



CEUA | Comissão de Ética  
no Uso de Animais da UnB

---

## Orientações para cálculo do tamanho amostral em pesquisas com animais

---

Ana Lourdes Arrais de Alencar Mota, André Faria Mendonça, Bruno Stéfano Lima Dallago

### Prefácio

Este documento foi idealizado com o objetivo de trazer luz a um dos tópicos que mais causam entraves a aprovação dos projetos submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA-UnB). Tem por objetivo precípuo demonstrar a importância de uma justificativa clara e objetiva para o número de animais solicitado, assim como visa auxiliar os pesquisadores no cálculo do tamanho amostral ideal. Além disso, contextualiza perguntas de pesquisa mais comuns em alguns cenários metodológicos e orienta em relação ao uso das fórmulas matemáticas.

A matemática e a estatística são ferramentas essenciais e indissociáveis das exigências impostas às boas práticas no uso animal e à pesquisa científica de qualidade. Assim, tentamos deixar tudo mais “palatável” até aos mais avessos à essas disciplinas. Boa leitura!

## Sumário

Prefácio.....	1
Sumário .....	2
1. Introdução .....	3
2. Justificativas aceitáveis do tamanho amostral .....	4
2.1. Embasamento na literatura .....	4
2.2. Cálculo do n amostral.....	5
2.2.1. Estimativa de parâmetros: variáveis qualitativas ou quantitativas .....	6
a) Estimativa de médias (variáveis quantitativas).....	6
b) Estimativa de proporções (variáveis qualitativas ou categóricas).....	8
c) Ajuste do tamanho da amostra .....	10
2.2.2. Comparação: variáveis qualitativas ou quantitativas.....	11
a) Comparação entre proporções .....	11
b) Comparação entre médias.....	14
2.2.3. Estudos ecológicos ou zoológicos de animais de vida livre .....	16
a) Estudos que envolvem a captura de animais de vida livre na natureza .....	16
b) Estudos que envolvem a coleta de animais de vida livre na natureza .....	18
2.3. Correção do “n” considerando a expectativa de mortalidade.....	18
3. Considerações Finais .....	21
4. Softwares livres de fácil acesso .....	21
5. Referências.....	22

# 1. Introdução

O planejamento amostral é crucial no delineamento de qualquer projeto de pesquisa. Visa alocar corretamente os recursos materiais e ajustar toda a logística necessária ao alcance do objetivo proposto. Sobretudo, esse tópico é de suma importância quando envolve o bem-estar dos animais. A decisão por quantidade de animais além do necessário incorre na possibilidade de não se detectar diferenças significativas que de fato existam e, por outro lado, o uso de animais em quantidade além do necessário implicará desperdício de recursos e claro desrespeito à norma legal em vigor (Lei 11.794/2008, art.14 §4º). Ambos os casos representam problemas graves.

Para a execução de um planejamento amostral adequado é imprescindível estar familiarizado com a população-alvo e com a problemática que está sendo investigada, além de conhecimento básico da estatística a ser aplicada. É preciso também que sejam estabelecidos os níveis de imprecisão ou erros aceitos na estimativa dos parâmetros populacionais que a pesquisa busca afirmar. Não obstante, é de extrema relevância que todos esses pontos sejam definidos considerando não somente uma significância estatística ao final, mas que considerem a real significância clínica ou biológica dos resultados no formato a serem obtidos. Portanto, antes de propor qualquer projeto, o pesquisador deve estabelecer claramente qual pergunta ele está se propondo a responder, como ele pretende fazer isso (qual a sua população-alvo e como serão feitas as estimativas ou comparações entre os grupos experimentais) e o que seria considerado relevante do ponto de vista biológico.

O formulário unificado da CEUA-UnB para solicitação e autorização do uso de animais em pesquisa ou ensino, em seu item 9.4, prevê a descrição e justificativa para o tamanho amostral empregado. As justificativas aceitáveis atualmente estão fundamentadas na demonstração do cálculo amostral juntamente às explicações necessárias sobre as escolhas dos parâmetros utilizados nas fórmulas ou, ainda, na apresentação de trabalhos similares publicados em revistas indexadas. Nesse sentido, o objetivo deste documento é auxiliar os pesquisadores no preenchimento correto do referido campo.

## 2. Justificativas aceitáveis do tamanho amostral

### 2.1. Embasamento na literatura

A CEUA-UnB, ciente da diversidade de projetos de pesquisa exploratórios e inovadores, aceita justificativas de tamanho amostral embasadas na literatura científica formal. Aqui se enquadram, por exemplo, as propostas de estudos-piloto, boa parte dos estudos ecológicos, zoológicos e descritivos situacionais.

Apesar de muitas vezes não ser viável um cálculo amostral nesse contexto, é preciso que o pesquisador embase seu tamanho amostral (n amostral) em estudos que utilizaram a mesma espécie animal ou que tenham por objetivo a mensuração da mesma variável num contexto análogo ao que será proposto.

Nesse caso, o pesquisador deve descrever minimamente o contexto da pesquisa referenciada bem como indicar explicitamente quais pontos as duas pesquisas (a de referência e aquela a ser conduzida) se assemelham. **É obrigatório a disponibilização do link ou do artigo referenciado na forma de anexo ao formulário a ser enviado à CEUA.**

Como exemplo de texto a ser enviado à CEUA temos:

*“Este experimento visa a análise de diversos parâmetros inflamatórios, metabólicos e de progressão tumoral de melanomas. Neste experimento serão utilizados 11 animais por grupo para permitir a análise de microbiota, a exemplo de Wang et al. (2018). O modelo experimental a ser utilizado é o mesmo que aquele descrito por Lee et al. (2012), qual seja, camundongos BALB/c e C57BL/6J. Além disso, Lee et al. (2012) utilizaram n=11 animais por grupo em um desenho experimental que se assemelha à presente proposta no que tange ao tipo de tumor e variáveis a serem analisadas.”*

#### Referências

Lee, C., Raffaghello, L., Brandhorst, S., Safdie, F. M., Bianchi, G., Martin-Montalvo, A., et al. (2012). Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Sci. Transl. Med.* 4, 1–11. doi:10.1126/scitranslmed.3003293.

Wang, S., Huang, M., You, X., Zhao, J., Chen, L., Wang, L., et al. (2018). Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. *Sci. Rep.* 8, 2–15. doi:10.1038/s41598-018-31353-1.

Note que no exemplo acima as referências contemplam o endereço DOI, o que permite à CEUA acessar a referência na íntegra. Nesse sentido, caso não seja possível a indicação do link para acesso, é necessário que o proponente disponibilize o texto completo da referência à CEUA. Isso é essencial para a correta avaliação da proposta submetida.

## 2.2. Cálculo do n amostral

Na realização de qualquer estudo, é praticamente impossível examinar todos os elementos da população de interesse. Por isso, normalmente recorre-se a processos de amostragem. Amostragens probabilísticas, ou seja, que pressupõem sorteio ou alocação aleatória de seus elementos, e representativas do todo, nos dá subsídios para generalizar as conclusões obtidas a partir da amostra para a população, permitindo inferências estatísticas de maneira segura e com reconhecimento das limitações do processo.

É importante ressaltar que a definição do tamanho de amostra é sempre realizada considerando responder uma pergunta de pesquisa em específico. Apesar de na grande maioria dos casos os projetos não estudarem somente uma única variável, é sempre preciso definir o foco principal que norteará o cálculo, ou gerar uma variável resposta que unificará o conjunto de dados coletados a fim de alcançar a resposta final. Em pesquisas nas quais diversas variáveis sejam importantes para análise do desfecho estudado, é indicado o cálculo do tamanho amostral para cada uma dessas variáveis.

Existem diversos métodos para o cálculo do tamanho amostral. Cada um se aplica a um contexto diferente de tal forma que o pesquisador deve identificar a qual contexto sua pesquisa melhor se amolda.

Consideramos abaixo algumas situações de amostras aleatórias simples mais comuns no âmbito dos projetos submetidos à apreciação da CEUA-UnB. Estratégias amostrais mais específicas, que envolvam estratificação, conglomerados ou mesmo amostras não probabilísticas, devem buscar apoio profissional para o delineamento e determinação do tamanho amostral condizentes com suas complexidades.

## 2.2.1. Estimativa de parâmetros: variáveis qualitativas ou quantitativas

### a) Estimativa de médias (variáveis quantitativas)

Para estimar por amostragem um parâmetro populacional representado por uma variável quantitativa (discreta ou contínua), por exemplo, tamanho médio de rebanho, hematócrito ou concentração sérica de um fármaco, deve-se considerar a Equação [1] abaixo e:

- noção da variabilidade do parâmetro populacional (exemplo: desvio padrão da população) - DP
- precisão desejada em unidades da média (ou erro amostral máximo tolerado) - d
- o grau de confiança desejado para atingir determinada precisão -  $(1-\alpha)$

Quando não se conhece adequadamente o desvio padrão da variável, este pode ser estimado ou previsto considerando a amplitude da variável na população, ou seja, a distância absoluta entre o valor mais baixo e o valor mais alto da variável na população. Normalmente, utiliza-se um quarto da amplitude descrita:  $DP \cong 0,25$  da amplitude.

O argumento que mais impacta no cálculo do tamanho da amostra é a precisão desejada. **Assim, é sempre importante justificar o erro aceitável conforme a relevância clínica ou biológica do grau de precisão estabelecido pelo pesquisador.** Considerar um erro ligeiramente maior da estimativa populacional pode implicar logística de trabalho mais fácil para o alcance de conclusões semelhantes àquelas encontradas em um estudo com maior precisão. Assim como a aceitação de erros amostrais muito grandes pode levar a resultados com baixa significância estatística e conseqüentemente pouco conclusivos. No âmbito da CEUA, ambos os erros implicam desperdício de vidas animais.

Equação [1]

$$n = \left( \frac{Z_{(1-\alpha)} \times DP}{d} \right)^2$$

Onde:

$n$  = tamanho da amostra;

$Z_{(1-\alpha)}$  = valor  $Z$  da curva normal padrão para o grau de confiança  $(1-\alpha)$ , por exemplo,  $Z = 1,96$  se  $1-\alpha = 95\%$  ou,  $Z = 2,58$  se  $1-\alpha = 99\%$ ;

$DP$  = desvio padrão populacional da variável;

$d$  = precisão desejada, usualmente  $\pm 5\%$  da média esperada ( $1,05 \times$  média)

Exemplo 1:

*Pretende-se estimar a produção diária média de leite (L) por vaca em pico de lactação da região do Triângulo Mineiro. Não tendo noção da variância deste parâmetro na população, mas sabendo que a menor produção em pico de lactação estaria em torno de 2 litros e a maior, em cerca de 82 litros, podemos chegar a uma estimativa de desvio-padrão igual a 20 litros (0,25 x amplitude). Assumindo um grau de confiança de 95% e uma precisão desejada de  $\pm 2$  litros (**note a mesma unidade de medida da variável!! Não se usa porcentagem nesta fórmula!**), teríamos o seguinte cálculo:*

$$n = \left( \frac{1,96 \times 20}{2} \right)^2 = (19,6)^2 = 385$$

*No exemplo acima, seriam, portanto, 385 vacas em pico de lactação a serem amostradas. Caso o erro máximo tolerável da pesquisa fosse de  $\pm 5$  litros, ao invés de  $\pm 2$  litros, esse tamanho de amostra cairia drasticamente para 62 vacas em pico de lactação. Assim, ressalta-se a importância de discutir bem o parâmetro de precisão e apresentá-lo sempre na unidade de medida da variável a ser estudada, contextualizando-o bem.*

b) Estimativa de proporções (variáveis qualitativas ou categóricas)

Para estimar por amostragem um parâmetro populacional representado por uma variável qualitativa (nominal ou ordinal), deve-se considerar a Equação [2] e:

- frequência populacional esperada dos resultados da variável -  $p$
- precisão desejada em % (ou erro amostral máximo tolerado) -  $d$
- o grau de confiança desejado para atingir determinada precisão –  $(1-\alpha)$

Este é o cálculo indicado para, por exemplo, estudos de prevalência ou de frequência de dados categóricos, como sucesso *versus* insucesso, positivo *versus* negativo ou mesmo possuir ou não determinada característica. Assim, como na estimativa de uma média, o argumento que mais impacta no tamanho da amostra calculado é a precisão desejada.

É importante entender que por mais que pareça um contrassenso exigir uma estimativa daquilo que se está pretendendo determinar, é essencial que se tenha um conhecimento mínimo da variável estudada, pelo menos ter noção se é algo muito esperado ou pouco esperado na população, para um cálculo mais acertado do  $n$  amostral. Afinal, uma hipótese de pesquisa dificilmente surge de algo completamente desconhecido ou inesperado. Diante de um cenário completamente incógnito, sugere-se estimar uma frequência de 50%, que irá maximizar o tamanho da amostra considerando os mesmos graus de confiança e precisão desejados.

Equação [2]

$$n = \left( \frac{Z_{(1-\alpha)} \times \sqrt{p \times (1 - p)}}{d} \right)^2$$

Onde:

$n$  = tamanho da amostra;

$Z_{(1-\alpha)}$  = valor  $Z$  da curva normal padrão para o grau de confiança  $(1-\alpha)$ , por exemplo,  $Z = 1,96$  se  $1-\alpha = 95\%$  ou,  $Z = 2,58$  se  $1-\alpha = 99\%$ ;

$p$  = proporção estimada de resultados favoráveis da variável na população;

$d$  = precisão desejada, usualmente  $\pm 5\%$  da proporção estimada dos casos;



Exemplo 2:

*Pretende-se estimar a prevalência de uma determinada doença em um rebanho bovino suficientemente grande para supormos uma população infinita. Sabendo que se trata de uma doença usual entre a espécie, o pesquisador define como frequência esperada a prevalência de 30%, um grau de confiança de 95% e uma precisão desejada de 10%. Assim, teríamos o seguinte cálculo amostral:*

$$n = \left( \frac{1,96 \times \sqrt{0,3 \times 0,7}}{0,1} \right)^2 = \left( \frac{1,96 \times 0,45}{0,1} \right)^2 = (8,97)^2 = 8$$

*Considerando um cenário distinto, cuja doença foco do estudo fosse menos esperada, com prevalência de cerca de 10%, seria preciso discutir melhor o erro amostral máximo aceitável e ajustar o grau de precisão do cálculo do tamanho da amostra, que no cenário anterior poderia ser perfeitamente justificável e aceitável. Estimar um n amostral para determinar uma proporção de cerca de 10% com uma precisão de 10%, pode implicar resultados da pesquisa pouco conclusivos, de forma simplificada, podendo variar desde a não detecção da doença a uma estimativa em torno de 20% da população acometida, cenários muito distintos do ponto de vista epidemiológico e biológico. Nesse sentido, considerar uma maior precisão (ou um erro amostral máximo tolerado menor) torna-se imprescindível para validade do estudo e a utilização ética dos animais da pesquisa. Seguem duas simulações de cálculo, a primeira considerando uma precisão de 5% e a segunda, uma precisão de 2%.*

$$1^\circ) n = \left( \frac{1,96 \times \sqrt{0,1 \times 0,9}}{0,05} \right)^2 = 139 \text{ amostras}$$

$$2^\circ) n = \left( \frac{1,96 \times \sqrt{0,1 \times 0,9}}{0,02} \right)^2 = 865 \text{ amostras}$$

*Note o quanto que uma mesma pergunta de pesquisa pode originar tamanhos amostrais muito distintos a depender do foco principal dela e do conhecimento prévio que o pesquisador detém sobre a hipótese gerada.*

c) Ajuste do tamanho da amostra

As fórmulas para cálculo do tamanho amostral pressupõem populações de tamanho ilimitado. Em estudos em que a estimativa amostral inicial resulta em uma significativa fração (> 10%) do universo finito (população-alvo), as fórmulas podem ser ajustadas a partir de um fator de correção, minimizando a dimensão da amostra necessária por meio da Equação [3].

Equação [3]

$$n' = \frac{n}{1 + (n/N)}$$

Onde:

$n'$  = tamanho da amostra ajustado para população finita;

$n$  = tamanho amostral inicial;

$N$  = tamanho da população finita.

Exemplo 3:

*Retomando o exemplo dado na sessão sobre estimativas de proporções (Exemplo 2), obteve-se um tamanho amostral igual a 865 animais ao aplicar uma prevalência estimada de 10%, grau de confiança de 95% e precisão de 2%. Considerando uma população finita de 5.000 animais, esse cálculo pode ser ajustado seguindo a fórmula apresentada a seguir:*

$$n' = \frac{865}{1 + (865/5000)} = \frac{865}{1,17} = 738 \text{ amostras}$$

## 2.2.2. Comparação: variáveis qualitativas ou quantitativas

O cálculo amostral para comparação de variáveis entre grupos depende diretamente do tipo de variável a ser trabalhada, das diferenças esperadas entre estes grupos, do limite aceitável pelo pesquisador em relação aos erros tipos I e II em seu estudo e da parametrização dos resultados. O Erro tipo I ( $\alpha$ ) ocorre quando se rejeita a hipótese nula (que diz que não há diferenças entre os grupos) quando esta é verdadeira, já o erro tipo II ( $\beta$ ) ocorre quando a hipótese nula é aceita enquanto na realidade, ela é falsa. Comumente, são adotados valores de 5% e 20%, pra  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente.

Uma estratégia muito utilizada nesse contexto de comparação entre grupos para controlar possíveis efeitos enviesados ou sob muita interferência de um outro fator que não seja alvo direto da pesquisa é o pareamento amostral. Isso ocorre quando um mesmo indivíduo é observado em diferentes momentos (estudo longitudinal), ou é submetido a diferentes medidas que serão posteriormente comparadas entre si. Como exemplo, um estudo feito antes e depois de um tratamento no mesmo indivíduo ou como a comparação de um tratamento no membro inferior direito versus o esquerdo. Logo abaixo, apresentamos as considerações importantes para o cálculo do tamanho amostral necessário para comparar proporções ou médias, em contextos de grupos experimentais independentes.

### a) Comparação entre proporções

Para **comparar** proporções de uma variável entre populações independentes deve-se considerar a Equação [4] abaixo e:

- Proporção esperada para evento favorável no grupo A
- Proporção esperada para evento favorável no grupo B
- Nível de significância ( $\alpha$ ), que geralmente é estabelecido em 5% ou 1%
- Poder do teste ( $1-\beta$ ), ou seja, a probabilidade de encontrar um efeito para o qual o estudo se propôs a detectar. Normalmente, o poder é definido entre 80 e 99%. Quanto maior o poder do teste, maior será o tamanho da amostra

Equação [4]

$$n = \frac{[(P_A \times Q_A) + (P_B \times Q_B)] \times (Z_\alpha + Z_\beta)^2}{(P_A - P_B)^2}$$

Onde:

$n$  = tamanho da amostra por grupo;

$P_A$  = proporção esperada para evento favorável no grupo A (em notação decimal);

$Q_A$  = complementar de  $P_A$ , ou seja,  $1 - P_A$ ;

$P_B$  = proporção esperada para evento favorável no grupo B (em notação decimal);

$Q_B$  = complementar de  $P_B$ , ou seja,  $1 - P_B$ ;

$Z_\alpha$  = valor Z da curva normal padrão para o nível de significância  $\alpha$  (exemplo,  $Z = 1,96$  se  $\alpha = 5\%$  ou,  $Z = 2,58$  se  $\alpha = 1\%$ );

$Z_\beta$  = valor Z da curva normal padrão unicaudal para  $\beta$  (sendo  $\beta = 1 - \text{poder do teste}$ , ou seja, para poder de 80%,  $\beta = 0,2$ . Nesse caso,  $Z_\beta = 0,84$ );

Exemplo 4:

*Um determinado hospital veterinário recebe muitos pacientes com bronquite e pacientes com laringotraqueíte. Visto que a sintomatologia dessas doenças é muito parecida, um pesquisador deseja verificar se um sintoma em específico tem maior ocorrência em pacientes com bronquite que em pacientes com laringotraqueíte ou pacientes co-infectados (com bronquite e laringotraqueíte simultaneamente). Sabendo que a proporção de pacientes com bronquite apresentando tosse é de 80% e estimando que a proporção dos co-infectados com esse sintoma é de cerca de 70% enquanto aproximadamente 50% dos pacientes com laringotraqueíte apresentam tosse, qual deve ser o tamanho amostral para que o pesquisador comprove que a diferença na proporção de pacientes apresentando esse sintoma é estatisticamente significativa com confiança de 95% e poder de 90%?*

*Nesse caso, devemos aplicar a fórmula apresentada na Equação [4]. Temos os*

seguintes dados:

$$P_{Bronq} = 0,80$$

$$P_{Laringo} = 0,50$$

$$Q_{Bronq} = 1 - 0,80 = 0,20$$

$$Q_{Laringo} = 1 - 0,50 = 0,50$$

$$P_{Co-infectado} = 0,70$$

$$Z_{\alpha} = 1,96$$

$$Q_{Co-infectado} = 1 - 0,70 = 0,30$$

$$Z_{\beta} = 1,28, \text{ (sendo } \beta = 1 - 0,9 = 0,10)$$

Então, se quisermos comparar a proporção de pacientes com tosse entre os pacientes com bronquite e aqueles laringotraqueíte positivos, teremos:

$$\begin{aligned} n_1 &= \frac{[(0,8 \times 0,2) + (0,5 \times 0,5)] \times (1,96 + 1,28)^2}{(0,8 - 0,5)^2} \\ &= \frac{(0,16 + 0,25) \times (3,24)^2}{(0,3)^2} = \frac{4,304}{0,09} = 47,82 \end{aligned}$$

$\cong 48$  pacientes/grupo

Por outro lado, se a intenção for comparar a proporção de pacientes que apresentam tosse entre os pacientes co-infectados e aqueles laringotraqueíte positivos, teremos necessidade de um número muito maior de pacientes amostrados, uma vez que as proporções estimadas para esses dois grupos são muito próximas uma da outra (70% e 80%). Repare:

$$\begin{aligned} n_2 &= \frac{[(0,7 \times 0,3) + (0,8 \times 0,2)] \times (1,96 + 1,28)^2}{(0,7 - 0,8)^2} \\ &= \frac{(0,21 + 0,16) \times (3,24)^2}{(-0,1)^2} = \frac{3,884}{0,01} = 388,4 \end{aligned}$$

$\cong 389$  pacientes/grupo

b) Comparação entre médias

Para **comparar** médias de uma variável entre populações independentes deve-se considerar a Equação [5] abaixo e:

- Estimativa provisória da variância ( $s^2$ ) ou desvio-padrão (DP) da variável objeto do estudo.

- Decisão prévia sobre o tamanho da diferença que se deseja detectar, ou seja, a diferença biológica ou clinicamente relevante. Em outras palavras, é a diferença mínima das médias (entre os grupos) em que acreditamos ser importante (ou grande) o suficiente para não ser ignorada. **O pesquisador deve decidir previamente ao início do estudo qual a diferença mínima significativa entre os grupos será considerada clínica ou biologicamente significativa.** Quanto menor a diferença a ser detectada, maior será o tamanho da amostra.

- Nível de significância ( $\alpha$ ), que geralmente é estabelecido em 5% ou 1%.

- Poder do teste ( $1-\beta$ ), ou seja, a probabilidade de encontrar um efeito para o qual o estudo se propôs a detectar. Normalmente, o poder é definido entre 80 e 99%. Quanto maior o poder do teste, maior será o tamanho da amostra.

Diz-se que a estimativa sobre a variância é provisória visto que o pesquisador pode não ter condições de afirmar qual a variância dos seus dados previamente à execução do experimento. Do mesmo modo, para fins práticos de cálculo amostral, as variâncias (ou desvios-padrão) do grupo A e do grupo B podem ser consideradas como sendo iguais. Portanto, o numerador da fração na Equação [5] pode ser simplificado para a notação de  $2(DP)^2$ .

Ainda, quase a totalidade das ocasiões em que o objetivo é calcular o n amostral, o valor das médias para os grupos estudados não está disponível previamente ao início do estudo. Entretanto, a expressão " $\mu_A - \mu_B$ " pode ser substituída pela diferença a ser detectada (ou diferença mínima significativa).

Equação [5]

$$n = \frac{DP_A^2 + DP_B^2}{(\mu_A - \mu_B)^2} \times (Z_\alpha + Z_\beta)^2$$

Onde:

$n$  = tamanho da amostra por grupo;

$DP_A$  = Desvio padrão do grupo A (estimativa provisória);

$DP_B$  = Desvio padrão do grupo B (estimativa provisória);

$\mu_A$  = Média de A;

$\mu_B$  = Média de B;

$Z_\alpha$  = valor Z da curva normal padrão para o nível de significância  $\alpha$  (exemplo,  $Z = 1,96$  se  $\alpha = 5\%$  ou,  $Z = 2,58$  se  $\alpha = 1\%$ );

$Z_\beta$  = valor Z da curva normal padrão unicaudal para  $\beta$  (sendo  $\beta = 1 - \text{poder do teste}$ , ou seja, para poder de 80%,  $\beta = 0,2$ . Nesse caso,  $Z_\beta = 0,84$ );

Exemplo 5:

*“Um determinado experimento tem por objetivo verificar se há diferença na concentração sérica de citocina do tipo IL-10 em camundongos submetidos a diferentes tratamentos. Quantos camundongos serão necessários para que o pesquisador possa identificar uma diferença entre os tratamentos de pelo menos 20 pg/mL, com poder de 90%? O pesquisador deseja realizar, ao final, uma análise que considere um nível de significância de 5%.*

*Para substituir os valores de desvio-padrão na fórmula, o pesquisador consultou um artigo científico que mensurou a concentração de IL-10 no soro de camundongos indicando que para essa variável, o desvio-padrão mensurado foi de 13,4 pg/mL. Partindo do pressuposto de que a variabilidade na concentração sérica de IL-10 seja a mesma entre os grupos experimentais, portanto, os desvios-padrão são os mesmos para o grupo A e grupo B, ele deverá utilizar essa estimativa no cálculo do tamanho amostral. Assim, temos os seguintes dados:*

$$DP_A = DP_B = 13,4 \text{ pg/mL}$$

$$Z_\alpha = 1,96$$

$$\mu_A - \mu_B = 20 \text{ pg/mL}$$

$$Z_\beta = 1,28, \text{ (sendo } \beta = 1 - 0,9 = 0,10)$$

*Substituindo na Equação [5]:*

$$\begin{aligned} n &= \frac{(13,4)^2 + (13,4)^2}{(20)^2} \times (1,96 + 1,28)^2 = \frac{359,12}{400} \times (3,24)^2 \\ &= 0,897 \times 10,49 = 9,42 \cong 10 \text{ animais/grupo} \end{aligned}$$

*Portanto, devem ser utilizados 10 animais por grupo experimental.”*

### 2.2.3. Estudos ecológicos ou zoológicos de animais de vida livre

Estudos que propõem a captura e/ou coleta de animais de vida livre na natureza apresentam algumas limitações para o cálculo do  $n$  amostral, já que muitas vezes o universo amostral e sua distribuição local não são conhecidos, sendo em vários casos inclusive o objetivo do estudo (*e.g.* estudos que estimam o tamanho ou a densidade de uma população). Assim, essa peculiaridade pode causar dificuldades tanto de preenchimento do campo 9.4 do formulário da CEUA por parte do proponente, quanto de julgamento para o relator desta comissão. Desta forma, dividiremos os estudos em dois grupos e faremos algumas considerações com o intuito de auxiliar: (1) os estudos de captura e (2) estudos de coleta de animais de vida livre na natureza.

#### a) Estudos que envolvem a captura de animais de vida livre na natureza

Estudos com o objetivo de caracterizar e compreender as relações entre indivíduos de uma mesma população, das espécies com o ambiente, e as interações entre as espécies. É sempre importante o pesquisador estimar o tamanho populacional e conseqüentemente a densidade da espécie-alvo em uma ou mais localidades.



Para certos grupos, como os de pequenos mamíferos não voadores (roedores e marsupiais com massa  $\leq 3$  kg), já existem informações acerca de índices de sucesso de captura das armadilhas para a fitofisionomia ou para o bioma amostrado. Nesse caso é possível, baseado no esforço amostral, informar no projeto o n potencial do estudo. A fonte das estimativas do sucesso de captura deve ser referenciada com estudos publicados. Caso o estudo envolva a eutanásia de indivíduos como material testemunho e/ou para identificação taxonômica, o n amostral informado para CEUA deve ser igual ao número de indivíduos autorizados para coleta pela licença de pesquisa emitida pelo SISBIO/ICMBio ou órgão ambiental estadual ou distrital correspondente.

O n potencial pode ser estimado a partir da Equação [6] abaixo:

Equação [6]

$$N_{potencial} = sucesso\ de\ captura^1 \times esfor\ c\ amostral$$

<sup>1</sup> varia entre 0 e 1.

Exemplo 6:

*"No presente estudo amostrarei as populações do roedor *Necromys lasiurus* em quatro áreas de cerrado sentido restrito no Parque Nacional de Brasília. Para isso, instalarei 4 gradeados (grids) de 1,44 ha (120 X 120 m) cada, composto por 81 estações de captura, cada uma distante entre si 15 m e distribuídas em nove linhas paralelas, cada uma com nove estações de captura. Em cada uma dessas estações será disposta no solo uma armadilha do tipo Sherman. As armadilhas estarão abertas durante cinco noites consecutivas ao longo de quatro campanhas trimestrais. Desta forma, o esforço total de captura será de 6.480 armadilhas-noite (81 armadilhas/gradeado X 4 gradeados X 5 noites de captura X 4 campanhas de captura). Levando em conta que o sucesso de captura de pequenos mamíferos no Cerrado (bioma) varia de 2 a 5% e utilizando o valor médio (3,5%) desse parâmetro. Como resultado encontro que o **n potencial do meu estudo é de 226,8 indivíduos capturados.***

b) Estudos que envolvem a coleta de animais de vida livre na natureza

Estes estudos envolvem a coleta (eutanásia) obrigatória dos animais amostrados para a descrição de novas espécies, como registro da ocorrência de uma espécie e/ou a descrição da estrutura populacional em uma região. Esses animais coletados são depositados e mantidos em coleções científicas.

A justificativa do n amostral deve ser baseada e limitada pelo número de indivíduos autorizados pelo SISBIO/ICMBio ou órgão ambiental estadual ou distrital correspondente. Destaca-se que não existe uma padronização de quantos indivíduos devem ser coletados nesses estudos. Esse valor é dependente da biologia e o *status* de conservação da espécie. Fatores esses que são levados em conta pelos órgãos ambientais na liberação da licença de coleta. Neste caso, o número de espécimes deve estar de acordo com o solicitado na licença do SISBIO ou órgão ambiental responsável. Ainda, no caso de pesquisadores que possuem licença permanente de coleta concedida pelo ICMBio, por favor, informar o número potencial ou desejável de indivíduos que serão coletados por espécie em cada localidade amostrada. Cabe ressaltar que a aprovação da proposta pela CEUA/UnB não dispensa a aprovação do projeto nos órgãos ambientais responsáveis.

### 2.3. Correção do “n” considerando a expectativa de mortalidade

A Comissão de ética no Uso de Animais da UnB chama especial atenção para o cálculo do “n” amostral nos projetos de pesquisa em que há expectativa de mortalidade intrínseca ao processo experimental. A possível taxa de mortalidade de indivíduos experimentais anterior à aquisição dos dados desejados, comum e previsível, por exemplo, em alguns experimentos oncológicos ou que envolvem quadros epiléticos, deve ser considerada no planejamento experimental e no cálculo do “n” amostral, de modo a garantir o número mínimo de animais sobreviventes adequado para o alcance dos objetivos propostos pela pesquisa. **Ou seja, orienta-se realizar os cálculos do “n” amostral de modo que caso a taxa de mortalidade esperada seja efetivada, os animais sobreviventes sejam tantos quanto o mínimo necessário para o alcance do(s) objetivo(s) proposto(s).** Nesse sentido, é importante embasar a taxa de mortalidade esperada em literatura, estudo piloto ou dados prévios do grupo de pesquisa.

Ao utilizar a fórmula abaixo, num cenário em que a taxa de mortalidade se concretize, a quantidade necessária de sobreviventes será o “n” mínimo calculado para o mesmo poder de estudo almejado. Assim, ao fazer uso da Equação [7], o pesquisador aumenta a robustez do ensaio ao mesmo tempo que minimiza as chances de ao final do experimento obter dados insuficientes por uma taxa de mortalidade já previsível e relacionada ao processo experimental.

Equação [7]

$$n' = \frac{n}{(1 - M_e)}$$

Onde:

$n'$  = “n” amostral corrigido;

$n$  = “n” amostral calculado;

$M_e$  = mortalidade esperada em notação decimal (ex. :0,1);

Exemplo 7:

*“Determinado experimento tem por objetivo avaliar a atividade antitumoral e a modulação imunológica tumoral decorrente de melanoma em murinos. Para tanto o pesquisador se utilizou das técnicas de cálculo amostral abordadas nos tópicos anteriores deste documento e chegou ao número de 7,59 animais/grupo. Ao proceder com o arredondamento (sempre para o número inteiro acima), chegou a conclusão que deveria utilizar 8 animais/grupo. Ocorre que o modelo animal para esse ensaio considera uma linhagem murina suscetível ao melanoma e que embora biologicamente desejável (por aspectos que não vêm ao caso ao escopo deste texto) essa linhagem apresentou taxa de mortalidade de 40% em ensaios anteriores realizados por esse grupo de pesquisa. Prevendo essa mortalidade em seu plantel, o pesquisador propõe à CEUA acréscimo de 40% no “n” experimental. Portanto, 12 animais/grupo conforme cálculo abaixo:*

$$n' = 8 + (0,4 \times 8)$$

$$n' = 8 + 3,2 \rightarrow n' = 11,2 \therefore 12 \text{ animais}$$

Contudo, observe que nesse caso, na hipótese de a taxa de mortalidade de 40% se concretizar, restará ao pesquisador apenas 7 animais/grupo (40% de 12 animais = 4,8; o que implicará provavelmente na perda de 5 animais. restando somente 7 sobreviventes), desfalcando o experimento e fazendo com que a pesquisa seja conduzida com o “n” experimental abaixo do mínimo necessário calculado. Por outro lado, caso o pesquisador aplique a fórmula proposta na Equação [7] ao submeter a proposta, ele iniciaria o experimento com 14 animais. Nessa situação, caso os 40% de mortalidade previsto se concretizassem, a pesquisa seria conduzida com os 8 animais mínimos necessários calculados inicialmente. Veja:

$$n' = \frac{8}{(1 - 0,4)} = 13,33 \therefore 14 \text{ animais/grupo}$$

*Mortalidade efetiva de 40%:*

$$14 - (14 \times 0,4) \cong 14 - 6 = 8 \text{ animais sobreviventes por grupo}$$

### 3. Considerações Finais

O tamanho amostral final requerido à CEUA deve considerar a exclusão ou morte de animais no decorrer do experimento, sendo ajustado para a perda esperada. Essa perda deve ser justificada e apresentada ao final do cálculo do tamanho da amostra. Por exemplo, se o resultado do cálculo do n amostral seja 10 animais por grupo e o pesquisador estima que haverá cerca de 10% de perdas, esse percentual deve ser indicado no cálculo final, justificado com base em experimentos prévios ou literatura correlata e, por fim, o número solicitado de animais seria de 12 por grupo (aplicando a Equação [7]).

Ainda, há *softwares* gratuitos e páginas na internet que oferecem todos os cálculos aqui apresentados, dada a definição dos argumentos no contexto da pesquisa pelo pesquisador. Ressalta-se, assim, que a parte matemática do processo amostral é a de menor complexidade atualmente, **sendo a definição dos seus argumentos o fator mais decisivo e importante**. A suficiência amostral deve ser entendida como parte importante do planejamento metodológico do estudo, que precisa estar integrada à elaboração das hipóteses, desenho experimental, técnicas de amostragem, análise e interpretação dos dados para o sucesso da investigação.

### 4. Softwares livres de fácil acesso

- EPITOOLS: Sergeant, ESG, 2018. Epitools Epidemiological Calculators. Ausvet. Disponível em: <http://epitools.ausvet.com.au>.
- GPOWER: Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39, 175-191. Disponível em: <https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower.html>
- BIOSTAT – Disponível em: <https://www.mamiraua.org.br/downloads/programas/>
- EPIINFO – Disponível em: [https://www.cdc.gov/epiinfo/por/pt\\_index.html](https://www.cdc.gov/epiinfo/por/pt_index.html)

## 5. Referências

- Charan J., Kantharia N.D. (2013) How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacol Pharmacother.* v 4 (4): 303-6.
- Cochran, W.G. (1963) *Sampling techniques*. 2ed. New York: John Wiley and Sons.
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Instrução Normativa nº 27, D.O.U., seção 01, n. 205, p.10-14, 2015.
- Fontelles M.J., Simões M.G., Almeida J.C. et al. (2010) Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra. *Rev Paran Med.* v 24:57- 64.
- Miot, H.A. (2011) Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras,* v 10 (4):275-278.
- Weyne G.R.S. (2004) Determinação do tamanho da amostra em pesquisas experimentais na área de saúde. *Arq Med. ABC.* v 29 (2): 87-90.
- Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. (2020) Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLOS Biology* 18(7): e3000411. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>