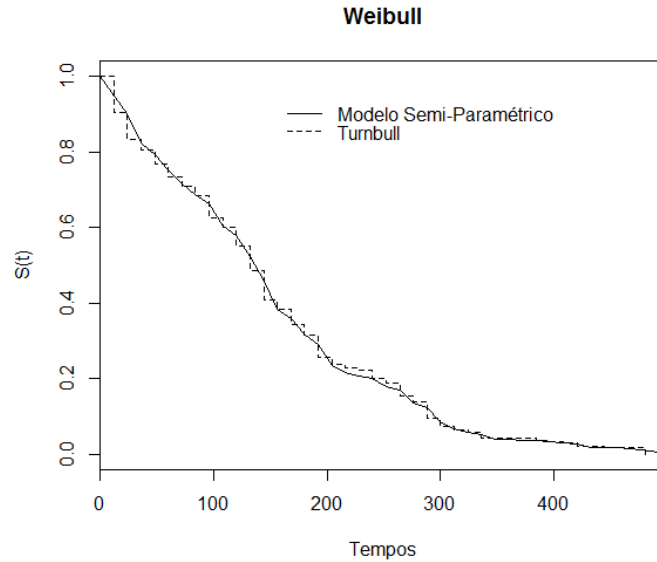
Fonte: Do autor (2019).

Figura 3. QQPlot entre os modelos paramétricos e as estimativas de Turnbull para sobrevivência de abelhas *Trigona spinipes*. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.



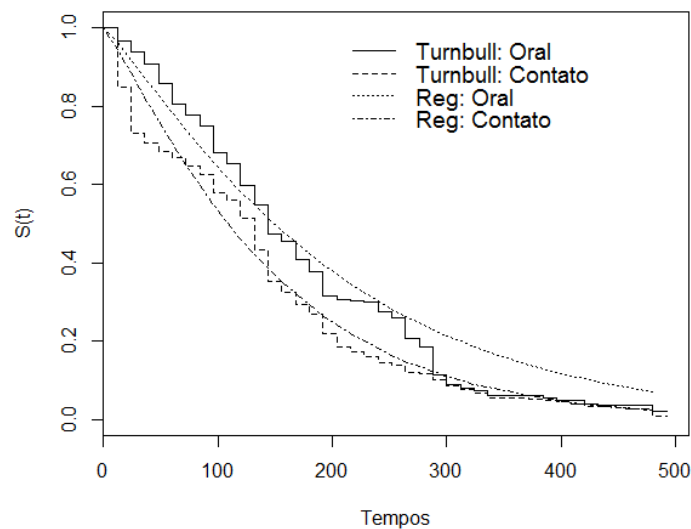
Fonte: Do autor (2019).

Figura 4. Curva de Sobrevivência semiparamétrica $S(t) = [S_0(t)]^{\exp\{0,3154\}}$ de abelhas *Trigona spinipes* submetidas ao repelente Neem. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.



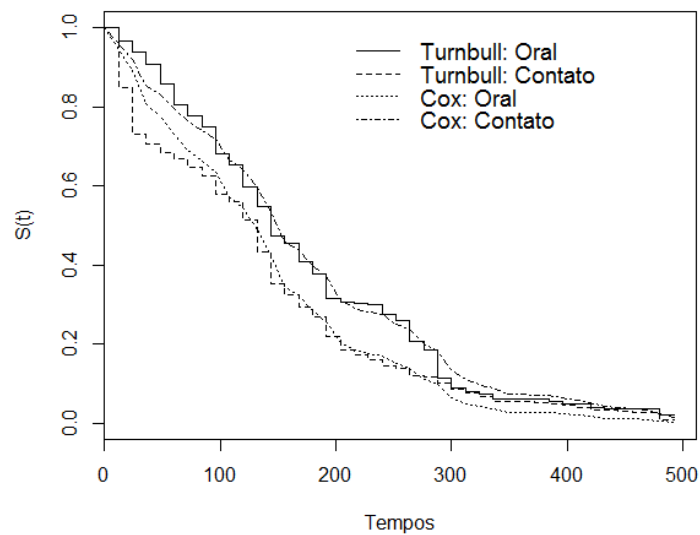
Fonte: Do autor (2019).

Figura 5. Curva de Sobrevivência $\hat{S}(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{150,2+1,366*x_1}\right)^{1,142}\right\}$ de abelhas *Trigona spinipes* em função de diferentes vias de intoxicação do repelente Neem, sendo $x_1=0$ intoxicação via oral e $x_1=1$ intoxicação via contato. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 6. Modelo de Cox $S(t) = [S_0(t)]^{\exp\{0,21653 \cdot x_1\}}$ de sobrevivência das abelhas *Trigona spinipes* em função de diferentes vias de intoxicação do repelente Neem, sendo $x_1=0$ intoxicação via oral e $x_1=1$ intoxicação via contato. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. UFSJ, São João del Rei-MG, 2018.



Fonte: Do autor (2019).

**ARTIGO 2 - MODELOS PARA EVENTOS RECORRENTES NA MENSURAÇÃO DA
INFLUÊNCIA DA MORTALIDADE ENTRE ABELHAS DE UMA MESMA GAIOLA
EM EXPERIMENTOS LABORATORIAIS**

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo formatado conforme as normas da revista *Journal of Apicultural Research*.

Modelos para eventos recorrentes na mensuração da influência da mortalidade entre abelhas em uma mesma gaiola em experimentos laboratoriais

Luiz Fernando Silva Resende^a, Carla Regina Guimarães Brighenti^{b*} and Deodoro Magno Brighenti^b

^aDepartment of Statistics, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil; ^aDepartment of Animal Science, Federal University of São João Del Rei, São João Del Rei, Brazil.

*carlabrighenti@ufsj.edu.br

Modelos para eventos recorrentes na mensuração da influência da mortalidade entre abelhas de uma mesma gaiola em experimentos laboratoriais

Em estudos de sobrevivência em abelhas africanizadas raramente são consideradas as proporções de mortalidade, dentro das unidades experimentais, nos ajustes dos modelos. Isso é importante, em razão das características de comportamento higiênico destas. Neste estudo, objetivou-se estudar algumas variações do modelo de Cox para eventos múltiplos em dados de bioensaio de toxicidade oral, ao longo do tempo, com abelhas africanizadas. Cada unidade experimental foi composta por gaiola cilíndrica contendo 10 abelhas e foram mantidas em câmeras climatizadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, UR $70\% \pm 10$ e fotoperíodo de 12 horas. Os tratamentos foram realizados com o uso de soluções com concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 5,0 e 10g de glifosato para cada 100 mL de solução aquosa de sacarose 50%. A morte de cada abelha constituiu o evento de interesse e o seu intervalo de tempo foi registrado. Foram considerados os modelos, clássico de Cox e suas variações denominadas AG, LWA, GT-UR, PWP-CP, PWP-GT e TT-R. Para selecionar o modelo que melhor se ajuste aos dados, foram utilizados os testes de Wald, da razão de verossimilhança, Logrank e o critério de informação de AIC. Para avaliar a suposição básica de riscos proporcionais para o uso do modelo de regressão de Cox, foram utilizadas técnicas de análise gráfica do risco acumulado, dos Resíduos de Schoenfeld, dos Resíduos de Martingale e Resíduo Deviance. Os modelos estratificados que consideram a dependência da proporção de mortalidade em abelhas africanizadas dentro da gaiola, mostraram-se superiores aos não estratificados, sendo o modelo PWP-CP, com intervalo do tipo Counting Process, o que apresentou melhor ajuste.

Palavras-chave: Abelha Africanizada, Comportamento Higiênico, Risco, Modelos proporcionais de Cox, Modelo PWP, Counting Process.

Introdução

É cada vez mais frequente observar situações em que alguns eventos de interesse podem ocorrer mais que uma vez para a mesma unidade experimental, nessas situações tem-se os chamados eventos recorrentes ou múltiplos.

Os dados referentes a eventos recorrentes têm como principal característica o registro múltiplo para cada unidade experimental, o que inviabiliza a aplicação direta do modelo de regressão de Cox para avaliação em experimentos de tempo de vida.

Ao realizar pesquisas de tempo de sobrevida com abelhas em laboratório, a recomendação, segundo Pirk (2013) é utilizar 30 indivíduos por gaiola e as análises estatísticas de sobrevivência mais usuais são a estimação não paramétrica, utilizando a técnica de Kaplan Meier (KRAINER et al., 2016; TOSI et al., 2017) e o uso do modelo semi-paramétrico de Cox (NATSOPOULOU; DOUBLET; PAXTON, 2016; PUSCEDDU et al., 2018). Nessa análise a contabilidade do tempo de vida, considera o número de indivíduos mortos por gaiola ao longo do tempo. No entanto, não há nenhuma especificidade no modelo que considere a proporção de indivíduos mortos, ao longo do tempo, por unidade experimental. Deve-se ressaltar que as abelhas são insetos sociais com características de comportamento higiênico muito acentuadas, principalmente em abelhas africanizadas (CHERUIYOT et al., 2018; NGANSO et al., 2017). Esse fato pode ser mais crítico, quando se trata de experimentos de avaliação de toxicidade oral de inseticidas (MATTOS; SOARES; TARPY, 2017) ou herbicidas (TSVETKOV et al., 2017), nos quais toxinas provenientes dos indivíduos mortos permanecem dentro das mesmas gaiolas. As múltiplas mortes que ocorrem dentro de uma unidade experimental podem ser consideradas como eventos múltiplos e assim se faz necessário, utilizar modelos específicos, considerando tais particularidades em suas análises.

Algumas variações do modelo de Cox para eventos múltiplos foram sugeridas por Prentice, Williams e Peterson (1981) conhecido como PWP; o modelo AG de Andersen e Gill (1982); Lee et al. (1992) o modelo LWA, e Kelly e Lim (2000) que propuseram os modelos TT-R e GT-UR. Therneau e Grambsch (2013) propuseram uma maneira sistemática de caracterizar esses modelos, usando três estruturas principais: intervalo sob risco, risco basal e estratificação.

O intervalo sob risco representa os limites de tempo nos quais a unidade experimental está em risco de que ocorra determinado evento. Há três métodos de registro usuais, denominados *Total Time*, que representa o intervalo sob risco de um evento independente de

outros eventos, e os métodos *Couting Process* e *Gap Time* que consideram a dependência com evento anterior (KELLY; LIM, 2000). Assim, uma das diferenças entre o modelo de Cox clássico e os modelos para eventos múltiplos está na definição do conjunto de indivíduos em risco. No modelo clássico, o indivíduo deixa de estar em risco quando o evento ocorre. Contudo, para eventos múltiplos, o indivíduo permanece em risco quando os eventos ocorrem (COLOSIMO; GIOLO, 2006).

A estrutura do modelo chamada risco basal é uma função não negativa, dependente do tempo que pode ser comum ou variável a todos os eventos (BELLERA et al., 2010). No modelo de Cox clássico ela é comum a todos os eventos, no entanto, nas variações do modelo para o caso de eventos múltiplos, é possível realizar uma estratificação ou restrição que permite especificar um risco basal para cada estrato (evento) pré-determinado (FERREIRA, 2016).

Diante do exposto, objetivou-se, neste estudo, avaliar os modelos para eventos múltiplos que melhor expliquem a influência da proporção de mortalidade de abelhas africanizadas, ao longo do tempo, em experimentos laboratoriais de toxicidade oral.

Material e Métodos

Para estudar a influência da mortalidade de abelhas dentro de uma mesma unidade experimental, foi realizado um bioensaio de toxicidade oral, utilizando o herbicida glifosato, sob o nome comercial de Roundup®.

A metodologia utilizada foi adaptada segundo os padrões listados por Medrzycki et al. (2013) e Williams et al. (2013). Os tratamentos foram realizados com dosagens diferentes de Roundup® Wg (720 g/kg de ácido de glifosato), versão da linha Roundup® que usa formulação granulada do princípio ativo.

Os adultos de abelhas africanizadas foram obtidos diretamente da colônia localizada em condições naturais em apiário experimental da Universidade Federal de São João del-Rei, MG (UFSJ). Posteriormente, foram transportadas para o Laboratório de Práticas Apícolas do

Departamento de Zootecnia. As abelhas foram anestesiadas por abaixamento de temperatura e separadas em grupos de 10 unidades experimentais para cada unidade experimental e mantidas em câmara climatizada a $30 \pm 2^\circ \text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. O estudo realizou-se com 6 tratamentos, com 3 repetições para cada unidade experimental, totalizando 180 abelhas.

A preparação das unidades experimentais se deu com o uso dos grupos de 10 que foram colocadas em gaiolas de PVC cilíndricas com 10 cm de diâmetro por 5 cm de altura, revestidas com tecido de organza para contagem dos insetos, identificadas individualmente. Uma solução aquosa foi preparada, utilizando-se sacarose PA e água, nas proporções de 1:1. Os tratamentos receberam as concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 5,0 e 10,0 g de Roundup® para cada 100 mL de solução aquosa de sacarose a 50% e foram colocados no recipiente no interior das gaiolas. As doses foram compatíveis com as recomendações do fabricante para aplicação em diferentes culturas vegetais e, no caso das duas últimas concentrações, de modo a extrapolar tais recomendações. Anterior à colocação das dietas, as abelhas foram mantidas em jejum por 1 hora. Posteriormente, puderam se alimentar *ad libitum* assim que as soluções foram ofertadas. Em todos os grupos testados, a dieta contaminada foi substituída por dieta não contaminada, após 6 horas, por meio de uma nova anestesia e a troca dos recipientes contaminados por outros (MEDRZYCKI et al., 2013).

A variável resposta tempo t_{ik} até a ocorrência da morte da abelha i no estrato k foi contabilizado em intervalos pré-determinados, gerando dados censurados. O experimento teve duração de 96 horas, após isso, o tempo de mortalidade foi considerado como censurado, conforme recomendado por Pirk et al. (2013) para abelhas intoxicadas via oral.

Para a análise de sobrevivência, utilizou-se inicialmente o modelo de regressão clássico de Cox, para modelar e testar hipóteses. O modelo de Cox é definido como:

$$S(x|t_{ik}) = \lambda_{0k}(t_{ik})^{\exp\{x'\beta\}} \quad (1)$$

Em que x corresponde a variável em estudo que, nesse experimento corresponde as diferentes concentrações do glifosato, λ_{0k} a função de taxa de risco basal, que pode ser comum ou específica para os k estratos definidos e β o parâmetro.

Independente da forma da distribuição do tempo de sobrevivência, o método de estimação de parâmetros é baseado na verossimilhança parcial (THERNEAU, 2015).

Dentre as variações do modelo de Cox para eventos múltiplos serão utilizados os modelos conforme Tabela 1, em que se apresentam as principais características de cada um, quanto às três estruturas principais.

Quanto à estrutura em intervalo sob risco, os três métodos de registro desses intervalos são: Total Time (TT), que representa o intervalo sob risco de um evento independente de outros eventos, com limite inicial em zero e limite final na ocorrência do evento k , ou seja, o intervalo sob risco será $(0; t_k)$; Counting Process (CP) que representa a ocorrência de eventos com dependência do evento anterior, sendo o intervalo sob risco definido por $(t_{k-1}; t_k)$. A suposição básica desse método é que os números de eventos em intervalos de tempo que não se sobrepõem são independentes dados à covariável (COLOSIMO; GIOLO, 2006); Gap Time (GT) que considera a dependência do evento k com $k-1$, porém é reiniciado para cada novo evento, sendo então o intervalo sob risco $(0; t_k - t_{k-1})$ (KELLY; LIM, 2000).

Os modelos GT-UR, LWA e AG são não estratificados, enquanto PWP e TT-R são estratificados (Tabela1). Quando o conjunto de risco é não estratificado, considera-se que todos os intervalos sob risco, de todas as unidades experimentais em estudo, podem estar incluídos no conjunto de risco de qualquer evento, seja qual for o número de acontecimentos observados para cada unidade experimental. Se for estratificado, considera-se que as contribuições para o conjunto de risco de ordem k estão restritas à inclusão de informação proveniente dos k -ésimos intervalos de risco (FERREIRA, 2016).

Tabela 1. Equações dos modelos recorrentes e seus respectivos riscos basais, interval sob risco e estratificação.

Modelos	Estratificação	Partial likelihood $L(\beta)$	Registro	Risco
AG	Não estratificado	$\prod_{i=1}^n \prod_{k=1}^K \left(\frac{e^{\{\beta x_{ik}\}}}{\sum_{j=1}^n \sum_{l=1}^K Y_{jl}(t_{ik}) e^{\{\beta x_{il}\}}} \right)^{\delta_{ik}}$	CP: $(t_{k-1}; t_k)$	$\lambda_0(t)$
LWA			TT: $(0; t_k)$	$\lambda_0(t)$
GT-UR			GT: $(0; t_k - t_{k-1})$	$\lambda_{0k}(t)$
PWP-CP	Estratificado	$\prod_{i=1}^n \prod_{k=1}^K \left(\frac{e^{\{\beta x_{jk}\}}}{\sum_{j=1}^n Y_{jk}(t_{jk}) e^{\{\beta x_{jk}\}}} \right)^{\delta_{ik}}$	CP: $(t_{k-1}; t_k)$	$\lambda_{0k}(t)$
PWP-GT			GT: $(0; t_k - t_{k-1})$	$\lambda_{0k}(t)$
TT-R			TT: $(0; t_k)$	$\lambda_{0k}(t)$

Fonte: Kelly e Lim (2000).

Esses modelos têm função de sobrevivência definido pela equação (1), função de Risco definido por:

$$\lambda_{ik}(t_i) = \lambda_{0k}(t_{ik}) \exp\{x' \beta\} \quad (2)$$

E função de Risco acumulado definidor por:

$$\Lambda_0(t_i) = \int_0^t \lambda_{0k}(t_{ik}) du \quad (3)$$

Para selecionar o modelo que melhor se ajusta aos dados, foram utilizados quatro testes:

(1) Teste de Wald, definido por:

$$W = (\hat{\theta} - \theta_0)^t [-k(\theta_0)] (\hat{\theta} - \theta_0) \quad (4)$$

em que $k(\theta_0)$ é a matriz de derivadas segundas do logarítimo da função de verossimilhança. Rejeita-se $H_0: \theta = \theta_0$ para valores de W superiores ao valor tabelado de distribuição X^2 (WALD, 1943);

(2) Teste da razão de verossimilhança:

$$TRV = -2 \log \left[\frac{L(\theta_0)}{L(\theta)} \right] \quad (5)$$

faz uma comparação de modelos aninhados, verificando se, quando houver inclusão de uma ou mais covariáveis no modelo, a verossimilhança de um modelo aumenta significativamente em relação ao outro modelo (CARVALHO et al., 2011);

(3) Teste Logrank é dado por:

$$S = U'(\theta_0)[-k(\theta_0)]^{-1}U(\theta_0) \quad (6)$$

em que $U'(\theta_0) = \frac{d \log L(\theta)}{d \theta}$, $H_0: \theta = \theta_0$ é rejeitada se $S > X^2$ (COLOSIMO; GIOLO, 2006).

(4) critério de informação de AIC dado por:

$$AIC = -2 \log(L_q) + 2p \quad (7)$$

em que L_q é a função de máxima verossimilhança do modelo para seleção do melhor modelo (AKAIKE, 1987).

A suposição básica para o uso do modelo de regressão de Cox é, que as taxas de falha sejam proporcionais, e para avalia-las foram utilizadas algumas técnicas de análise gráfica.

O gráfico dos Resíduos de Schoenfeld averigam a proporcionalidade de cada covariável r_{pi} , definidos para cada i-ésima unidade experimental como $r_{pi} = \delta_i(x_{pi} - \alpha_{pi})$, em que α_{pi} corresponde ao valor esperado da covariável para a falha, e δ_i a variável indicadora de falha, portanto, se a observação for censurada o resíduo tem valor zero. Para a análise do gráfico dos resíduos de Schoenfeld versus o tempo, verifica-se se os dados estão distribuídos igualmente ao longo do tempo e dispostos numa nuvem de pontos aleatórios, centrados em zero,

numa linha horizontal. Sendo assim, a suposição de riscos proporcionais permite um modelo adequado para os dados (SILVA, 2016).

A avaliação de pontos atípicos foi realizada pelas análises do gráfico do resíduo de martingale ($\hat{m}_i$) versus x_{iq} , em que $\hat{m}_i = \delta_i - \hat{\Lambda}_0 \exp\{\sum_{k=1}^p x_{ip} \hat{\beta}_k\}$, e pelo resíduo deviance ($\hat{d}_i$) versus $\sum_{l=1}^p x_{ip} \beta_l$, em que $\hat{d}_i = \text{sin}(\hat{m}_i) [-2(\hat{m}_i + \delta_i \log(\delta_i - \hat{m}_i))]^{1/2}$ (THERNEAU; GRAMBSCH; FLEMING, 1990).

Resultados

Em uma primeira análise, buscou-se associar os conceitos estatísticos dos estratos múltiplos e eventos as características dos experimentos laboratoriais com abelhas. Dessa forma, definiu-se, conforme proposta de modelagem deste trabalho, os eventos, como sendo a morte de cada abelha, quando foi registrado o seu intervalo de ocorrência (T_0 e T_F). Os estratos foram considerados com número total de abelhas mortas por unidade experimental, ao longo do tempo. Assim, o estrato k varia de 1 até 10 eventos de morte por unidade amostral.

Cada repetição de tratamento constituiu a i -ésima observação da covariável estabelecida pelas dosagens do glifosato.

Na Tabela 2, apresentam-se os valores dos coeficientes, e o teste de Wald constata que o tratamento x tem influência significativa em todos os modelos.

Foram ajustados os resultados do tempo vida, considerando os modelos tanto o estratificado quanto não estratificado, e estes comparados com o modelo de riscos proporcionais de Cox clássico.

Observa-se que, apesar da significância obtida ($p > 0,05$) para a estimativa do parâmetro β , corresponde ao efeito da covariável de dosagem do glifosato, em todos os modelos, percebe-se que, entre o modelo de Cox Clássico e os demais, em que se realiza a abordagem de dependência de mortalidade da gaiola, há grande diferença de grandeza entre eles, sendo as estimativas mais próximas da modelagem clássica, os ajustes obtidos pelos

modelos AG e GT-UR. Por outro lado, as estimativas que mais se afastam foram as do modelo PWP-CP e TT-R (Tabela 2).

Há de se ressaltar que o modelo TT-R, neste estudo, em que há uma predefinição dos tamanhos dos estratos, é coincidente com o modelo proposto por Wei, Lin e Weissfeld (1989), conhecido por WLW. Nesse último modelo, a condição de utilização é, justamente, essa predefinição, o que, no caso deste estudo, é uma condição experimental.

Tabela 2. Valores dos parâmetros, erro padrão e valores p no teste de Wald para cada modelo.

Models	$\hat{\beta}$	SE($\hat{\beta}$)	(Wald) P-value
Cox	0,07979	0,02863	0,00531
AG	0,11840	0,02800	0,00867
LWA	0,28090	0,02878	0,00000
GT-UR	0,15250	0,02703	0,01940
PWP-CP	0,33054	0,07558	0,00003
PWP-GT	0,22110	0,04420	0,03470
TT-R	0,55780	0,06276	0,00000

Fonte: Do autor (2019).

Apesar de todas as estimativas serem significativas, se faz necessário utilizar critérios para a seleção do modelo de melhor ajuste, na Tabela 3, apresenta-se o resultado do teste de razão de verossimilhanças parcial e Logrank associados ao modelo nulo com os modelos marginais e de Cox, resultando todos em significância $p < 0,05$ sendo todos eles significativos.

No entanto, ao se considerar os valores do AIC, percebe-se que os modelos estratificados se ajustam melhor aos dados do experimento de tempo de vida para abelhas africanizadas, com AIC bem inferiores aos modelos não estratificados. O modelo de riscos proporcionais de Cox, que também não leva em consideração os estratos, também tem ajuste inferior aos estratificados. Outra importante informação é que o melhor método de registro do intervalo sob risco foi o CP, independente se o risco é estratificado ou não.

Tabela 3. Teste da razão de verossimilhança (LHR), Logrank e Akaike (AIC) para seleção do melhor modelo.

Risk	Record	Models	LHR	P-value	Logrank	P-value	AIC
Classic	CP	Cox	7,67	0,00560	7,92	0,00488	713,8
	CP	AG	17,21	0,00003	18,73	0,00002	648,9
Unstratified	TT	LWA	82,93	0,00000	120,9	0,00000	905,4
	GT	GT-UR	29,08	0,00000	34,62	0,00000	814,1
Stratified	CP	PWP-CP	20,88	0,00000	21,88	0,00000	225,8
	GT	PWP-GT	25,66	0,00000	27,63	0,00000	363,3
	TT	TT-R	123,50	0,00000	150,2	0,00000	291,5

Fonte: Do autor (2019).

Em consequência dos resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3, decidiu-se pela escolha do modelo PWP-CP. Com o modelo selecionado, verificou-se a pressuposição de riscos proporcionais exigida nos modelos de Cox. Na Figura 1, apresenta-se o gráfico dos Resíduos de Schoenfeld, no qual não se observa tendência, ao longo do tempo e, portanto, não há indícios da violação de riscos proporcionais ($p = 0,451$, $Rho = -0,0688$). Fato semelhante foi verificado nos resíduos de Martingale e Deviance.

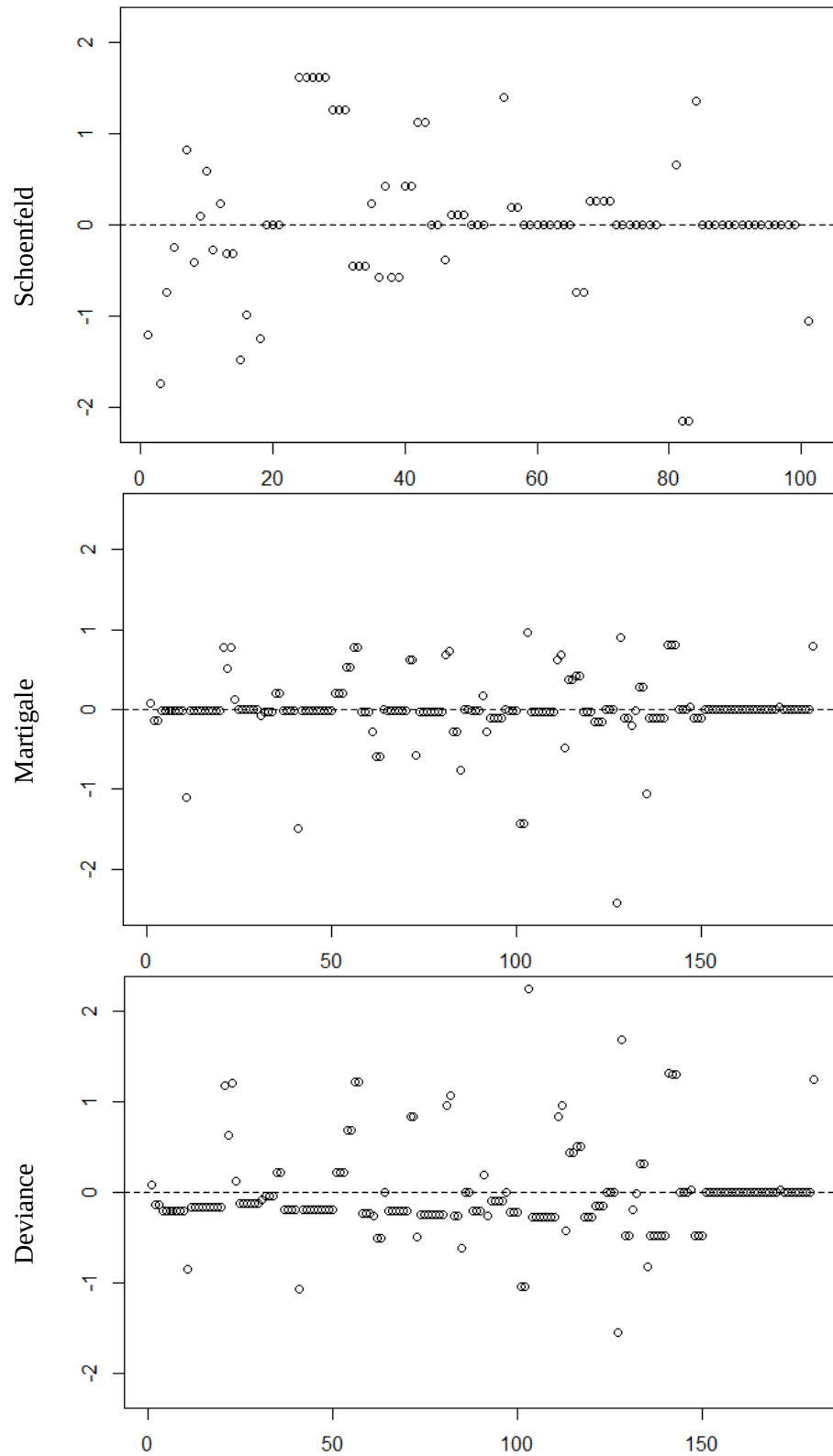


Figura 1. Resíduos de Schoenfeld, Martingale e Deviance para verificar a pressuposição de riscos proporcionais.

Fonte: Do autor (2019).

A função de risco corresponderá a $\lambda(x|t_i) = \lambda_{0k}(t_i) \exp\{x * (0,33054)\}$ em que os valores do risco basal ($\lambda_{0k}(t_i)$) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores do risco basal $\lambda_{0k}(t_i)$ do modelo $\lambda(x|t_i) = \lambda_{0k}(t_i) \exp\{x * (0,33054)\}$ para cada estrato e tempo..

Tempo (horas)	Estrato									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	0,1368	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,1368	-	0,2268	-	-	-	-	-	-	-
18	0,9888	1,0209	0,8677	-	0,7744	0,1813	0,2564	-	-	0,2564
30	0,9888	1,8944	0,8677	-	0,7744	0,1813	0,2564	0,0989	-	0,2564
42	1,3534	1,8944	2,4174	0,5406	0,7744	1,2569	0,2564	0,0989	0,1813	0,4047
54	3,2130	2,3494	3,3060	3,4459	2,7302	1,2569	0,2564	0,0989	0,1813	0,4047
66	3,2130	2,3494	4,1325	3,4459	4,1954	1,2569	1,0772	0,0989	0,1813	0,4047
78	3,2130	5,3594	8,8286	8,3948	6,1323	1,2569	2,8205	0,0989	0,1813	0,4047
90	6,9231	5,3594	8,8286	10,3317	6,1323	5,6959	5,7258	0,0989	0,1813	0,4256
96	6,9231	5,3594	8,8286	10,3317	6,1323	5,6959	5,7258	0,0989	0,1813	0,4653

Fonte: Do autor (2019).

Os dados faltantes correspondem aos riscos não calculados pela não ocorrência da proporção de mortalidade no estrato em questão dos respectivos tempos. Depois da primeira ocorrência em cada estrato, caso não ocorra mortalidade no tempo associado o risco basal acumulado permanece o mesmo do tempo anterior.

A partir da estimativa ($\beta = 0,33054$), em Tabela 5, foram construídos os intervalos para a parte paramétrica do modelo PWP-CP.

Tabela 5. Estimativas globais dos parâmetros, Limite Inferior (LI) e Limite Superior (LS) associados ao modelo PWP-CP $\lambda(x|t_i) = \lambda_{0k}(t_i) \exp\{x * (0,33054)\}$.

Dosagem	Dosagem* $\hat{\beta}$	$\exp(\text{Dosagem}*\hat{\beta})$	Exp(LI)	Exp(LS)
0,0	0,00000	1,00000	0,8565	1,16754
0,5	0,16527	1,17971	1,01042	1,37736
1,0	0,33054	1,39172	1,19201	1,62489
1,5	0,49581	1,64183	1,40623	1,9169
5,0	1,65270	5,22106	4,47184	6,0958
10,0	3,30540	27,25944	23,34774	31,82652

Fonte: Do autor (2019).

Os valores apresentados, na Tabela 5, correspondem aos resultados da parte paramétrica do modelo de Cox para as dosagens testadas. Pode-se perceber a semelhança dos valores nas quatro primeiras doses.

Ao incluir a parte não paramétrica do modelo, pode-se calcular a razão de riscos em situações distintas, tais como:

$$\frac{\lambda(t_i|x_5)}{\lambda(t_i|x_3)} = \frac{\lambda_{0k}(t_i) \exp\{5,0*(0,33054)\}}{\lambda_{0k}(t_i) \exp\{1,0*(0,33054)\}} = \frac{5,22106}{1,39172} = 3,75152 \quad (8)$$

O que significa que o risco de morte de uma abelha exposta a uma contaminação com dose de 5,0g/ml de glifosato é de aproximadamente 3,8 vezes o risco de morte de abelhas expostas a uma dose de 1,0g/ml de glifosato, sob as mesmas condições de mortalidade dentro da gaiola, pois na expressão (425), a parte não paramétrica foi considerada semelhante, isto é, mesmo estrato k no mesmo intervalo de tempo t . Para a mesma situação os demais riscos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Estimativas globais dos parâmetros associados ao modelo PWP-CP $\lambda(x|t_i) = \lambda_{0k}(t_i) \exp\{x * (0,33054)\}$.

Dosagem	0,0	0,5	1,0	1,5	5,0	10,0
0,0	1,000	0,848	0,719	0,609	0,192	0,037
0,5	1,180	1,000	0,848	0,719	0,226	0,043
1,0	1,392	1,180	1,000	0,848	0,267	0,051
1,5	1,642	1,392	1,180	1,000	0,314	0,060
5,0	5,221	4,426	3,752	3,180	1,000	0,192
10,0	27,259	23,107	19,587	16,603	5,221	1,000

Fonte: Do autor (2019).

Na Figura 1, estão apresentadas as curvas de sobrevivência estimadas para os estratos em estudo em cada uma das dosagens de glifosato. Os estratos 8 e 9, ou seja a contagem de 8 e 9 abelhas mortas em gaiola só ocorreu em um tempo entre os avaliados e, por isso, não foram representados graficamente.

Nota-se um agrupamento das quatro menores dosagens em todos os estratos, sendo assim, confirma-se não existir evidências sobre a diferença entre tais tratamentos.

As figuras representam que a probabilidade de sobrevivência de, por exemplo, três abelhas por, aproximadamente 70 horas, no tratamento testemunha é de 70% enquanto isso na dosagem 5 essa probabilidade se reduz a 18%.

No entanto, percebe-se que há um aumento da influência da mortalidade por gaiola já que há, com o aumento da mortalidade, ou seja, estrato k maior, um aumento da declividade nas curvas, exceto no estrato 10, em que nota-se uma estabilização, já que se trata do término do experimento sem censuras. Nesse caso, evidencia-se também o agrupamento formado pelas dosagens iniciais e o distanciamento destas para as dosagens de 5 e 10g/ml. Dessa figura, pode-se observar que as curvas de sobrevivência não apresentam diferença muito acentuadas, mesmo nas concentrações 5ml e 10ml, que têm uma taxa de mortalidade mais alta, é possível observar a proporcionalidade entre elas e as demais.

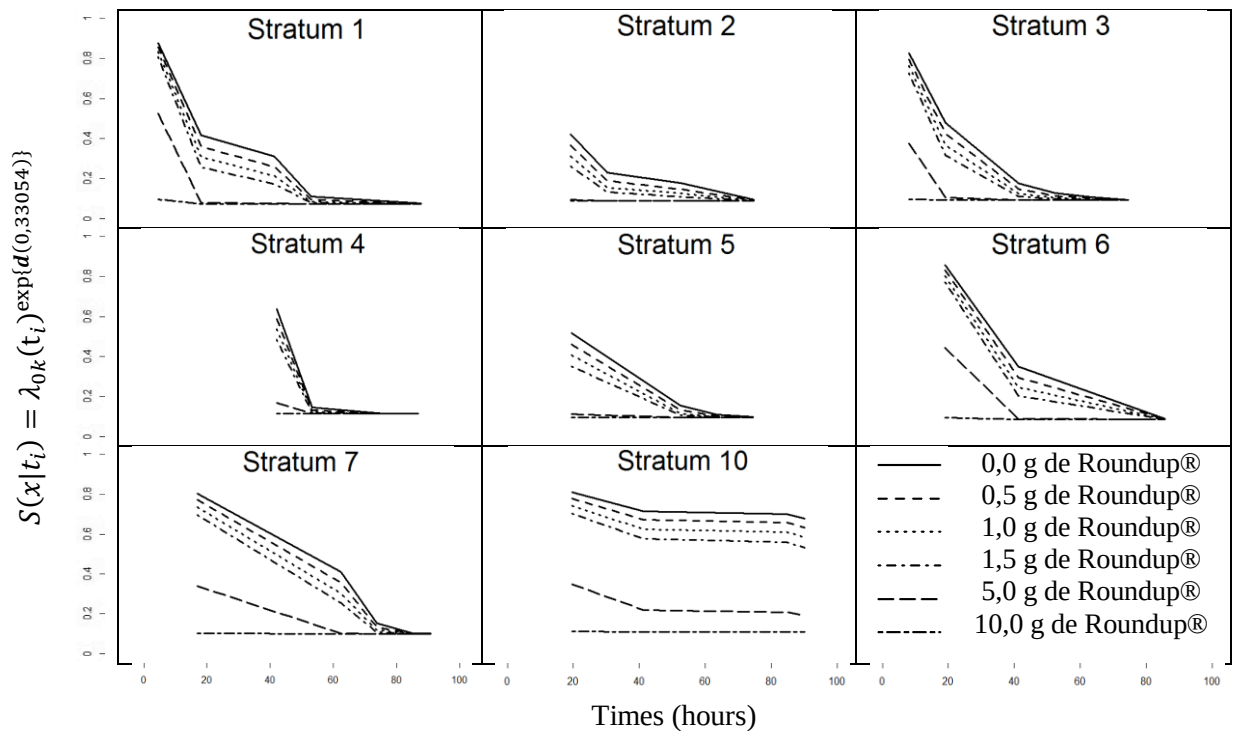


Figura 2. Função de sobrevivência do modelo PWP-CP $S(x|t_i) = \lambda_{0k}(t_i) \exp\{c'(0,33054)\}$ para cada estrato.

Fonte: Do autor (2019).

A ocorrência de AIC inferior em modelos estratificados (PWP-CP, PWP-GT, TT-R) (Tabela 3) corroboram com a hipótese de influência da mortalidade entre abelhas em uma mesma gaiola, isto porque os modelos não estratificados consideram apenas um risco basal por tempo, mas os modelos estratificados para eventos múltiplos consideram o risco basal dependente também dos estratos. Assim, utilizando tais modelos, é possível mensurar o risco específico para cada tempo em cada proporção de abelhas mortas por gaiola.

O fato do melhor método de registro do intervalo sob risco ser obtido para Countig Process (CP) condiz com os experimentos laboratoriais com abelhas africanizadas. Isso porque o intervalo do tempo é registrado de forma dependente do anterior, conforme se desejava demonstrar nesse trabalho. Assim o tempo de vida de uma mortalidade de k indivíduos é influenciada pela ocorrência de morte dos $k - 1$ indivíduos anteriores, pois as abelhas como insetos sociais reduziram seu aquecimento, possibilidades de grooming e impossibilidade de realização de comportamento higiênico adequado.

Da mesma forma, o risco basal apresentado (Tabela 4) demonstra que além de ocorrer dependência de mortalidade entre as abelhas na mesma unidade, essa dependência é crescente, ao longo do tempo, sendo mais enfática nos estratos de menor proporção de indivíduos mortos, portanto a influência é mais significativa na ocorrência das primeiras mortalidades.

Os estudos avaliando efeitos toxicológicos de herbicidas sobre abelhas são escassos e poucos são os estudos que se dedicaram a medir o efeito do glifosato a abelhas expostas de maneira oral, tornando-se necessária a continuidade de análises do impacto desse defensivo (HERBERT et al., 2014; MONCHARMONT et al., 2003; RUIZ-TOLEDO; SÁNCHEZ-GUILLÉN, 2014). Muitos trabalhos envolvem a avaliação dos resíduos de glifosato na produção de mel como Thompson et al. (2014) que, em estudo com colônias de *A. mellifera*, avaliando a exposição após contato com flores de *Phacelia florida* contaminadas com glifosato, encontraram resíduos em amostras de néctar de até um 31,3mg de glifosato por quilo. Al

Naggar et al. (2015), por meio de análises de colônias de abelhas, no Egito, encontrou resíduos de defensivos agrícolas no mel, pólen e nas próprias abelhas, o que apontou para os riscos de contaminação e perda de qualidade em produtos apícolas de uso humano.

Assim, metodologias estatísticas, incluindo o risco basal dependente do tempo e do estrato na modelagem para eventos múltiplos de mortalidade de abelhas africanizadas, pode auxiliar na mensuração de situações em que o risco de morte de uma abelha, submetida à baixa dosagem do glifosato, pode ser até superior a de uma abelha com alta intoxicação por via oral, se na gaiola a qual ela está confinada, houver alta proporção de mortalidade.

Neste trabalho, as concentrações de 5mL e 10mL tiveram uma taxa de mortalidade mais alta. Da mesma forma, Balbuena et al. (2015), ao analisarem o voo de abelhas *A. mellifera* de volta a colmeia, após ofertar solução de sacarose contaminada com glifosato, verificaram diferenças estatísticas no tempo de voo em abelhas que eram tratadas com concentrações de 10mg de glifosato, por litro, onde o retorno à colmeia foi mais demorado, quando comparado com tratamentos de menores concentrações e o tratamento teste, indicando interferências prejudiciais em capacidades cognitivas da espécie. De forma semelhante, Herbert et al. (2014), analisando diferenças comportamentais entre abelhas expostas a doses subletais de glifosato, concluíram que a exposição prolongada não afetou a memória de curto prazo, no entanto, a exposição a doses subletais de glifosato teve efeito prejudicial na associação odor-recompensa, isto é, as abelhas apresentaram menor tendência em responder a estímulos olfativos provindos de alimentos necessários a elas.

Ruiz-Toledo e Sánchez-Guillén (2014) estudaram abelhas *A. mellifera* e *T. angustula* expostas a doses orais de glifosato. No experimento, testando exposição semelhante às concentrações de resíduos encontradas em águas locais, não ocorreu mortalidade estatisticamente diferente entre grupo controle e grupos expostos, entretanto, quando se testou exposição a metade da dose comercial, 178g/L de glifosato, as abelhas com dieta contaminada

apresentaram mortalidade de 100% em 12h. Já em um estudo com outro princípio ativo, em que ocorreu pulverização noturna de vegetais no campo, as abelhas em contato posterior com tais vegetais não apresentaram mortalidade, visto que elas só tiveram contato na manhã seguinte, o que permitiu o decaimento dos níveis de contaminação (ŠKERL et al., 2009), isto pode figurar como uma alternativa no uso de defensivos agrícolas para redução da mortalidade de abelhas.

Nenhum desses estudos, no entanto, foi realizado com abelhas africanizadas, pois há escassez de pesquisas sobre toxicidade com tal híbrido. O glifosato, embora tenha se mostrado pouco letal quando comparado a outros defensivos agrícolas, ainda sim, tem toxicidade significativa e demonstra inúmeros efeitos subletais, exigindo assim mais pesquisas. E, para quem tais pesquisas laboratoriais levem em consideração, a influência da mortalidade entre abelhas de uma mesma gaiola, deve-se utilizar um modelo que contemple tal característica, mostrando-se mais adequado o modelo de eventos múltiplos PWP-CP.

Conclusão

Os modelos estratificados, que consideram a dependência da proporção de mortalidade em abelhas africanizadas dentro das gaiolas em experimentos laboratoriais, mostraram-se superiores aos não estratificados, sendo o modelo PWP-CP, com intervalo do tipo Counting Process, o que apresentou melhor ajuste.

O modelo PWP-CP ajustado permitiu estimar o risco de morte de abelhas em diferentes dosagens. Da mesma forma, é possível estimar também a influência da mortalidade acumulada nas gaiolas nos tempos de sobrevivência das abelhas.

Agradecimento

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- AKAIKE, H. Factor analysis and aic. In: _____. **Selected papers of Hirotugu Akaike**. New York: Springer, 1987. p. 371-386.
- AL NAGGAR, Y. et al. Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 114, p. 1-8, 2015.
- ANDERSEN, P. K.; GILL, R. D. Cox's regression model for counting processes: a large sample study. **The Annals of Statistics**, Hayward, v. 10, n. 4, p. 1100-1120, Dec. 1982.
- BALBUENA, M. S. et al. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 218, n. 17, p. 2799-2805, 2015.
- BELLERA, C. A. et al. Variables with time-varying effects and the cox model: some statistical concepts illustrated with a prognostic factor study in breast cancer. **BMC Medical Research Methodology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2010.
- CARVALHO, M. S. et al. **Análise de sobrevivência: teoria e aplicações em saúde**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 2011.
- CHERUIYOT, S. K. et al. Varroa-specific hygienic behavior of *Apis mellifera* scutellata in Kenya. **Apidologie**, Versailles, v. 49, n. 4, p. 439-449, 2018.
- COLOSIMO, E. A.; GIOLO, S. **Análise de sobrevivência aplicada**. São Paulo: E. Blücher, 2006.
- FERREIRA, I. M. S. **Modelos para acontecimentos múltiplos**. 2016. 134 p. Dissertação (Mestrado em Matemática)-Universidade da Madeira, Funchal, 2016.
- HERBERT, L. T. et al. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 217, n. 19, p. 3457-3464, 2014.
- KELLY, P. J.; LIM, L. L. Y. Survival analysis for recurrent event data: an application to childhood infectious diseases. **Statistics in Medicine**, New York, v. 19, n. 1, p. 13-33, 2000.
- KRAINER, S. et al. Effect of hydroxymethylfurfural (HMF) on mortality of artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera* carnica). **Ecotoxicology**, New York, v. 25, n. 2, p. 320-328, 2016.
- LEE, E. W. et al. Cox-type regression analysis for large numbers of small groups of correlated failure time observations. In: _____. **Survival analysis: state of the art**. Dordrecht: Springer, 1992. p. 237-247.
- MATTOS, I. M. de; SOARES, A. E.; TARPY, D. R. Effects of synthetic acaricides on honey bee grooming behavior against the parasitic Varroa destructor mite. **Apidologie**, Versailles, v. 48, n. 4, p. 483-494, 2017.
- MEDRZYCKI, P. et al. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 52, n. 4, p. 1-60, 2013.

- MONCHARMONT, F. X. D. et al. Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 22, n. 12, p. 3088-3094, 2003.
- NATSOPOULOU, M. E.; DOUBLET, V.; PAXTON, R. J. European isolates of the Microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* have similar virulence in laboratory tests on European worker honey bees. **Apidologie**, Versailles, v. 47, n. 1, p. 57-65, 2016.
- NGANSO, B. T. et al. Hygienic and grooming behaviors in African and European honeybees: new damage categories in *Varroa destructor*. **PloS One**, San Francisco, v. 12, n. 6, p. e0179329, 2017.
- PIRK, C. W. et al. Statistical guidelines for *apis mellifera* research. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 52, n. 4, p. 1-24, 2013.
- PRENTICE, R. L.; WILLIAMS, B. J.; PETERSON, A. V. On the regression analysis of multivariate failure time data. **Biometrika**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 373-379, 1981.
- PUSCEDDU, M. et al. The effects of raw propolis on *Varroa*-infested honey bee (*Apis mellifera*) workers. **Parasitology Research**, Berlin, v. 117, n. 11, p. 3527-3535, 2018.
- RUIZ-TOLEDO, J.; SÁNCHEZ-GUILLÉN, D. Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. **Acta Zoológica Mexicana**, Xalapa, v. 30, n. 2, p. 408-413, 2014.
- SILVA, D. P. da. **Introdução ao modelo de cox com aplicação a dados de pneus 11.00 r22**. 2016. 40 p. Monografia (Graduação em Estatística)-Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- ŠKERL, M. I. S. et al. Residues of pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 83, n. 3, p. 374-377, 2009.
- THERNEAU, T. M. **Mixed effects Cox models**. 2015. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/26aa/155d3338a8ffdc889be935e0c028c3de4321.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2019.
- THERNEAU, T. M.; GRAMBSCH, P. M. **Modeling survival data: extending the Cox model**. New York: Springer Science & Business Media, 2013.
- THERNEAU, T. M.; GRAMBSCH, P. M.; FLEMING, T. R. Martingale-based residuals for survival models. **Biometrika**, London, v. 77, n. 1, p. 147-160, 1990.
- TOSI, S. et al. Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 284, p. 1869, Dec. 2017.
- TSVETKOV, N. et al. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn

crops. **Science**, New York, v. 356, n. 6345, p. 1395-1397, 2017.

WALD, A. Tests of statistical hypotheses concerning several parameters when the number of observations is large. **Transactions of the American Mathematical Society**, Bethesda, v. 54, n. 3, p. 426-482, 1943.

WEI, L. J.; LIN, D. Y.; WEISSFELD, L. Regression analysis of multivariate incomplete failure time data by modeling marginal distributions. **Journal of the American Statistical Association**, London, v. 84, n. 408, p. 1065-1073, 1989.

WILLIAMS, G. R. et al. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 52, n. 1, p. 1-36, 2013.