

UNA APLICACION DEL ANALISIS DE VARIANZA DE MEDIDAS REPETIDAS EN UN EXPERIMENTO CON METALES PESADOS

Por

Ramón Giraldo H^{*1}. & Néstor Hernando Campos^{**2}

Resumen

Giraldo, R. & N. H. Campos: Una aplicación del análisis de varianza de medidas repetidas en un experimento con metales pesados. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **21**(81): 467-472, 1997. ISSN: 0370-3908.

Se presenta una revisión, dentro de un contexto ecológico, de conceptos relacionados con el análisis de varianza de medidas repetidas. Se discuten aspectos tales como el tipo de experimentos en los que la técnica es aplicable, las hipótesis de interés y su preferencia sobre otras técnicas tradicionales como regresión y análisis de varianza convencional. Como un ejemplo, la técnica fue aplicada a un experimento llevado a cabo en la Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia, en el cuál se midió la concentración de cadmio $\mu\text{g/g}$ en hojas de mangle negro *Avicennia germinans* en varias estaciones de monitoreo y a través de varios intervalos en la toma de muestras.

Palabras claves: Análisis de varianza, medidas repetidas, *Avicennia germinans*, metales pesados.

Abstract

A revision of some basic concepts related to the analysis of variance of repeated measures is presented within an ecological context. Topics such as the types of experiments in which the technique is applicable, the hypotheses of interest, and its preference over other traditional techniques such as regression and conventional analysis of variance, are discussed. As an example, the technique was successfully applied to an experiment carried out at Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia, in which the concentration of cadmium $\mu\text{g/g}$ in leaves of the black mangrove *Avicennia germinans* was measured in several monitoring stations and throughout several sampling intervals representing seasons.

Key words: Analysis of variance, measures repeated, *Avicennia germinans*, heavy metals.

* Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR, A. A. 1016, Santa Marta, Colombia. e-mail. rgiraldo@santamarta.cetcol.net.co

** Inst. Cien. Nat., Universidad Nacional de Colombia, c/o INVEMAR, A A. 1016 Santa Marta, Colombia. e-mail nhcampos@ciencias.ciencias.unal.edu.co ó nhcampos@santamarta.cetcol.net.co

Introducción

Hay muchas situaciones en las cuales los ecólogos toman medidas repetidas sobre el mismo individuo, la misma unidad experimental, o el mismo sitio de observación. Probablemente la situación más común se presenta algunas características son medidas en diferentes tiempos. Por ejemplo, se puede estar interesado en cómo el peso del cuerpo, tamaño de la planta, tamaño de la población, nivel de un nutriente o un contaminante, cambian en el tiempo para diferentes poblaciones, sitios o tratamientos experimentales. En todos estos casos hay un interés explícito en el patrón de respuesta sobre el tiempo (von Ende, 1993).

Los resultados de experimentos como los mencionados arriba son en muchas ocasiones, analizados mediante gráficos simples y en otras oportunidades por medio de análisis univariados de varianza (ANOVA) o de regresión. La presentación gráfica ignora información potencialmente disponible concerniente a la tendencia sobre el tiempo o a la comparación de las tendencias de los diferentes tratamientos. Así mismo cuando se aplican análisis de varianza o de regresión tradicionales (Sokal & Rohlf, 1981) a estos experimentos, es frecuente que se violen algunos supuestos fundamentales de los análisis univariados (Gurevitch & Chester, 1986). Las técnicas anteriores además de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, requieren que las medidas tomadas sean independientes (Moser *et al.*, 1990). La violación de este supuesto conduce a estimaciones incorrectas de los cuadrados medios y de los valores F y por consiguiente a pruebas de hipótesis no confiables (Underwood, 1981; Draper & Smith, 1981; Fox, 1984).

En experimentos como los mencionados en el primer párrafo, en los que se realizan medidas en diferentes períodos de tiempo sobre la misma unidad experimental (experimentos de medidas repetidas), se tendrán datos completamente correlacionados (Underwood, 1981). Diseños experimentales con este tipo de estructura, requieren del uso de algunos análisis de varianza "especiales", como el análisis de varianza multivariado (MANOVA) o el análisis de varianza de medidas repetidas (Hair *et al.*, 1995).

Materiales y Métodos

En este artículo se sigue paso a paso el algoritmo del análisis de varianza de medidas repetidas presentado en

Tabla 1. Medidas de concentración de cadmio $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$ en muestras de 2 tipos de hojas de *Avicennia germinans* en cada una de cuatro estaciones de monitoreo del sistema CGSM y una estación de Bahía de Chengue y para cuatro épocas climáticas. CC= Caño Clarín; CG= Caño Grande; CH=Bahía de Chengue; RJ=Rincón del Jaguey; RS=Río Sevilla. Cada medida es el promedio de 5 hojas.

Estación	Tipo Hoja	Epoca Climática			
		Seca Mayor	Seca Menor	Lluviosa Menor	Lluviosa Mayor
CC	Joven	9,26	2,51	0,93	0,57
CC	Vieja	10,56	1,32	0,95	0,48
CG	Joven	7,65	2,80	1,08	0,65
CG	Vieja	7,74	1,41	1,22	0,67
CH	Joven	6,05	2,38	1,05	0,45
CH	Vieja	9,86	1,88	8,45	0,59
RJ	Joven	6,78	1,95	1,07	0,65
RJ	Vieja	6,97	3,66	1,36	0,84
RS	Joven	12,84	2,50	1,72	0,43
RS	Vieja	6,93	2,16	1,00	0,62

Gurevitch & Chester (1986) en un experimento en el que se midió la concentración de cadmio $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$ en hojas del mangle negro *Avicennia germinans* recolectadas en parcelas ubicadas en cuatro estaciones de monitoreo del ecosistema lagunar estuarino Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM) y en una estación control ubicada en el ecosistema costero Bahía de Chengue, Costa Caribe colombiana (IGAC, 1973). Las mediciones fueron realizadas trimestralmente entre los meses de marzo y diciembre de 1993, cubriéndose así las cuatro épocas climáticas que rigen en la zona (seca mayor, lluviosa menor, seca menor, lluviosa mayor). En cada estación de observación se realizaron medidas en diez hojas (cinco jóvenes y cinco viejas) de *A. germinans* seleccionadas aleatoriamente de la parcela ubicada en cada una de ellas. Las cinco medidas de cada tipo de hoja fueron promediadas obteniéndose por consiguiente una sola medida para cada estación en cada época climática (Tabla 1). En este caso la unidad experimental es una parcela y las unidades de muestra son las cinco hojas seleccionadas aleatoriamente. Si bien las observaciones no son obtenidas en las mismas unidades de muestra (en cada época hay una extracción al azar de hojas), se considera que existe una estructura de dependencia o correlación entre las observaciones experimentales (promedio asignado a la parcela en cada época). Teniendo en cuenta lo anterior, se asumió que este diseño se ajusta a un experimento de medidas repetidas sin répli-

cas, con tres factores de interés: estación, tipo de hoja y época climática (factor de medidas repetidas).

En este caso existen cuatro hipótesis de interés: (1) Existen diferencias entre las estaciones con respecto a la concentración promedio de cadmio $\mu\text{g/g}_{p.s.}$ encontrada en hojas de *A. germinans*; (2) Existen diferencias entre las hojas jóvenes y las hojas viejas de *A. germinans* con respecto a la concentración promedio de cadmio $\mu\text{g/g}_{p.s.}$ encontrada en ellas; (3) La concentración de cadmio $\mu\text{g/g}_{p.s.}$ de las hojas de *A. germinans* cambia en el sistema a través de las diferentes épocas climáticas; (4) La tendencia mencionada en el numeral 3 difiere entre las estaciones.

La técnica empleada para probar las hipótesis anteriores, consiste en generar para cada unidad experimental (cada parcela) una suma ponderada de las mediciones obtenidas en cada época climática, realizando posteriormente con dichas sumas análisis de varianza convencionales (Sokal & Rohlf, 1981). En el caso de las dos primeras hipótesis los coeficientes ponderadores de cada medición son iguales a uno y en las dos restantes se requiere el uso de polinomios ortogonales para generar los coeficientes de ponderación (Steel & Torrie, 1985). Los polinomios ortogonales son utilizados en modelos lineales como un método de transformación de la matriz de diseño, de forma tal que se obtengan columnas independientes (Draper & Smith, 1981). Si el número de niveles del factor de medidas repetidas es n , se pueden realizar $(n-1)$ pruebas de hipótesis independientes (contrastes ortogonales), correspondientes al ajuste de polinomios de grado 1, 2, ..., $(n-1)$ (Graybill, 1961). Para el caso del experimento de estudio se cuenta con cuatro niveles en el factor de medidas repetidas, debido a lo cual, utilizando como ponderadores los coeficientes de la tabla 2, se generaron cuatro nuevas variables correspondientes a las sumas ponderadas (total y de tendencias

Tabla 2. Coeficientes para comparaciones ortogonales (independientes) con 4 tratamientos igualmente espaciados (épocas climáticas).

Grado del Polinomio	Contraste	Coeficientes del factor época climática			
		Seca Mayor	Seca Menor	Lluviosa Menor	Lluviosa Mayor
	Total	1	1	1	1
1	Lineal	-3	-1	1	3
2	Cuadrático	1	-1	-1	1
3	Cúbico	-1	3	-3	1

Tabla 3. Variables generadas como sumas ponderadas de los valores de cadmio $\mu\text{g/g}_{p.s.}$ observados en hojas jóvenes y viejas de *Avicennia germinans* en 5 estaciones para cuatro épocas climáticas utilizando como ponderadores los coeficientes de los polinomios ortogonales. Códigos de las estaciones como en la tabla 1.

Estación	Tipo Hoja	Total	Lineal	Cuadrático	Cúbico
CC	Joven	13,27	-27,65	6,39	-3,95
CC	Vieja	13,31	-30,61	8,77	-8,97
CG	Joven	12,18	-22,72	4,42	-1,84
CG	Vieja	11,04	-21,40	5,78	-6,50
CH	Joven	9,93	-18,13	3,07	-1,61
CH	Vieja	20,78	-21,24	0,12	-28,98
RJ	Joven	10,45	-19,27	4,41	-3,49
RJ	Vieja	12,83	-20,69	2,79	0,77
RS	Joven	17,49	-38,01	9,05	-10,07
RS	Vieja	10,71	-20,09	4,39	-2,83

lineal, cuadrática y cúbica) de las observaciones de cada parcela en cada una de las épocas climáticas (tabla 3). Con cada una de dichas variables se realizó un análisis de varianza en dos vías sin réplicas (tabla 4). El valor F asociado con la fuente estación en la tabla de análisis de varianza generada con la variable obtenida como una suma simple de las mediciones de las diferentes épocas, permitió probar la primera de las hipótesis arriba planteadas. La segunda hipótesis de interés fue probada mediante el cálculo del valor F para la fuente de variación conocida como gran media o media total (Gurevitch & Chester, 1986). Este valor se obtuvo como el cociente entre el cuadrado medio del contraste (cuadrado de la suma total de las sumas ponderadas dividido sobre el número total de éstas) y el cuadrado medio del error de este mismo. Cabe anotar que en este caso la suma de cuadrados del contraste y el cuadrado medio del contraste son iguales puesto que se cuenta con un sólo grado de libertad. El valor F asociado con la media total prueba cuando todas las medias son iguales a cero. Tradicionalmente ésto se omite de las tablas de análisis de varianza; sin embargo, en este caso probar la hipótesis de que todas las medias son iguales a cero, es equivalente a probar la hipótesis de tendencias (lineal, cuadrática, y cúbica) iguales a cero, lo que indicaría que los valores medidos no cambian durante el curso del experimento (Gurevitch & Chester, 1986). De otro lado, los valores

Tabla 4. Análisis de varianza de medidas repetidas para comparar las concentraciones de cadmio $\mu\text{g/g p.s.}$ en hojas de *Avicennia germinans* obtenidas en cuatro estaciones de la CGSM y una de Bahía de Chengue durante cuatro épocas climáticas.

a. Prueba de hipótesis para efectos entre estaciones (contraste total).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Estación	4	20.84	5.2119	0.253	0.8943
Tipo Hoja	1	2.86	2.8622	0.139	0.7321
Error	4	82.46	20.6165		
Total	9	106.17			

b. Análisis de tendencias (contraste lineal)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Media Total	1	5750.88	5750.88	145.7	0.0003
Estación	4	180.72	45.18	1.14	0.4494
Tipo Hoja	1	13.80	13.80	0.35	0.5919
Error	4				

c. Análisis de tendencias (contraste cuadrático)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Media Total	1	241.96	241.96	56.06	0.0001
Estación	4	46.29	11.57	2.68	0.1813
Tipo Hoja	1	3.01	3.01	0.69	0.4588
Error	4	7.26	4.31		

d. Análisis de tendencias (contraste cúbico)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Media Total	1	455.22	455.22	4.95	0.0902
Estación	4	217.79	54.44	0.59	0.6881
Tipo Hoja	1	65.28	65.28	0.71	0.4470
Error	4	368.01	92.00		

de F asociados con las fuentes estación y tipo de hoja en los contrastes lineal, cuadrático y cúbico permiten determinar si existe diferencia entre tendencias de cambio a través del tiempo de las cinco estaciones y de los dos tipos de hojas, respectivamente.

Resultados y Discusión

Los contenidos más altos de cadmio en *A. germinans*, se presentaron durante la primera toma de muestras en las cinco estaciones. El valor máximo (9.88 mg/g p.s.) fue medido en las estaciones del Río Sevilla. A partir de la segunda toma de muestras, después de una notoria disminución en los contenidos, éstos continuaron disminuyendo en las estaciones de la CGSM, hasta encontrar durante el mes de diciembre, los valores más bajos (0.52 mg/g p.s. en la estación del Rincón del Jagüey) (Fig. 1). A pesar de que el comportamiento del metal en la estación de la Bahía de Chengue fue similar al mostrado en

las estaciones de la CGSM, los contenidos presentaron un incremento notable en la tercera toma de muestras, contrariamente a lo observado en las estaciones restantes, en las cuales los contenidos continuaron bajando (**Campos y Gallo**, en prensa).

Los resultados del análisis de varianza obtenidos después de aplicar la metodología anteriormente expuesta al experimento de estudio (tabla 4), indican en primera instancia, de acuerdo con el nivel de significancia asociado a las fuentes estación y tipo de hoja en la tabla 4a ($\alpha > 10\%$), que la concentración promedio de cadmio mg/g p.s. encontrada en hojas de *A. germinans* no difiere significativamente entre las estaciones y los tipos de hojas considerados. Así mismo, con respecto a las restantes hipótesis de interés, es posible afirmar de acuerdo con el nivel de significancia asociado a la fuente media total ($\alpha < 10\%$) en los diferentes contrastes (tabla 4b, 4c, 4d), que existe un cambio significativo lineal y cuadrático en

la concentración de cadmio a través de las épocas climáticas y que este patrón de comportamiento no es significativamente diferente entre las estaciones o tipos de hojas. Esto último se deduce del nivel de significancia asociado con la fuente estación ($\alpha > 10\%$) para los contrastes lineal cuadrático y cúbico (tabla 4b, 4c, 4d). Las conclusiones anteriores son evidentes en el gráfico de concentración promedio de cadmio contra época (figura 1), en el que se observa que, con excepción de la estación Bahía de Chengue, la concentración de cadmio presenta una disminución a través de las épocas. La concentración más alta se encontró en la época seca mayor con valores promedios entre 6 y 10 $\mu\text{g Cd/g}_{\text{p.s}}$ y los valores mínimos se hallaron hacia el final del año en la época lluviosa mayor con concentraciones promedios cercanas a 1 $\mu\text{g Cd/g}_{\text{p.s}}$.

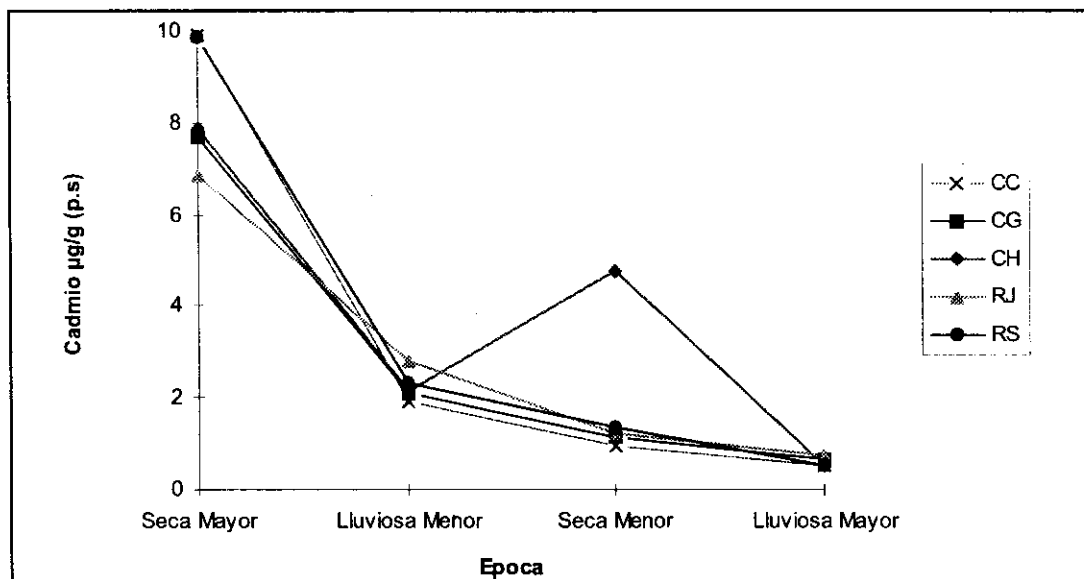
Resumiendo el análisis podemos afirmar que la concentración de cadmio en hojas de *A. germinans* presenta magnitudes similares en los sitios considerados. Además, dicha concentración varía significativamente con respecto a la época climática, dándose las diferencias más drásticas entre las épocas más extremas (seca mayor y lluviosa mayor). Esta diferencia podría ser explicable en el sistema CGSM, por el efecto de dilución que provoca la entrada de agua dulce en los meses de lluvias intensas, lo que a su vez logra disminuir la disponibilidad de metales al formar complejos con el material suspendido (Moore

& Ramamoorthy, 1984; Salomons et al., 1988; Silva et al., 1990). Así mismo en esta época se presentan incrementos en el pH que favorecen la adsorción de metales en el sedimento (Moore & Ramamoorthy, 1984), lo que explica el comportamiento del metal en la estación Bahía de Chengue en donde se esperaban valores de cadmio menores a los hallados en las estaciones de la CGSM, por estar ésta expuesta a una menor descarga de aguas lluvias. La concentración alta que se presentan en la estación RS durante el período seco mayor, refleja principalmente, los aportes de agua dulce provenientes de la Sierra Nevada de Santa Marta a través del Río Sevilla durante la época de lluvias precedentes. Durante la mezcla estuarina este metal puede precipitar con iones de fosfato o sulfitos o en ausencia de ellos puede estar disponible como Cd^{+2} y formar un complejo con material orgánico para poder ser transportado; no obstante en esta forma puede ser muy inestable (Moore y Ramamoorthy, 1984). Cuando se eleva la salinidad por la disminución de agua dulce en la CGSM a finales de diciembre (Campos, 1990), la forma bivalentes Cd^{+2} se hace presente (Moore y Ramamoorthy, 1984).

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR, al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología COLCIENCIAS

Figura 1. Concentración promedio de cadmio $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$ en hojas de *Avicennia germinans* en cuatro épocas climáticas para diferentes tratamientos (sitios de monitoreo). Los promedios fueron calculados en cada época y sitio combinando las mediciones de hojas jóvenes y viejas. Para los códigos de las estaciones ver la tabla 1.



y a la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo financiero brindado.

Bibliografía

- Campos, N.H.**, 1990. La contaminación por metales pesados en la Ciénaga Grande de Santa Marta, Caribe colombiano. *Caldasia* **16** (77): 231-244.
- _____ & **M. C. Gallo**. 1997. Contenidos de Cd, Cu y Zn en *Rhizophora mangle* y *Avicennia germinans* de la Ciénaga Grande de Santa Marta y Bahía de Chengue, costa caribe colombiana. *Rev. Acad. Col. Cienc. Exact. Nat.*, **21** (79) : 73 - 90.
- Draper, N. R. & H. Smith**. 1981. Applied regression analysis. Second edition. John Wiley and Sons, New York, 709 p.
- Ende, C. N. von**. 1993. Repeated measure analysis: Growth and other time-dependent measures 6: 113-137. En: S. M. Scheiner and J. Gurevitch, (E). Design and analysis of ecological experiments. Chapman and Hall, New York, 445 p.
- Fox, J.** 1984. Linear statistical models and related methods with applications to social research. John Wiley and Sons, New York, 449 p.
- Graybill, F.** 1961. An introduction to linear statistical models, Vol. I. McGraw-Hill, New York, 463 p.
- Gurevitch, J. & S. T. Chester**. 1986. Analysis of repeated measures experiments. *Ecology*, **67**(1): 251(55).
- Hair, J. F., R. E. Anderson, R. L. Tatham & W. C. Black**. 1995. Multivariate data analysis with readings, fourth edition. Prentice Hall, New Jersey, 745 p.
- IGAC**. 1973. Monografía del Departamento del Magdalena. Inst. Geogr. Agustín Codazzi, Bogotá, 162 p.
- Moore, J. W. & S. Ramamoorthy**. 1984. Heavy metals in natural waters. Springer-Verlag, New York, 223 p.
- Moser, E. B., A. M. Saxton & S. R. Pezeshki**. 1990. Repeated measures analysis of variance: Application to tree research. *Can. J. For. res.*, **20**: 524 (35).
- Salomons, W., H. Kerdijk, H. Van Pagee, R. Klomp & A. Schreur**. 1988. Behaviour and impact assessment of heavy metals in estuarine and coastal zones: 157-198. En: U. Seeliger, L. D. de Lacerda y S. R. Patrchineelam (E). Metal in coastal environments of Latin America, Springer-Verlag, Berlin, 297 p.
- Silva C. A. R., L. D. Lacerda & C. E. Rezende**. 1990. Metals reservoir in a red mangrove forest. *Biotropica*, **22** (4): 339 - 345.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf**. 1981. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research, second edition. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 859 p.
- Steel, R. G. D. & J. H. Torrie**. 1985. Bioestadística principios y procedimientos, segunda edición. McGraw-Hill, México, 622 p.
- Underwood, A. J.** 1981. Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **19**: 513-605.