

11-282  
261



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CONCENTRACION DE MERCURIO EN 4 ORGANOS DE TILAPIA Oreochromis sp. EN TRATAMIENTO A LARGO PLAZO CON TIMEROSAL (MERTHIOLATE)

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A :  
**ROSA MARIA VAZQUEZ HERNANDEZ**

### ASESORES:

M.V.Z. ANA AURO DE OCAMPO  
M.V.Z. RENE ROSILES MARTINEZ

MEXICO, D. F.

1982

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**CONCENTRACION DE MERCURIO EN 4 ORGANOS DE TILAPIA**  
**Oreochromis sp. EN TRATAMIENTO A LARGO PLAZO CON TIMERDSAL**  
**(MERTHIOLATE).**

**Tesis presentada ante la**  
**División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**  
**de la**

**Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Para la Obtención del Título de**  
**Médico Veterinario Zootecnista**

**Por**

**Rosa María Vázquez Hernández**

**Asesores.**

**M.V.Z Ana Auro de Ocampo.**  
**M.V.Z. René Rosiles Martínez.**

**México/ D.F**

**1992**

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	7
RESULTADOS.....	10
DISCUSION.....	12
LITERATURA CITADA.....	15
FIGURAS.....	20
CUADROS.....	21

## RESUMEN

VAZQUEZ HERNANDEZ ROSA MARIA. Concentración de Mercurio en 4 órganos de Tilapia *Oreochromis* sp. en tratamiento a largo plazo con Timerosal (Merthiolate).

(bajo la dirección de: M.V.Z. Ana Auro de Ocampo y M.V.Z. René Rosiles Martínez). Se seleccionaron 45 tilapias (*Oreochromis* sp.), éstos se agruparon en tres lotes de 15 peces cada uno. Las prácticas sanitarias se llevaron a cabo una vez al mes. la aplicación del Merthiolate fue en forma tópica. Posteriormente los peces se enjuagaron antes de ser reintroducidos a sus respectivos acuarios. La duración del tratamiento fue de 12 semanas, el primer lote se trato por cuatro días de aplicación cada diez días; el lote 2 ocho días de aplicación cada seis días; y al lote 3 como testigo se le aplico el vehiculo (eosina-alcohol-acetona) durante ocho días cada seis días; se sacrificaron 2 peces de cada lote dos días después de haber terminado el tratamiento en cada uno de los lotes y se obtuvieron muestras de hígado, branquias, riñones, músculo y agua, las muestras fueron preparadas y se cuantificó el mercurio por espectrofotometria de absorción atómica mediante la técnica de generación de hidruros. La concentración promedio de mercurio en las muestras de los peces fue como sigue. En el grupo tratado por 8 días tuvieron en músculo 6.365 ppm; branquias 1.723 ppm; agua 0.5 ppm;

higado 0.322 ppm; y riñón 0.058 ppm. En los órganos de los peces del lote tratado por 4 días la concentración de mercurio fue en branquias 3.142 ppm; músculo 2.745 ppm; higado 2.129 ppm; riñón 0.224 ppm y agua 0.16 ppm. La concentración de mercurio en los órganos fue directamente proporcional a la duración del tratamiento como lo confirman los análisis de Krushkall Wallis y U de Mann Whitney.

## INTRODUCCION

En México, la acuicultura va adquiriendo una mayor importancia debido a que, conforme la población aumenta, también se incrementa la demanda de alimentos. A esto se añade que las formas de producción "tradicionales" son insuficientes para cubrir la demanda, tanto en cantidad como en calidad. La piscicultura adquiere mayor relevancia en determinadas zonas donde ni la agricultura ni la ganadería pueden llegar a producir más alimentos, aportando proteínas de origen animal a un bajo precio, de tal manera que se coloca al alcance de mayores sectores de la población. Entre las especies que más se utilizan en las explotaciones dulce-acuícolas se encuentra la tilapia. Esta pertenece a la familia cichlidae, que son peces robustos de talla mediana, cuerpo comprimido, a menudo discoidal (1, 23). Los géneros comunmente explotados son *Petenia*, *Sarotherodon* y principalmente *Oreochromis*, conocidos como tilapias, mojarras y mojarras africanas. Las tilapias tienen una gran capacidad de adaptación a diferentes hábitats, con muchas variaciones de distintos parámetros físicos, químicos y biológicos, por lo que éstas especies pueden criarse perfectamente en estanques o acuarios grandes de laboratorios para investigación (23). Los estanques o acuarios artificiales no cuentan con corrientes de agua como los que existen en la naturaleza por lo que debe realizarse

un cambio en el agua en forma periódica. Así como lavarse y desinfectarlos perfectamente para evitar la aparición de enfermedades o su transmisión a los peces que vayan a ocupar dichos estanques. De la misma manera se requiere de la antisepsia de los peces y desinfección de el equipo en el manejo de granjas acuicolas. Existen ciertos antisépticos a base de mercurio orgánico, uno de los cuales es el Timerosal (Merthiolate), este se utiliza contra algunas enfermedades bacterianas y fungales (Saprolegnia), así como para cicatrizar heridas de la piel, úlceras y aletas rotas (4, 7, 13,). El Merthiolate (timerosal), ó Etil-mercurio-tiosalicilato sódico es un polvo cristalino de color crema (24, 27, 28), soluble en agua y alcohol (25, 27). La tintura de timerosal contiene un gramo de principio activo en 1000 ml de vehículo (11). Suele utilizarse en forma de tintura a concentraciones de 1:1000 para aplicar a la piel (7, 9, 16, 24, 25, 26, 27). Es un antiséptico mercurial orgánico, considerado cómo uno de los menos irritantes y menos tóxicos dentro de los de su grupo. Además es un fungicida eficaz en micosis cutáneas y un antiséptico más bacteriostático que los mercuriales inorgánicos (7, 14, 18, 24, 26,). El átomo de mercurio (Hg) que forma parte de la molécula, está fuertemente unido a el complejo orgánico, por lo que es rara la intoxicación aguda por Merthiolate (4, 14). Sin embargo, el tratamiento prolongado puede producir ciertas



intoxicaciones crónicas de los peces, que si no son letales, pueden concentrar el mercurio en la carne de los peces y ocasionar daños a la salud del hombre.

Debido, posiblemente a la acumulación progresiva e irreversible en el cuerpo como consecuencia de la aplicación repetida de pequeñas cantidades, puede ocasionar alteraciones a estos en estanques dedicados a la investigación alterando a su vez, los resultados de estos programas. El mercurio es un elemento no esencial, pero altamente tóxico para los organismos aún a bajas concentraciones. El mercurio y sus compuestos representan peligros potenciales debido a su acumulación en la cadena alimenticia (5). Ejemplos de intoxicaciones por consumo de pescado contaminado con mercurio son los que aparecieron en Minamata e Irak (4, 5, 6, 20). En estos ejemplos la contaminación de los peces por mercurio, ocurrió por las descargas de drenaje provenientes de las industrias. Estas descargas llevaban el mercurio al plancton y al ser consumido por los peces, el mercurio penetró en la cadena alimenticia (10). Por lo tanto, la posibilidad de que los peces acumulen mercurio al ser tratados con tintura de "Merthiolate" y sean fuente de contaminación para el hombre se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis.

**HIPOTESIS:**

La concentración de mercurio en hígado, branquias, riñones, y músculo en tilapia Oreochromis sp es directamente proporcional a la intensidad y duración del tratamiento con Merthiolate.

**OBJETIVOS:**

Conocer la concentración de mercurio en hígado, branquias, riñones y músculo de tilapias Oreochromis sp por el uso tópico de Merthiolate .

## MATERIAL Y METODOS:

Para la aplicación del timerosal a los peces, se seleccionaron 45 tilapias (Oreochromis sp.), provenientes del centro piscícola de el Rodeo, éstos se agruparon en tres lotes de 15 peces cada uno. Los acuarios tuvieron poblaciones con biomasa homogénea, tanto en talla como en peso. La capacidad de éstos acuarios es de 120 litros cada uno, y están provistos asimismo de dos bombas aereadoras que proporcionan dos litros por minuto.

Las prácticas sanitarias se llevaron a cabo una vez al mes, con cambio de agua con el método de decoloración por aereación.

La aplicación del Merthiolate\* fue en forma tópica con ayuda de un pincel de cerda fina. Inmediatamente los peces se trasladaron a una cubeta donde se les enjuago antes de ser reintroducidos a su respectivo acuario. El experimento duro 12 semanas, el primer lote se trato por cuatro días de aplicación cada diez días; el lote 2 ocho días de aplicación cada seis días; y al lote 3 como testigo se le aplico el vehiculo (eosina-alcohol-acetona) durante ocho días cada seis días; se sacrificaron 2 peces dos días después de haber terminado el tratamiento en cada uno de los lotes y se tomaron muestras de higado, branquias, riñones, músculo y agua.

La determinación de mercurio se realizó por espectrofotometria de absorción atómica mediante la técnica

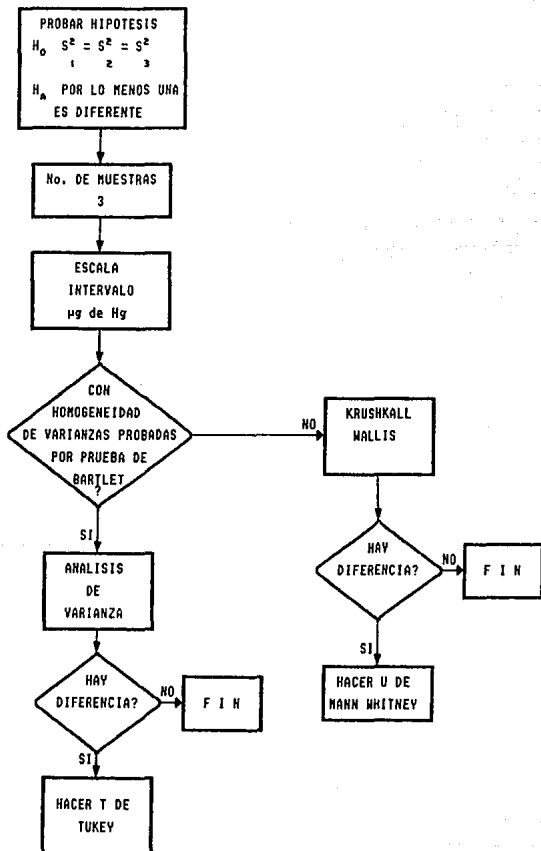
\*Merthiolate Rojo LILLY.

de generación de hidruros (8, 19, 21).

Los datos de las concentraciones de mercurio que se obtuvieron se homologaron por promedio y se graficaron para conocer sus diferencias y constatar por análisis estadísticos de Varianza, T de Tuckey, Kruskall Wallis y U de Mann Whitney mediante el programa de informática True epistat. (diagrama No. 1).

## DIAGRAMA 1

## ANALISIS ESTADISTICO DE PECES TRATADOS POR VIA CUTANEA CON MERCURIO ORGANICO (TIMEROSAL)



## RESULTADOS

En este capítulo se anotan los hallazgos del contenido de mercurio en Tilapias después del tratamiento tóxico con un compuesto que contenía mercurio orgánico. El promedio de la concentración de mercurio en los órganos de los peces se presentan en la Figura 1 y los cuadros 1, 2, 3, 4 y 5. Los datos fueron homologados por promedio aquí se observa lo siguiente: El órgano que tuvo el contenido mas alto de mercurio, fue el músculo del lote que se trato durante ocho días consecutivos (4.365ppm), las branquias de ese mismo lote presentaron 1.723 ppm, el agua, hígado y riñón en orden descendente, 0.5 ppm, 0.322 ppm y 0.058 ppm.

En órganos del lote que se trato por cuatro días consecutivos se observo lo siguiente: Las branquias fue el órgano con más alto contenido de mercurio (3.142 ppm), el músculo presento 2.745 ppm y el hígado, riñón y agua en orden descendente 2.129 ppm, 0.224 ppm y 0.16 ppm respectivamente.

Por los análisis estadísticos de Varianza, T de Tuckey, Krushkall Wallis y U de Mann Whitney en el cuadro 6 se observa lo siguiente: Se practico en los resultados de las muestras de agua Análisis de Varianza  $p < 0.05$ ; T de Tuckey para el lote 1 & 2  $p < 0.05$ , 1 & 3  $p > 0.05$ , 3 & 2  $p < 0.05$ ;

Kruskall Wallis con  $p < 0.05$ ; U de Mann Whitney para el lote 1 & 2  $p < 0.05$ , 1 & 3  $p > 0.05 < 0.10$ , 2 & 3  $p < 0.05$ .

Por los análisis estadísticos de Kruskall Wallis y U. de Mann Whitney practicado en muestras de órganos se observa lo siguiente: En muestras de branquias Kruskall Wallis con  $p < 0.05$ ; U de Mann Whitney para el lote 1 & 2  $p > 0.05 < 0.10$ , 1 & 3  $p < 0.05$ , 2 & 3  $p < 0.05$ .

En muestras de riñones se observo: Kruskall Wallis  $p > 0.05 < 0.10$ ; U de Mann Whitney para el lote 1 & 2  $p < 0.10$ , 1 & 3  $p < 0.10$ , 2 & 3  $p > 0.05 < 0.10$ .

En muestras de hígado se observo lo siguiente: Kruskall Wallis  $p < 0.05$  ; U de Mann Whitney 1 & 2  $p < 0.05$ , 1 & 3  $p < 0.05$ , 2 & 3  $p < 0.05$ .

En muestras de músculo se observo: Kruskall Wallis  $p < 0.05$ ; U de Mann Whitney 1 & 2  $p > 0.05 < 0.10$ , 1 & 3  $p < 0.05$ , 2 & 3  $p < 0.05$  (cuadro 6).

## DISCUSION

Es interesante resaltar que el músculo fue el órgano que mas acumulación de mercurio presento. Se menciona que el mercurio alcanza niveles mayores en músculo que los encontrados en otros órganos (3, 4, 12, 17, 22,). Esta frecuencia por si sola es de importancia, ya que el mercurio es uno de los metales cuyos residuos en la carne de peces provocan decomiso debido a su acción peligrosa para la salud. (2, 22). Los expertos encargados en dictar las normas alimentarias y las autoridades sanitarias han visto, tal peligro en la posibilidad de intoxicación de mercurio que han emitido prescripciones generales respecto al uso para consumo humano, del pescado que contenga tasas de mercurio superiores a 0.5 ppm en U.S.A. y Canadá; 1.0 ppm en Japón, Suecia y Finlandia (2) y México 0.2 ppm (15).

Lo que respecta al lote testigo se observa cierta cantidad de mercurio en agua (0.375 ppm) es factible, dado que en los animales se utilizo el mismo equipo y se deba a la contaminación accidental de mercurio en esta; En riñones y branquias se observo 0.111 ppm y 0.008 ppm respectivamente. Se notifica que todos los peces de estanques, lagos, arroyos y rios sin contaminar son inocuos. Asimismo todos los peces tienen una tasa de mercurio que nunca excede de 0.15 ppm (22).

Sin embargo en el caso del tratamiento del lote 1 & 2,



la cantidad de mercurio en branquias es baja, debido probablemente a que en este órgano el constante paso del agua favorece la dilución del mercurio.

Del lote 1 y 2 no hubo diferencia significativa en la cantidad de mercurio en músculo, cuando estos datos se homologaron por promedio. Ver figura 1.

El hecho de que el mercurio haya aparecido en las branquias se formulo que algo se desprendió de la piel y se suspendio en el agua. Y por este camino haya llegado a las branquias. El mercurio del músculo, higado y riñón probablemente haya llegado ya sea por absorción continua o por las branquias.

También se puede discutir el hecho de que el Merthiolate es de uso común como antiséptico en intervenciones quirúrgicas. Esto en aquellas personas donde la aplicación del Merthiolate sea en un área por tratamiento prolongado acarrea problemas de tipo nervioso ó renal. La presentación de sintomas significativos se registra con 0.2 ppm en sangre, 0.4 ppm en glóbulos sanguíneos, 50 ppm en pelo. (22).

La duración del tratamiento utilizada fue directamente proporcional a la cantidad de mercurio en tejidos como lo confirman los análisis de Krushkall Wallis y de U. de Mann Whitney. (cuadro 6).

El tratamiento tóxico con mercurio puede conducir a la acumulación del metal en el organismo del consumidor, siendo entonces este un efecto colateral adverso en estos tratamientos.

Además este sistema piloto sirve de ayuda para conocer el metabolismo del mercurio orgánico y poder llevar esta información con aplicación a circunstancias naturales.

## Literatura citada

- 1.- Aguilera, H. P. y Noriega, C. P.: La tilapia y su cultivo. *FONDEPESCA*, 1986.
- 2.- AMA Department of Drug: AMA Drug Evaluations. *Publishing Sciences Group Inc.* 2<sup>nd</sup> ed. Acton, Massachusetts, 1973.
- 3.- Baatrup, E. and Danscher, G.: Cytochemical Demonstration of Mercury Pools by Selenium. *Ecotox. & environ*; **14**: 129-141 (1987)
- 4.- Connel, J. J.: Control de la calidad del pescado. *Acribia*, Zaragoza España, 1988.
- 5.- Förstner, U. & Wiffmann G. T. W.: Metal Pollution in the aquatic environment. *Berlin Heidelberg*, New York, 1979.
- 6.- Geoffrey, M.: Pollution threat of heavy metals in aquatic environments. *Elsevier Applied Science*. New York New York, 1987.
- 7.- Gilman, G. A. y Goodman, L. S.: Bases farmacológicas de

- la terapéutica. 7a *Editorial Médica Panamericana*, México D. F., 1989.
- 8.- Giordano, R; Arata, P; Claralli, L; Rinaldis; Giani, M; Cicero, A.M and Costantini; S.: Heavy Metals in Mussels and Fish From Italian Coastal Waters. *Marine Pol Bull*; 1: 10-14 (1991).
- 9.- Goth, A.: *Farmacología Médica*. 4a ed. *Interamericana*, México D. F., 1969.
- 10.- Hamilton. E.I.: Dissolved and Particulate Mercury Levels in the Ionian and Aegean Seas. *Marine Pol Bull*; 3: 154-155 (1990).
- 11.- Helman, J.: *Farmacotecnia Teoría y Práctica* tomo VII. *C. E. C. S. A.* México, 1981.
- 12.- Hernández, H.F; Medina, J; Ansuátegui, J & Conesa, M .: Heavy metal concentrations in some marine organisms from the mediteranean Sea . *Scient.Mar*; 54: 113-129 (1990).
- 13.- Herwig, N.: Hand book of drugs and chemicals used in the treatment of fish diseases. *Charles E. Thomas*

*Publisher*, Springfield Illinois U. S. A., 1979.

- 14.- Humphreys, D. J.: toxicología Veterinaria. 3ª ed. *Mc Graw Hill*, España, 1990.
- 15.- Instituto Nacional del Consumidor. Reporte Especial. *Revista el Consumidor*; 151, 1-37. (1989).
- 16.- Lázaro, Ch. M. E.: Sustancias, desinfectantes y drogas de utilidad en las piscifactorías. *A. G. T. México*, 1985.
- 17.- Leah, T.R; Evans, J.S; Johnson, S.M and Collings, S .: Spatial Patterns in Accumulation of Mercury by fish from the Irish Sea. *Marine Pol Bull*; 4: 172-175 (1991).
- 18.- Mason, P.R & Fitzgerald, F.W .: Alkylmercury species in the equatorial Pacific. *Nature*, . 4: (1990).
- 19.- Monteiro, R.L and Lopes, D.H .: Mercury Content of Swordfish, *Xiphias gladius*, in Relation To Length, Weight, Age and Sex. *Marine Pol Bull*; 6: 293-296 (1990).

- 20.- Nilsson, A & Andersson, T.: Mercury in fish in Swedish Lakes. *Environ Pol*; 49. 145-162 (1988).
- 21.- Perkin Elmer.: Operator's Manual MHS-10 Mercury/Hydride System. *Norwalk Conneticut*. U. S. A. 1981.
- 22.- Reichenbach, K.H.H. : Enfermedades de los peces; 2a. ed, *Berlin Heidelberg*. New York, 1986.
- 23.- Salmerón, P. L. A. y Luna, R. A.: Los animales comestibles de importancia comercial en aguas mexicanas. *C. E. C. S. A.* México D. F. 1985.
- 24.- Salter W. T.: Tratado de farmacología aplicada tomo VI. *Interamericana*. México, 1953
- 25.- Semeca, H.: Biological basis of chemotherapy of infections and infestations. *F.A. Davis Company*, Philadelphia, U. S. A. 1971.
- 26.- Sumano, L. H. y Ocampo, C. L.: Farmacología Veterinaria. *Mc Graw Hill*, México D. F., 1990.
- 27.- The Merk Index. 11th edition, *Merk & Co*, Rahawy N. J. U. S. A., 1989.

28.- Wrightt, H. N. y Montog M.: Farmacología y Terapéutica.  
7a ed. Interamericana, México, 1960.

FIGURA 1

# CONTENIDO PROMEDIO DE Hg EN ORGANOS DE TILAPIA DURANTE EL TRATAMIENTO TOPICO CON TIMEROSAL

ORGANOS/AGUA





## CUADRO 1

CONCENTRACION DE MERCURIO ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
EN AGUA DE PECES TRATADOS POR  
APLICACION CUTANEA CON TIMEROSAL.

LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
0.05	0.875	0.375
0.2	0.375	0.375
0.2	0.5	0.0
0.15	0.375	0.0
0.2	0.375	0.0
4 DIAS	8 DIAS	TESTIGO

## CUADRO 2

CONCENTRACION DE MERCURIO (PPM)  
EN BRANQUIAS DE PECES TRATADOS POR  
APLICACION CUTANEA CON TIMEROSAL

LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
1.310	1.646	0.0
6.856	1.121	0.0
0.841	0.035	0.0
1.004	0.018	0.0
0.422	1.285	0.0
	0.122	0.0
	0.161	0.0
	6.008	0.0
	4.010	0.068
	0.469	
	4.317	
	2.486	

4 DIAS

8 DIAS

TESTIGO

## CUADRO 3

CONCENTRACION DE MERCURIO (PPM)  
EN HIGADO DE PECES TRATADOS POR  
APLICACION CUTANEA CON TIMEROSAL

LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
0.832	0.762	0.0
4.957	0.178	0.0
5.981	0.026	0.0
0.137	0.066	0.001
0.597	0.458	0.0
0.268	0.077	0.0
	1.635	0.0
	0.226	0.0
	0.332	0.0
	0.061	
	0.040	

4 DIAS

8 DIAS

TESTIGO

CUADRO 4

CONCENTRACION DE MERCURIO (ppm)  
EN MUSCULO DE PECES TRATADOS POR  
POR APLICACION CUTANEA CON  
TIMEROSAL.

LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
5.445	0.069	0.0
0.215	3.850	0.0
0.443	9.893	0.0
9.373	0.754	0.0
0.260	3.203	0.0
0.731	0.187	0.0
	0.583	0.0
	0.152	0.0
	0.784	0.0
	0.233	
	12.740	
	19.927	

4 DIAS

8 DIAS

TESTIGO

## CUADRO 5

CONCENTRACION DE MERCURIO (ppm)  
EN RINONES DE PECES TRATADOS  
POR APLICACION CUTANEA CON  
TIMEROSAL.

LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
0.066	0.010	0.0
0.361	0.129	0.110
0.133	0.109	0.005
0.005	0.012	0.0
0.740	0.016	0.043
0.041	0.059	0.0
	0.003	0.0
	0.181	0.733
	0.0	

4 DIAS

8 DIAS

TESTIGO

## CUADRO 6

RESULTADOS DE LOS ANALISIS ESTADISTICOS DE KRUSHKALL W.  
Y U. DE MANN W. PARA LOS DATOS DE MERCURIO (mcg/g).

	BRANQUIAS	RIÑONES	HIGADO	MUSCULO
	P	P	P	P
K. W.	0.00007*	0.1485	0.0001284*	0.00057*
U. M. W. 1&2	0.14	0.07092**	0.02963*	0.2713
1&3	0.00012*	0.06876**	0.00019*	0.01798*
2&3	0.0000062*	0.1617	0.0000411*	0.0000034*

RESULTADOS DE LOS ANALISIS ESTADISTICOS DE VARIANZA, T DE TUCKEY, KRUSHKALL W. Y U DE MANN PARA LOS DATOS DE MERCURIO (mcg/g) EN MUESTRAS DE AGUA.

	AGUA	P
ANOVA		0.007*
T DE TUCKEY	1 & 2	0.004*
	1 & 3	0.865
	3 & 2	0.006*
K. W.		0.0170*
U. M. W.	1 & 2	0.0021*
	1 & 3	0.4249
	2 & 3	0.0277*

alfa = 0.05\*; alfa = 0.10\*\*