

FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS PARA ANÁLISES DE DADOS PROVENIENTES DE BIOMONITORAMENTO

Adriano Sanches Melo^{1*} & Luiz Ubiratan Hepp^{2,3}

¹Departamento de Ecologia, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caixa Postal 15007, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caixa Postal 15007, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brasil.

³Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. Av. Sete de Setembro, 1621. Erechim, RS, 99700-000. Brasil.

E-mails: adrimelo@ufrgs.br, lhepp@uri.com.br

RESUMO

Além de índices multimétricos e modelos preditivos, diversos métodos estatísticos podem ser empregados em programas de biomonitoramento ou bioavaliação. Nesta revisão enfatizamos a necessidade de planejamento do estudo e abordamos diversos tópicos que podem ser úteis neste planejamento. Tais tópicos incluem a definição de objetivos e replicação adequada, simplificação do conjunto de dados (uso de gênero/família, dados presença/ausência, remoção de espécies raras), padronização do esforço amostral, transformação/padronização dos dados e breve descrição de análises estatísticas univariadas e multivariadas. A descrição das análises é feita com auxílio da identificação do número, tipo (resposta, explanatória) e natureza (categórica, quantitativa) das variáveis. Nas análises univariadas, são fornecidos exemplos que ilustram o uso de blocos e covariáveis bem como ressaltam a importância de interações entre variáveis explanatórias. Nas análises multivariadas são abordados os objetivos e lógicas de análise de ordenações, classificações e MANOVA baseadas em distância. **Palavras-chaves:** planejamento, resolução taxonômica, esforço amostral, testes estatísticos.

ABSTRACT

STATISTICAL TOOLS TO ANALYZE DATA FROM BIOMONITORING STUDIES. Apart from multimetric indices and predictive models, there are statistical methods that can be employed in biomonitoring or bioassessment studies. In this revision we emphasized the need for planning researches beforehand and discussed issues to this regard: clear definition of objectives, correct making of replications, simplification of data sets (through using genus/family, binary presence/absence results, ignoring uncommon species), standardization of sampling procedures, transformation and standardization of data. Moreover, we presented a brief overview of univariate and multivariate statistical analyses, based on the identification of traits of variables, like number, type (if response or predictor variable) and nature (categorical or quantitative variables). During the description of univariate analyses, we presented examples of the use of blocks and covariates and highlight the relevance of interacting explanatory variables. In the multivariate analyses, we considered the objectives and logics driving ordination and classification analyses and distance-based MANOVA.

Keywords: planning, taxonomic resolution, sampling effort, statistical tests.

INTRODUÇÃO

Programas de biomonitoramento são empregados atualmente por órgãos governamentais em diversas regiões do mundo (Norris 1995, Karr & Chu 1999). Tais programas podem fornecer informações sobre regiões que necessitam de maior fiscalização (ou proteção) e avaliar o quanto instrumentos de conservação (*e.g.*, leis, programas de recuperação ambiental) estão produzindo resultados positivos.

Existem diferentes abordagens na análise de dados de programas de biomonitoramento (Norris 1995, Karr & Chu 1999). Uma delas envolve o desenvolvimento e aplicação de índices multimétricos (Gerritsen 1995). Estes índices são compostos por diversas variáveis sensíveis a perturbações antrópicas e podem envolver riqueza de taxa, composição de espécies e categorias tróficas (Baptista *et al.* 2007). O intuito é (1) selecionar quais variáveis que melhor respondem a perturbações antrópicas, (2) dar valores

(scores) para intervalos destas variáveis, (3) somar os escores e (4) de acordo com a somatória de escores, categorizar o local em avaliação, por exemplo, em ruim, regular, bom e muito bom. Esta abordagem de índices multimétricos é bastante comum nos Estados Unidos (Norris 1995) e é descrita em maior detalhe na revisão sobre índices multimétricos deste volume (Oliveira *et al.* 2008, pp. 487-505, neste número). Na Grã Bretanha e Austrália, a abordagem principal consiste em produzir inicialmente modelos preditivos da composição de espécies para um dado local. Tais modelos são feitos com base nas características ambientais do local. A lista de táxons previstos (espécies/gênero/famílias) é então contrastada com a lista de fato observada na amostra do local (Norris 1995). A lógica é que locais impactados terão poucos dos táxons previstos para o local.

Além das duas abordagens citadas acima, pode-se empregar uma variedade de métodos estatísticos de forma complementar. Estes envolvem tanto análises univariadas quanto multivariadas e será o foco principal deste artigo. Visto a impossibilidade de descrever detalhadamente tais métodos por restrição de espaço e a ampla disponibilidade de livros sobre o assunto, nos deteremos na caracterização da (1) necessidade de planejamento e (2) visão geral de tipos de análises, tendo como linha mestra o número, natureza e tipo de variáveis.

Além das análises estatísticas, o planejamento do trabalho inclui diversas decisões sobre a obtenção dos dados. Por exemplo, qual a replicação correta do estudo? Será que precisamos identificar os indivíduos coletados em espécie (ou morfoespécie) ou apenas gênero (ou mesmo família) é suficiente? É necessário quantificar a densidade ou dados de incidência (dados de presença ou ausência) são suficientes? Devemos incluir espécies raras? Nas seções abaixo forneceremos subsídios que auxiliam a tomada de decisões para questões como estas.

PLANEJAMENTO DO TRABALHO

DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS E REPLICAÇÃO

Para que programas de biomonitoramento sejam otimizados e possam produzir resultados confiáveis, é fundamental um bom planejamento. O planejamento é o passo inicial para uma boa análise de dados, tanto de um programa de biomonitoramento quanto

de um trabalho ecológico. O não planejamento ou planejamento inadequado resulta, por exemplo, na obtenção desnecessária de dados. Existem diversas possibilidades de desenhos amostrais e análises estatísticas, o que tornam um tanto difícil a escolha da análise adequada ao propósito do estudo, particularmente quando não se planejou o estudo. Nestes casos, muitas vezes o que se pode fazer é tentar 'remediar' o trabalho com análises sofisticadas e, muitas vezes, difíceis e pouco efetivas para o propósito do trabalho. Com um bom planejamento, podemos escolher *a priori* uma análise estatística simples e efetiva.

Uma das decisões mais fundamentais que deve ser tomada durante o planejamento é a determinação da correta replicação do estudo. Como veremos a seguir, a replicação correta é dada de acordo com os objetivos do estudo e escala (espacial, temporal) em que o fenômeno em estudo se manifesta. Um exemplo pode auxiliar na compreensão de uma situação comum na literatura.

Imagine que você é o responsável pela realização de um estudo com intuito de testar a hipótese de que plantações de uma monocultura florestal (*e.g.*, *Pinus*) alteram a comunidade de algas (ou invertebrados, ou peixes) em relação a riachos com cobertura florestal nativa. Você poderia optar por duas estratégias:

- a) Você escolheria um riacho em floresta nativa e outro em plantação de *Pinus*. Em cada riacho você coletaria 10 unidades amostrais, duas vezes por mês, durante um ano. No total você coletaria: 2 riachos × 10 unidades amostrais × 24 períodos = 480 unidades amostrais.
- b) Você escolheria 24 riachos com floresta nativa e 24 em plantação de *Pinus*. Em cada riacho você coletaria 10 unidades amostrais numa mesma época. No total, você também coletaria 480 unidades amostrais.

Apesar de usarem o mesmo esforço amostral medido como quantidade de unidades amostrais, eles avaliam coisas diferentes. O primeiro estudo possui capacidade de extrapolação limitada. A rigor, apenas para o riacho estudado e não para o tipo de vegetação em que ele está inserido. Para melhor entender isto, imagine que o riacho escolhido como controle (área com floresta nativa) tenha sido alterado recentemente por uma perturbação por enchente ou que tenha

recebido, por um dia, efluentes contendo substâncias altamente tóxicas de uma indústria da região. Neste caso, a perturbação (natural ou antrópica) afetará não uma, mas várias (se não todas) as unidades amostrais coletadas nas 24 quinzenas. Assim, os resultados obtidos poderiam indicar que o riacho com plantio de *Pinus* possui diversidade semelhante ou mesmo maior que o controle. Embora isto possa ser verdade para os dois riachos estudados naquele momento, o estudo provê pouquíssima evidência de que o mesmo seja verdadeiro em outros locais. Note que o estudo deveria avaliar o efeito de uma monocultura florestal exótica sobre riachos em geral, e não sobre um riacho apenas. O fundamental aqui é que não temos replicações para o fator investigado: tipos de vegetação.

Com a segunda estratégia de coleta o problema apontado acima seria praticamente eliminado. Mesmo que um ou alguns dos riachos tenham sido afetados por fatores desconhecidos, ainda teríamos outros como réplicas. A probabilidade de que todos fossem afetados por problemas semelhantes seria, portanto, muito baixa. A segunda estratégia poderia ser criticada por coletar em apenas uma época, quando se sabe que as comunidades variam no tempo. Embora isto possa parecer relevante, note que não existe replicação temporal no primeiro estudo. Se quisermos fazer generalizações para épocas do ano (e.g. verão), devemos ter replicações ao longo de anos para as épocas (vários verões), algo factível para um programa de biomonitoramento governamental, mas de difícil execução em estudos mais pontuais.

Ainda sobre a questão temporal, poderíamos questionar sua necessidade: temos alguma evidência para desconfiar que o potencial efeito de *Pinus* seja diferente ao longo do ano? Ou seja, que ele tenha efeito negativo no verão, mas não no inverno? Se não temos tais expectativas, não teríamos razão para alocar tanto esforço no tempo em detrimento do espaço. Se tivermos, poderíamos considerar se isto aconteceria entre meses ou entre épocas. Esperamos que existam diferenças entre janeiro e fevereiro ou entre verão e inverno? Se esperamos diferenças entre verão (ou época chuvosa) e inverno (ou época seca), poderíamos alocar amostras apenas para estas duas épocas. No outono e primavera esperaríamos situações intermediárias. Note que mesmo alocando amostras em duas épocas do ano não poderíamos concluir de modo inequívoco que, considerando a detecção

de uma diferença, ela seja devido à época do ano. Ainda teríamos o problema de amostrar apenas um ano, que por algum motivo (seca prolongada) pode ter sido um tanto anômalo. Estudos em escala anual geralmente demandam, além de tempo, altos custos e o pesquisador deve avaliar se tal fator é importante para o objetivo do trabalho (Magnusson & Mourão 2003, p. 34). Uma sugestão é ter objetivos mais restritos (e.g. uma época do ano), mas ter replicação adequada para responder o objetivo proposto.

Um fator primordial a ser reconhecido no exemplo acima é a necessidade de replicar. Note que estamos avaliando o efeito da monocultura sobre a fauna de riachos. Nossa unidade de trabalho é o riacho. Não é útil, portanto, coletar um número excessivo de unidades amostrais (e.g. Surber para macroinvertebrados, alguns poucos cm² para diatomáceas) num mesmo riacho. Ainda continuaremos tendo apenas uma réplica. O importante é reconhecer em que escala o fenômeno que estamos estudando se manifesta. Note que caso haja um efeito negativo nos locais com *Pinus*, ele não se manifestará em apenas alguns cm² ou m², mas sim por todo o riacho. Por outro lado, podemos avaliar o efeito de rugosidade de pedras sobre a riqueza de diatomáceas num mesmo trecho de riacho. Se o efeito existir, este se manifestará na escala de pedras. Cada pedra será, portanto, uma réplica. No contexto de biomonitoramento em ambientes aquáticos, geralmente a escala de interesse é o riacho ou lago. Infelizmente, trabalhos sem replicação adequada são frequentes na literatura. Hulbert (1984) avaliou diversos trabalhos na área de Ecologia e concluiu que cerca de metade daqueles que empregaram inferência estatística não usaram replicação adequada. Ele cunhou o termo ‘pseudoreplicação’ para designar estudos em que os autores usam subamostras como réplicas (nosso exemplo [a] acima) ou que as réplicas não são completamente independentes. Apesar do grande impacto do trabalho de Hulbert (1984), muitos trabalhos ainda hoje envolvem pseudoreplicação. Veja outros exemplos de pseudoreplicação em Magnusson & Mourão (2003, p. 33).

Veremos ainda neste artigo algumas análises estatísticas univariadas tradicionais (Análise de Variância, Regressão Linear) que podem ser aplicadas em estudos de biomonitoramento. Estas análises possuem três pressupostos (1) os dados são normais, (2) existe homogeneidade de variâncias e (3) as observações

são independentes. Dados biológicos frequentemente não atendem aos pressupostos 1 e 2. Entretanto, eles geralmente podem ser atendidos transformando-se os dados ou usando testes de aleatorização, assuntos que veremos depois. É importante ressaltar aqui que falta de independência geralmente é falta de replicação correta, também considerada por Hurlbert (1984) como pseudoreplicação. Ainda, diferente dos pressupostos 1 e 2, na maioria das situações não existem métodos simples para corrigir a falta de independência após a coleta de dados. Não resta dúvida de que o melhor é planejar o estudo com replicação correta (Underwood 1997, p. 159).

Quando dizemos que os dados são dependentes, estamos querendo dizer que quando se sabe um valor, tem-se alguma informação da magnitude do próximo valor. Se uma unidade amostral do único riacho de estudo drenando a monocultura de *Pinus* do exemplo (a) acima tiver muitas células de uma espécie de diatomácea, podemos prever com alguma confiabilidade que também encontraremos muitas células dessa espécie na segunda unidade amostral. Note que antes de coletarmos a primeira unidade amostral não sabíamos nada sobre a diatomácea, nem sequer se ela existia no riacho. A situação é diferente na coleta da segunda unidade amostral. Veja descrição de várias situações envolvendo falta de independência em Underwood (1997, p.158).

ESFORÇO AMOSTRAL: QUANTO COLETAR?

Quando coletamos uma amostra de uma população sempre devemos nos perguntar: caso eu colete outra, do mesmo tamanho e nas mesmas condições, os dados serão parecidos? Eles muito raramente serão idênticos. A questão é saber se as conclusões que obtemos de um dos conjuntos de dados seriam muito diferentes do segundo. Se forem, nossa amostragem não foi suficientemente grande. Com amostras pequenas, corremos grandes riscos de os dados não serem representativos da população que estamos amostrando.

Se amostras pequenas podem não representar adequadamente o universo amostral, amostras muito grandes podem significar desperdício de dinheiro. A estratégia ideal para se determinar o número de unidades amostrais ou número de indivíduos consistiria em realizar um estudo piloto em que se coletaria 3-5 vezes mais do que o necessário em um local.

Por reamostragem das unidades amostrais podemos formar amostras de diferentes tamanhos e ver o quanto tais amostras produzem as mesmas conclusões (Pillar 2004).

Um aspecto importante a ser levado em consideração no planejamento das coletas é o quanto um local possivelmente impactado difere dos locais controle. No caso de haver indícios da existência de uma grande diferença (baseados, por exemplo, em dados físico-químicos), não seria necessário uma amostragem muito intensa. Poucas unidades amostrais (ou indivíduos) seriam suficientes. Por outro lado, muitas unidades amostrais (ou indivíduos) devem ser necessários em casos em que a possível diferença entre os locais é pequena.

Apesar da recomendação genérica de se ajustar o esforço amostral ao tamanho da diferença entre locais controles e impactados, na prática muitos programas possuem protocolos com esforço amostral previamente estipulado. Por exemplo, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos estipula que para avaliações rápidas em riachos, com identificações no campo, 100 indivíduos de macroinvertebrados seriam suficientes (Plafkin *et al.* 1989). Para uma avaliação mais razoável, o sugerido é 200-300 indivíduos de macroinvertebrados. Carter & Resh (2001), por meio de questionários, avaliaram métodos usados em agências estaduais e encontraram que cerca de 50% dos programas envolvendo macroinvertebrados identificam 100 indivíduos e que cerca de 25% identificam 300 indivíduos. No caso de peixes, Plafkin *et al.* (1989) recomendam amostragem em trechos de 100-200 metros em riachos pequenos e 500-1000 metros em rios, que deveriam ser suficientes para propiciar a coleta de 100-1000 indivíduos.

PADRONIZAÇÃO DO ESFORÇO AMOSTRAL: ÁREA OU NÚMERO DE INDIVÍDUOS?

Por tradição, a maioria dos estudos ecológicos padroniza o esforço amostral por número de unidades amostrais, tais como armadilhas, dragas, Surber, substratos artificiais e horas-rede. Uma das vantagens de padronizar o esforço de amostragem por unidades amostrais é que muitos métodos produzem uma estimativa de densidade (*e.g.*, indivíduos por m² ou por m³) (Courtemanch 1996). Embora valores de densidade altos em ambientes aquáticos continentais

possam indicar, por exemplo, eutrofização, nem sempre eles são tão úteis quanto medidas de diversidade e de composição de espécies. Em situações naturais, sem impactos antrópicos, a densidade dos organismos varia muito de local para local e de um momento para outro. Muitas vezes tais variações são estocásticas, sem causa aparente (Ives & Klopfer 1997). Um segundo problema em padronizar o esforço por área é que a riqueza de espécies é muito dependente do número de indivíduos amostrados (Gotelli & Colwell 2001, Magurran 2004). A rigor, mais dependente do que em relação a área. Imagine dois locais com a mesma riqueza e composição de espécies. No primeiro local as espécies são comuns e estão distribuídas ao acaso no espaço. No segundo elas são raras (baixa densidade) e com distribuição agregada. No primeiro caso, poucas unidades amostrais serão suficientes para estimar a riqueza e composição de espécies. No segundo caso, cada unidade amostral obterá apenas uma pequena fração da comunidade. Um dado esforço amostral, em unidades amostrais, pode ser suficiente para o primeiro local, mas inadequado para o segundo. A consequência é que a amostragem indicaria uma fauna mais depauperada no segundo local, quando na verdade, os locais são idênticos em termos de composição de espécies e abundância relativa. Por outro lado, embora a padronização pelo número de indivíduos geralmente não inclua informações sobre densidade, a amostragem produz dados mais confiáveis para o estudo de riqueza e composição de espécies. Acumulamos espécies com indivíduos coletados e não com área ou volume amostrado. Programas de biomonitoramento nos Estados Unidos tendem a padronizar o esforço em relação a número de indivíduos (Carter & Resh 2001).

No caso das amostragens não terem sido feitas com a mesma intensidade, a padronização para indivíduos ainda pode ser feita usando a técnica de rarefação (Gotelli & Colwell 2001). A idéia é estimar quantas espécies deveriam ser coletadas caso a amostragem incluísse um número menor de indivíduos. Caso tenhamos coletados 80 indivíduos e 16 espécies, podemos interpolar usando a técnica de rarefação e descobrir uma estimativa de quantas espécies deveríamos coletar caso tivéssemos obtido, por exemplo, apenas 48 indivíduos. A estimativa por rarefação pode ser obtida por fórmulas (ver Magurran 2004), embora uma aproximação possa ser feita por

reamostragem. Imagine que as 16 espécies citadas acima sejam bolas de cores diferentes. O número de bolas de cada cor corresponde à abundância de cada espécie na amostra total (80). Imagine agora que você sorteie ao acaso 48 bolas do total de 80. Quantas cores (espécies) você obteve? Guarde o número e repita o sorteio muitas vezes. Registre o número de cores em cada sorteio e depois obtenha uma média. Esta média seria uma estimativa para o número de espécies esperado numa subamostra com 48 indivíduos.

A padronização dos esforços de amostragem é feito aplicando-se a técnica de rarefação sobre as amostras maiores e obtendo as estimativas de riqueza caso as amostras tivessem o número de indivíduos da amostra menor. No caso de ter cinco amostras com tamanhos de 98, 150, 67, 236 e 300 indivíduos, a rarefação seria aplicada sobre as quatro amostras maiores obtendo-se uma estimativa para cada uma caso tivessem apenas 67 indivíduos. Talvez o maior problema da rarefação é a perda de informação nas amostras maiores, particularmente quando o tamanho para o qual se está aplicando a rarefação (a amostra menor) for muito menor do que o das amostras maiores. Uma alternativa seria extrapolar e não interpolar. Algumas avaliações de métodos para extrapolação indicam que algumas técnicas são bastante confiáveis caso a extrapolação seja feita dentro de limites razoáveis (até o dobro do tamanho amostral atual) (Keating *et al.* 1998, Melo *et al.* 2003). Apesar das avaliações indicando a confiabilidade de extrapolações, tais técnicas ainda são muito raramente usadas.

CONTAGEM DOS ORGANISMOS: QUANTITATIVO OU QUALITATIVO?

Uma determinada espécie pode ocorrer tanto em locais preservados quanto em locais impactados. Usando apenas dados de presença ou ausência (qualitativos), a espécie não será muito útil em detectar uma diferença entre os tipos de ambientes. Por outro lado, usando dados de abundância, podemos notar que uma espécie sensível à poluição é abundante num local preservado e rara num local impactado. Da mesma forma, uma espécie tolerante pode ser rara num local preservado, mas abundante num local impactado. De maneira geral, poderíamos concluir que dados quantitativos são mais refinados e, portanto, mais poderosos na detecção de um impacto.

Entretanto, dados quantitativos são mais custosos, pois exigem a contagem de indivíduos. Portanto, devemos fazer um balanço entre custos e benefícios para decidir que tipo de dados coletar. No caso de situações em que se esperam grandes diferenças entre locais controle e locais impactados, talvez dados qualitativos sejam suficientes. Se suspeitarmos que as potenciais diferenças entre os ambientes são pequenas, dados quantitativos serão mais adequados.

Embora de cunho mais ecológico, o trabalho de Melo (2005) ilustra a situação. O estudo avaliou se dados simplificados em termos de resolução numérica (quantitativos vs. qualitativos) e resolução taxonômica (ver abaixo) ainda seriam capazes de detectar uma determinada diferença ecológica. Numa primeira avaliação, cinco riachos diferindo em tamanho foram comparados entre si. Tanto dados quantitativos quanto qualitativos foram suficientes na detecção de diferenças entre os riachos usando uma análise multivariada (ANOSIM: “Análise de Similaridade”, descrita abaixo). Entretanto, numa segunda avaliação onde as diferenças não eram tão grandes, contrastando épocas do ano (verão vs. inverno) dentro de cada riacho, apenas dados quantitativos detectaram uma diferença.

IDENTIFICAÇÃO DOS ORGANISMOS: QUAL RESOLUÇÃO TAXONÔMICA USAR?

Em programas de biomonitoramento que utilizam organismos pequenos e muito diversificados, tais como macroinvertebrados e algas, a identificação é uma das etapas mais demoradas e caras. Neste sentido, diversos trabalhos na literatura avaliaram a possibilidade de se classificar indivíduos em categorias taxonômicas superiores, tais como gênero, tribo ou família. No caso de macroinvertebrados bentônicos, uma pessoa treinada pode fazer identificações em família a olho nu ainda no campo (Plafkin *et al.* 1989). Tal procedimento resulta em grande economia de recursos, proporcionando a ampliação (*e.g.*, espacial) do programa de biomonitoramento. Além dos custos, um segundo problema contornado pelo uso de categorias taxonômicas amplas, particularmente em regiões tropicais, é o pobre conhecimento taxonômico das espécies e consequente falta de chaves de identificação (Kozlowski 2008). Apesar das aparentes vantagens de se usar grandes grupos taxonômicos, a

questão relevante aqui é: eles são efetivos em detectar locais impactados?

Em locais extremamente impactados, pode-se encontrar uma redução drástica da riqueza de espécies em relação ao que se poderia esperar de local semelhante sem impacto (controle). Ainda, as poucas espécies presentes, resistentes a poluição, provavelmente não serão muito comuns em locais comparáveis não impactados. Nestes casos, é provável que a identificação dos indivíduos em categorias taxonômicas amplas, como ordem ou classe, sejam suficientes para se detectar uma diferença. No caso extremo, o local impactado pode não ter nenhum organismo e, portanto, identificação dos organismos no local controle em reino pode ser suficiente! Por outro lado, a detecção de impactos em locais com perturbações antrópicas com baixa intensidade deve exigir uma identificação detalhada dos organismos, talvez em gênero ou espécie (Lenat & Resh 2001). Assim, o detalhamento das identificações deve ser inversamente proporcional à intensidade do potencial impacto. A tomada da decisão sobre a resolução taxonômica a ser adotada pode ser auxiliada pela avaliação preliminar da intensidade de impacto com o uso de variáveis abióticas.

Vários trabalhos com macroinvertebrados em riachos têm indicado que classificações em família são suficientes em programas de biomonitoramento (Furse *et al.* 1984, Bowman & Bailey 1997, Bailey *et al.* 2001, Arscott *et al.* 2006, Chessman *et al.* 2007). Por exemplo, Marchant *et al.* (1995) demonstraram que identificações em gênero e família foram suficientes num estudo ecológico envolvendo grandes extensões geográficas na Austrália. Hill *et al.* (2001) avaliaram o uso de espécies ou gêneros de diatomáceas na detecção de perturbações antrópicas e concluíram que as duas resoluções taxonômicas são bastante correlacionadas entre si e produzem relações semelhantes com variáveis ambientais. No Brasil, um teste bastante conservador (pouca diferença entre os tratamentos) foi feito com macroinvertebrados em riachos não impactados (Melo 2005). Neste estudo, avaliou-se a capacidade de detectar diferenças entre grupos usando uma análise multivariada (ANOSIM) com dados de morfoespécies e de famílias. Os grupos de amostras eram de um mesmo riacho e diferiam quanto à época do ano em que foram coletadas (inverno e verão). Análises exploratórias prévias indicaram que

a diferença entre as duas épocas do ano era pequena. Apesar disto, os dados de famílias foram suficientes para se detectar a diferença. Podemos, portanto, extrapolar os resultados para casos onde as diferenças entre os grupos de amostras são potencialmente maiores, como no caso de comparações entre locais controle e locais potencialmente impactados.

Um outro tipo de simplificação do processo de classificação taxonômica é o uso de apenas alguns grupos de organismos. No estudo de Melo (2005), o uso de morfoespécies de EPT (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera) foram suficientes para a detecção da diferença entre épocas do ano. Uma outra possibilidade, a ser avaliada formalmente, é o uso de espécies (ou morfoespécies) de Chironomidae (Diptera) apenas. A família é bastante diversificada em termos de espécies e tolerâncias a impactos e pode produzir resultados semelhantes àqueles produzidos por todas espécies da comunidade.

Na seção anterior havíamos visto que no estudo de Melo (2005) dados qualitativos (presença e ausência) não foram suficientes para detectar diferenças entre épocas do ano. Por outro lado, dados quantitativos com organismos classificados em famílias ou apenas morfoespécies de EPT foram suficientes na detecção de diferença entre as épocas. Os resultados indicam que as espécies (ou famílias) estão em todas as épocas, mas com abundâncias distintas. No contexto de biomonitoramento, um exemplo brasileiro onde número de famílias forneceu informação redundante ao total de espécies é dado em Baptista *et al.* (2007).

INCLUSÃO DE TAXONS RAROS

A definição de espécies raras no contexto de biomonitoramento é operacional e, em geral, é baseada numa baixa porcentagem da abundância total (*e.g.*, <0,5% do total de indivíduos) ou em baixa frequência de ocorrência nos locais de estudo (*e.g.*, <5% dos sítios amostrados). Na literatura sobre biomonitoramento encontramos argumentos a favor e contra a inclusão de espécies raras na análise de dados. Neste debate, destacam-se os trabalhos de Cao *et al.* (1998) que defendem a inclusão de espécies raras e de Marchant (1999) que defendem a exclusão de espécies raras. Uma breve descrição deste debate deve elucidar os prós e contras de cada abordagem.

Geralmente, em comunidades pouco perturbadas encontramos uma grande proporção de espécies raras (Fisher *et al.* 1943, Melo 2004, Resh *et al.* 2005, Arcscott *et al.* 2006). Cao *et al.* (1998) mostram que em sítios muito degradados, com baixa riqueza de espécies, existem proporcionalmente poucas espécies raras quando comparados a sítios não impactados. Quando as espécies raras são excluídas, remove-se proporcionalmente mais espécies dos locais não impactados. Conforme o critério para definição de espécies raras torna-se amplo, pode-se chegar a conclusão que sítios degradados possuem a mesma riqueza de espécies que locais controle. Em outras palavras, Cao *et al.* (1998) argumentam que o poder de distinguir um impacto antrópico reside justamente nas espécies raras. A importância deste argumento é que muitas técnicas de análise em biomonitoramento dependem direta ou indiretamente da riqueza de espécies (*e.g.*, EPT taxa). No artigo de Cao *et al.* (1998), as análises são feitas tendo como métrica de bioavaliação a riqueza de espécies. As análises são bastante convincentes e realmente indicam a necessidade de se reter espécies raras em métricas fortemente dependentes em riqueza de espécies.

Embora com análises focadas apenas em riqueza de espécies, Cao *et al.* (1998) estendem as implicações do seu encontro para estudos envolvendo análises multivariadas, baseadas não só no número de espécies, mas também na composição. Tal sugestão vai contra a prática comum de se excluir espécies raras em análises de ordenação e classificação (*e.g.*, Norris 1995, p. 446). Marchant (1999) rebate a sugestão de retenção de espécies raras em análises multivariadas e argumenta que existe muita redundância num conjunto de dados. Portanto, a exclusão de espécies raras não afetaria o desempenho da análise na detecção de grupos ou gradientes. Da mesma forma, Marchant (1999) argumenta que outras simplificações do conjunto de dados, tais como uso de categorias taxonômicas amplas e dados de presença/ausência, são suficientes na detecção de gradientes ou grupos de amostras.

Cao *et al.* (2001) revê o uso de espécies raras em análises multivariadas e conclui que espécies raras podem não ser importantes na detecção de grupos de amostras bem definidos ou gradientes fortes. Nestes casos, análises com espécies comuns apenas ou com todas espécies produziriam os mesmos resultados. Entretanto, os autores sugerem a necessidade de se

incluir espécies raras para detecção de diferenças menores. Neste sentido, Cao *et al.* (2001) argumentam que o sistema de biomonitoramento usado na Austrália, baseado em modelos preditivos (Baptista 2008, pp. 425-441, neste número) e que possui critério muito rigoroso para inclusão de espécies, poderia ter pouco poder na detecção de impactos. Marchant (2002) rebate a crítica e mostra que a inclusão de mais espécies não afetaria a conclusão sobre a classificação de alguns sítios usados no estudo. Marchant (2002) argumenta que a inclusão de espécies mais raras aumenta muito pouco o retorno em termos de poder de detecção e conclui portanto pela não inclusão de espécies raras.

Embora não possamos tirar conclusões generalizadas sobre a inclusão ou não de espécies raras, o debate de Cao *et al.* (1998) e Marchant (1999) fornece indícios que (1) deve-se reter espécies raras em métricas fortemente dependentes em riqueza de espécies, (2) espécies raras não são fundamentais em análises multivariadas, ao menos em situações onde os grupos ou gradientes em análise são bem definidos (veja Arscott *et al.* 2006).

ANÁLISE DOS DADOS: TIPOS DE VARIÁVEIS, REPLICAÇÃO E A ESCOLHA DO TESTE

A definição do teste estatístico a ser utilizado na hora de analisar os dados está intimamente ligada à definição dos objetivos, formulação das hipóteses, formas de coleta e às características dos dados. O que se pretende aqui é destacar a importância de se conhecer as análises antes de se iniciar as coletas. Com tal conhecimento, podemos planejar mais efetivamente as coletas de tal forma que no final seja possível empregar uma análise simples e adequada.

Um aspecto importante a ser levado em consideração na fase de planejamento é ver qual dos testes seria adequado para responder a pergunta feita. Caso você julgue a análise muito complexa e que portanto fique inseguro se está ou não fazendo a coisa certa, você pode considerar simplificar o trabalho e ainda assim reter o objetivo principal. Esta é uma decisão que o autor pode fazer antes do trabalho ser realizado. Depois de ter os dados coletados, você não terá muitas opções. Um bom trabalho é aquele definido claramente e que pode ser analisado com métodos simples e amplamente empregados. Análises mais simples irão gerar resultados mais objetivos e

diretos, o que facilitará sua interpretação. Na falta de planejamento e conhecimentos básicos de análise, o autor corre o grande risco de descobrir posteriormente que talvez não seja possível analisar satisfatoriamente seus dados ou que a análise adequada é muito mais complexa do que ele e seus colegas podem entender.

TIPOS E NATUREZA DE VARIÁVEIS

Após a definição dos objetivos e hipóteses, pensa-se na obtenção dos dados e como analisá-los. Para escolher a análise mais adequada aos objetivos, é necessário ter o conhecimento de quantas variáveis teremos e quais serão os 'tipos' e 'naturezas' das variáveis. Inicialmente, podemos separar as variáveis em dois tipos, respostas (também chamadas de dependentes) e explanatórias (ou independentes). A variável resposta é aquela em que se esperam alterações frente aos diferentes valores (ou níveis) da variável explanatória. A variável resposta é o que de fato estamos interessados. Quando temos várias variáveis respostas (*e.g.* abundâncias de várias espécies numa série de amostras), as análises multivariadas devem ser utilizadas. No caso de haver apenas uma variável resposta (*e.g.* riqueza de espécies numa série de amostras), usaremos uma análise univariada.

Outra classificação importante refere-se à natureza das variáveis. De forma simplificada, podemos ter variáveis quantitativas, quando referem-se a sequências numéricas, sejam contínuas (1,23, 2,78, 5, 34 etc) ou discretas (1, 2, 6, 8 etc). As variáveis categóricas (ou qualitativas) apresentam diferentes 'estados'. Os 'estados' de uma variável categórica são chamados de níveis. Neste caso, não faz sentido perguntar quem é maior que quem. A única informação que temos é que os níveis são diferentes. No exemplo envolvendo a avaliação dos efeitos de *Pinus* em riachos, a riqueza de espécies seria a variável resposta (uma variável quantitativa). A variável explanatória é o tipo de vegetação: *Pinus* ou nativa (uma variável categórica com dois níveis). Um segundo exemplo poderia ser a avaliação de um índice biótico envolvendo peixes (variável resposta quantitativa) em relação à porcentagem de cobertura de vegetação nativa na bacia hidrográfica (variável explanatória quantitativa).

VARIÁVEIS RESPOSTAS USADAS EM BIOMONITORAMENTO

Em estudos de biomonitoramento, podemos usar apenas uma variável resposta ou várias. No caso de usarmos apenas uma, podemos utilizar a abundância de uma determinada espécie sensível (indicadora) do tipo de impacto antrópico em estudo. Ainda, podemos utilizar uma variável que leve em consideração informações de todas as espécies encontradas no local. Riqueza de espécies, índices de diversidade, índices bióticos e índices multimétricos são exemplos de tais variáveis.

A riqueza de espécies é uma das métricas mais simples e fáceis de interpretar e é usada amplamente em estudos ecológicos e em estudos aplicados. Apesar das vantagens e amplo uso, a riqueza de espécies é fortemente afetada pelo esforço amostral. Quanto maior o esforço de coleta, maior a riqueza de espécies. Portanto, para usarmos de maneira correta a riqueza de espécies devemos padronizar nosso esforço amostral nos locais a serem amostrados. Discutimos formas de fazer isto em seção anterior deste artigo.

Índices de diversidade são utilizados para estudos de estrutura de comunidade, mas como estes refletem as condições ambientais, acabaram sendo usados na avaliação da qualidade de ecossistemas. Os índices de diversidade requerem a contagem dos organismos referentes a cada taxa. Esta combinação entre a abundância relativa de organismos e a riqueza reflete o estado da comunidade. Como a comunidade é dependente da integridade do local (características físico-químicas, disponibilidade de habitats), na maioria dos índices, os valores aumentam de acordo com o aumento da qualidade da água. Em estudos de biomonitoramento, os índices mais comumente utilizados são os de Shannon e de Simpson, embora dezenas de outras fórmulas existam na literatura (Washington 1984, Magurran 2004). Generalizando, todos índices de diversidade são compostos por duas métricas: riqueza e equabilidade (esta última também chamada de equitabilidade). A diferença entre índices reside basicamente nos diferentes pesos dados a estas métricas. Assim como se pode usar apenas riqueza (peso 0 para equabilidade) como uma variável resposta, existe a possibilidade de usar apenas equabilidade (peso 0 para riqueza), para a qual também existem várias fórmulas (Beisel *et al.* 2003). Hepp & Restello (2007) observaram que valores de diversidade

Shannon e Equabilidade de Pielou da comunidade de macroinvertebrados bentônicos em riachos do norte do Rio Grande do Sul possuem forte relação positiva ($r = 0,78$ e $0,73$ respectivamente, $P < 0,001$) com parâmetros físico-químicos de qualidade da água, expressos pelo Índice de Qualidade de Água (IQA, CETESB 2005). Apesar de amplo uso, índices de diversidade são fortemente criticados na literatura ecológica (Hurlbert 1971, Melo 2008) e de biomonitoramento (Norris & Georges 1993, Gerritsen 1995, Lydy *et al.* 2000). Primeiro, os pesos dados a cada um dos dois componentes do índice (riqueza e equabilidade) são arbitrários. Não existe um método ou lógica inequívoca que nos guie na atribuição de pesos aos dois componentes. Segundo, duas comunidades contrastantes em riqueza e equabilidade podem produzir o mesmo valor de índice. Terceiro, dois índices podem produzir ordenações diferentes de amostras. Um índice pode indicar que a amostra-1 é mais diversa que amostra-2, enquanto um segundo índice pode indicar o contrário. Uma solução ao uso de índices de diversidade é o uso não de um índice, mas de vários, na forma de perfis de diversidade (Tóthmérész 1995). Uma segunda solução, mais simples e objetiva, é não confundir os dois componentes do índice e usar riqueza e equabilidade como respostas separadas (Melo 2008).

Em relação a índice bióticos e multimétricos, várias fórmulas foram elaboradas exclusivamente para avaliação da qualidade das águas baseados na utilização de organismos aquáticos. Estes índices possuem como objetivo simplificar várias informações científicas em uma métrica de fácil compreensão. Em geral, estes índices são baseados não apenas na presença/ausência ou abundância relativa das espécies (ou outra categoria taxonômica superior), mas também em informações sobre a sensibilidade da espécie (ou taxa) a perturbações antrópicas (Washington 1984, Mandaville 2002, Fleituch *et al.* 2002). Um exemplo de desenvolvimento de um índice multimétrico no Brasil é dado em Baptista *et al.* (2007). Uma discussão destes índices é apresentada na revisão de Oliveira *et al.* (2008, pp. 487-505, neste número).

TRANSFORMAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE DADOS

Muitas vezes, antes de analisarmos os dados, realizamos transformações ou padronizações. Transformamos os dados quando, por exemplo, obtemos

$\log(x+1)$, onde x é o valor a ser transformado e a adição de '1' assegura que não tentaremos obter um logaritmo de '0', que não existe. Padronizamos os dados quando, por exemplo, dividimos a abundância de uma espécie numa amostra pela abundância total da espécie em todas amostras.

Nas análises mais tradicionais, os dados devem ter distribuição Normal e homogeneidade de variância. Isto significa que independente do valor médio dos tratamentos, a variância deve ser semelhante. Em dados biológicos, nem sempre temos normalidade e homogeneidade de variâncias. Sobre normalidade, Fowler & Cohen (1990, p. 81) recomendam fazer um histograma dos dados e ver se parecem com uma Normal. Se sim, considere que os dados são adequados para o teste. Esta aparente falta de rigor justifica-se pelo fato de análises com dados sem normalidade estrita ainda serem válidas (ver Underwood 1997 p. 194). Em outras palavras, o valor de probabilidade produzido é confiável. Por outro lado, as análises são muito sensíveis à falta de homogeneidade de variâncias. Isto significa que quando comparamos três tratamentos (veja abaixo, Análise de Variância de 1 fator), as variâncias nos três tratamentos devem ser semelhantes (ou homogêneas). Quando fazemos uma regressão linear, a variância ao longo da reta ajustada (a dispersão dos pontos em torno da reta) deve ser constante. Com dados biológicos, isto nem sempre ocorre. Uma situação comum é ter variâncias maiores com médias de tratamentos maiores. No caso de uma regressão linear, é comum haver variâncias maiores para valores maiores da variável resposta, formando uma nuvem de pontos em forma de megafone. Fazer um teste com dados que não tenham homogeneidade de variância produzirá um valor de probabilidade que não é confiável. Gráficos diagnósticos para normalidade e homogeneidade de variâncias são apresentados em Soler (2004).

Para dados com falta de normalidade e, principalmente, homogeneidade de variâncias, podemos tentar uma transformação dos dados e avaliar novamente se os dois requisitos foram atendidos. Se foram, podemos interpretar a análise. Se não foram, podemos tentar uma segunda transformação e assim sucessivamente. Uma das transformações mais frequentemente utilizadas é $\log(x+1)$. Existe um procedimento automático que escolhe a melhor transformação a ser aplicada aos dados chamada Box-Cox (Norris & Georges 1993 p.

250, Gotelli & Ellison 2004 p. 232-233). Thorne *et al.* (1999) comentam que a transformação de dados é recomendada, facilitando a discriminação de locais com diferentes qualidades de água.

Em análises multivariadas, muitas vezes as variáveis respostas que estamos estudando possuem escalas distintas. Isto é comum em estudos de biomonitoramento que também avaliam características físico-químicas da água, tais como pH, condutividade, concentração de N ou P, turbidez etc. Nestes casos, comparar valores absolutos entre variáveis não faz muito sentido. Uma solução é padronizar cada variável pelo seu desvio padrão.

Em análises multivariadas cujas variáveis respostas são abundâncias de espécies, é comum observarmos que algumas espécies são extremamente abundantes e que a maioria são raras. Fazer a análise com os dados brutos significa basicamente analisar as espécies comuns (Thorne *et al.* 1999). As raras terão um peso muito pequeno. Apesar de raras, elas podem ter um sinal de bioindicação importante (Cao *et al.* 1998) e, portanto, devemos levá-las em consideração. Existem índices de similaridade que fazem isto diretamente (veja o índice NESS em Grassle & Smith 1976, Wolda 1981). Uma forma alternativa, e mais tradicional, é simplesmente transformar (*e.g.*, usando $\log[x+1]$) ou padronizar (*e.g.* dividir a abundância na amostra pela abundância máxima da espécie em todas amostras) os dados (Marchant 1999). Tais procedimentos melhoram sensivelmente o poder de recuperação de padrões em análises multivariadas, sejam de ordenação (Faith *et al.* 1987), classificação (Thorne *et al.* 1999) ou Manova (Warton & Hudson 2004).

ANÁLISES UNIVARIADAS

Na Tabela I apresentamos uma maneira resumida da escolha do teste estatístico a ser utilizado quando temos apenas uma variável resposta (análises univariadas) e esta tem natureza quantitativa. Em casos onde a variável resposta é quantitativa, mas discreta (dados de contagem), testes mais adequados são baseados na distribuição de Poisson, embora pesquisadores em geral usem a distribuição Normal (ao menos quando a média está longe do 0, por exemplo maior que 5 [Fowler & Cohen 1990 p. 81]). Note que diversas análises nada mais são do que variações do tipo e quantidade de variáveis explanatórias.

Embora não seja possível demonstrar aqui por falta de espaço, as análises da Tabela I nada mais são do que generalizações de uma Regressão Linear simples. Todas são modelos lineares. Veja os modelos lineares específicos das análises abaixo em Soler (2004) e, em maior detalhe, em Kutner *et al.* (2004). A seguir descrevemos exemplos de várias situações em que poderíamos usar as análises da Tabela I e, quando necessário, detalhes específicos das análises.

Análises com uma variável explanatória

Regressão Linear

Reduções na cobertura vegetal nativa na bacia hidrográfica podem ocasionar maior entrada de sedimento terrestre fino, pesticidas e esgoto doméstico. Ainda, a redução na cobertura vegetal pode diminuir o aporte de matéria vegetal particulada (*e.g.*, folhas) em riachos. Poderíamos hipotetizar que tais mudanças ocasionam variações na riqueza de espécies (de algas, invertebrados, peixes etc) no riacho drenando a bacia. Poderíamos coletar dados em 12 bacias hidrográficas. Cada bacia seria uma réplica. Em cada bacia, registraríamos o número de espécies no riacho (variável resposta quantitativa) e a porcentagem de cobertura vegetal nativa (variável explanatória contínua).

Teste t.

Um exemplo simples seria aquele citado anteriormente em que se queria avaliar potenciais efeitos de monoculturas florestais sobre a fauna/flora em riachos. Neste exemplo, temos como variável resposta a riqueza de espécies e como variável explanatória categórica tipo de vegetação. A variável explanatória tem dois níveis: áreas com *Pinus* e áreas com vegetação nativa. Podemos arbitrariamente chamar o

primeiro nível de ‘0’ e o segundo de ‘1’ ou o oposto. Isto não faz diferença. Com a variável explanatória codificado em 0 ou 1 (ou 1 e 2), poderíamos fazer uma ‘Regressão Linear’. O valor de *P* nas duas análises será o mesmo. Experimente fazer este exercício no seu programa de estatística favorito. Note que a lógica de um teste *t* é a mesma da Regressão Linear. Entretanto, na Regressão Linear geralmente estamos interessados não só no valor de *P*, mas também nos coeficientes da reta (intercepto e coeficiente angular) e no coeficiente de determinação (*R*²). No teste *t* geralmente estamos interessados apenas no valor de probabilidade e na diferença entre as médias.

Análise de Variância de 1 fator (1-Anova)

Neste caso a variável explanatória categórica tem 3 ou mais níveis. Esta é a única diferença em relação a um teste *t*! Embora Análise de Variância e teste *t*, usem estatísticas diferentes (*F* e *t*, respectivamente), estas são relacionadas (*F*² = *t*²). Seguindo o exemplo usado para o teste *t* acima, poderíamos ter um terceiro nível da variável explanatória categórica tipo de vegetação, por exemplo, plantio de *Eucalyptus*. Caso tenhamos um valor de probabilidade do teste menor do que o nível de significância proposto, temos a indicação de que existe diferença entre os três níveis, embora o teste não indique qual par de níveis seja diferente. Precisariamos de testes adicionais para constatar onde está a diferença (veja revisão de testes *a priori* e *a posteriori* em Day & Quinn 1989). O exercício proposto para o teste *t*, de codificar uma variável categórica em ‘0’ e ‘1’ (ou ‘1’ e ‘2’) não funciona quando temos 3 ou mais níveis. Teríamos que usar um terceiro número e isto implica numa ordenação dos valores. Na Análise de Variância (Anova), as variáveis explanatórias são codificadas

Tabela I. Análises estatísticas univariadas com resposta quantitativa (distribuição de resíduos segundo a normal). As diversas análises podem ser interpretadas simplesmente como generalizações de uma regressão linear simples.

Table I. Univariate statistical analyses with quantitative response (residues ordinated in normal distribution). Multiple analyses can be interpreted as generalizations of a simple linear regression.

		Número de variáveis explanatórias		
		1	2	3
Natureza(s) da(s) variável(is) explanatória(s)	Quantitativa	Regressão Linear	Regressão Múltipla	Regressão Múltipla
	Categórica	Teste <i>t</i> (1-2 níveis) 1-Anova (>2 níveis)	Test <i>t</i> pareado 2-Anova 1-Anova + bloco	3-Anova 2-Anova + bloco 1-Anova + 2 blocos
	Quantitativa e Categórica	--	Ancova	Regressão Múltipla

por meio de variáveis indicadoras (em Inglês, *dummy*) (Legendre & Legendre 1998 p. 46, Kutner *et al.* 2004 p. 314 e 683). Você não precisa obrigatoriamente saber o que é uma variável indicadora para fazer uma Análise de Variância usando um programa de computador ou mesmo 'à mão'. Entretanto, esse conhecimento é importante caso você não se contente em obter o valor de probabilidade de uma 'caixa-preta' e queira entender um pouco mais da análise, por exemplo, a razão dos graus de liberdade do numerador do teste *F* ser sempre $n-1$, onde n =número de níveis da variável explanatória.

Controlando variações: o uso de blocos e covariável

Teste *t* pareado e Anova em bloco

O termo 'par' e 'bloco' são usados para expressar procedimentos experimentais similares. O termo 'bloco' é mais genérico e pode indicar 'par', 'trio', 'quarteto' etc. Vamos usar apenas o termo 'bloco', mesmo quando a variável explanatória categórica em estudo tiver apenas 2 níveis (um 'par'). Imagine que você queira avaliar se o efeito do lançamento pontual de um dado tipo de resíduo industrial afeta a fauna (ou flora) de riachos. Poderíamos obter coletas em 8 riachos que recebem o determinado tipo de resíduo industrial e 8 livres de tais resíduos (controles). Um problema que poderíamos encontrar é a falta de riachos comparáveis. Por exemplo, as fábricas da região lançam resíduos em riachos de diferentes tamanhos. Ainda, as bacias hidrográficas drenadas por cada riacho possuem diferentes graus de perturbação antrópica (cidades, pastagens, monoculturas agrícolas etc). Em outras palavras, sabemos *a priori* que os riachos são diferentes entre si e, portanto, a variável resposta deverá possuir valores muito discrepantes, independente da fonte de perturbação. Em alguns locais ela é muito alta e em outros ela é baixa. Nestes casos, o uso de blocos é essencial para testar o efeito do efluente industrial. Poderíamos coletar nossas amostras controle nos mesmos riachos que recebem resíduos industriais, mas ligeiramente acima do ponto de lançamento. Neste caso, cada ponto de lançamento teria seu controle, coletado em um trecho à montante do lançamento (neste exemplo específico temos que supor que (1) os resíduos industriais não possuem efeitos à montante [por exemplo, não existe migração de fauna nessa direção] e que (2) o trecho de montante é semelhante ao trecho de jusante que recebe resíduos). No caso da variável

explanatória ter apenas dois níveis (um 'par'), como o exemplo em questão, a análise é feita comparando-se (ou seja, subtraindo-se) os valores da variável resposta (riqueza) nos dois níveis dentro do bloco. Imagine que de fato o resíduo cause redução da riqueza de espécies do grupo taxonômico que estejamos estudando. Neste caso, a diferença entre o valor de riqueza do trecho controle menos a riqueza no trecho afetado por resíduos seria positiva. Isto seria repetido para todos os riachos e em cada um teríamos diferenças positivas. No caso do resíduo industrial não causar reduções em riqueza, deveríamos esperar que as diferenças às vezes sejam positivas e às vezes sejam negativas e que em média sejam zero. Caso o exemplo acima não tenha sido suficientemente claro, imagine a situação em se queira avaliar que tipo de sola de sapato é melhor: borracha ou couro (modificação do exemplo citado em Box *et al.* 1978). Nossa variável resposta é mensurada como o desgaste da sola após 30 dias. Poderíamos escolher 20 pessoas, dividir em dois grupos de 10 pessoas e sortear que tipo de sola cada grupo receberá. Sabemos que as pessoas são muito diferentes em peso, frequência com que fazem atividades de caminhada ou corrida, e frequência com que usam sapato. Sabemos disto mas não estamos interessados nisso. Poderíamos, portanto, empregar a idéia de blocos e sortear, entre os pés de cada pessoa, os tipos de sola. Cada pessoa seria um bloco e poderíamos usar 20 pessoas no estudo. Poderíamos ter indícios de que as pessoas gastam mais a sola do pé direito do que esquerdo. Para evitar este viés, devemos aleatorizar o pé que receberá sola de couro (note que no exemplo anterior não podemos aleatorizar o trecho que receberá resíduo industrial e aquele que será o controle e, portanto, temos que assumir que os dois trechos são semelhantes). Nem sempre blocos são interessantes (Gotelli & Ellison 2004 p. 179). No caso em que as réplicas são parecidas (homogêneas), o uso de blocos reduz o poder do teste em detectar uma diferença significativa caso ela exista a análise (ver Soler 2004). Note que na Tabela I as análises em blocos aparecem quando temos duas ou mais variáveis explanatórias categóricas. Isto porque o bloco é usado na análise como uma variável categórica (no primeiro exemplo acima a variável bloco teria 8 níveis [riachos] e no segundo 20 níveis [pessoas]). Em ambos exemplos acima temos duas variáveis explanatórias categóricas, embora uma delas (o bloco) não seja de interesse. O problema de se usar blocos quando as réplicas são um

tanto homogêneas é que se perde graus de liberdade, que em termos simplistas, significa que você perde replicação. Deve-se notar que a decisão de se analisar os dados com ou sem blocos é feita antes do estudo ser feito (note que nos dois exemplos acima também citamos a situação em que não se empregaria blocos). Se o estudo foi planejado em blocos, a análise deverá ser feita em blocos.

Análise de Covariância (Ancova)

Embora possamos chamar de Ancova qualquer estudo que tenha uma variável explanatória categórica e outra quantitativa, frequentemente os pesquisadores usam a expressão para indicar a situação em que se tem interesse apenas na variável categórica, mas que se incluiu uma variável quantitativa para controlar variações do sistema de estudo. A variável quantitativa nestes casos é frequentemente chamada de covariável e tem exatamente a mesma função da variável bloco citada anteriormente. A única diferença é que quando falamos ‘bloco’ estamos falando de uma variável categórica e quando falamos ‘covariável’ estamos falando de uma variável quantitativa. No exemplo envolvendo resíduo industrial usado para ilustrar o uso de blocos, imagine que os riachos disponíveis para estudo (tanto aqueles afetados por resíduos quanto aqueles não afetados) diferiam entre si apenas em tamanho e que riachos maiores possuem naturalmente maior riqueza de espécies do grupo taxonômico em estudo. Poderíamos, ao invés de bloco, usar como covariável o tamanho do riacho. Note que aqui estamos controlando apenas tamanho do riacho, enquanto com o uso de blocos estaríamos controlando ‘quase tudo’ que esteja variando de um riacho para outro. A vantagem é que com variáveis quantitativas (covariável) sempre gastamos apenas 1 grau de liberdade enquanto que com variáveis categóricas (blocos) gastamos $k-1$ graus de liberdade, onde k =número de níveis da variável bloco (de maneira simplista, gastar graus de liberdade significa perder replicações).

Análises com várias variáveis explanatórias e interações

Regressão Múltipla

No exemplo usado para ilustrar a Regressão Linear simples, imagine que em vez de avaliar a

porcentagem de cobertura vegetal nativa, poderíamos estar interessados nos efeitos da entrada de sedimento fino terrestre e na quantidade de esgoto doméstico. Neste caso, passamos a ter duas variáveis explanatórias contínuas. Poderíamos ter várias outras variáveis explanatórias. Entre estas, algumas poderiam ser categóricas. Um aspecto importante a ser notado é que conforme incluímos mais variáveis explanatórias, devemos aumentar nosso número de réplicas (no caso bacias hidrográficas). No contexto de Análise de Variância, Gotelli & Ellison (2004 p. 150) recomendam a ‘regra’ da experiência de 10, onde se deve obter 10 observações para cada categoria ou nível da variável. Poderíamos estender esta sugestão para variáveis explanatórias contínuas. Apesar de extremamente útil e empregada amplamente, o uso de Regressão Múltipla é um tanto complicado devido ao fato das variáveis explanatórias frequentemente serem correlacionados entre si (fenômeno chamado de colinearidade) (veja detalhes em Graham 2003, Whittingham *et al.* 2006). Geralmente, a Regressão Múltipla é usada em estudos observacionais. Isto significa que não temos controle sobre as variáveis explanatórias. Nós simplesmente escolhemos um local qualquer e medimos as variáveis. Ainda, escolhemos um grupo de variáveis explanatórias entre um grupo geralmente muito maior. A razão de escolhermos algumas variáveis explanatórias em particular depende do nosso conhecimento prévio e uma boa escolha de quais variáveis medir é fundamental no estudo. Os problemas de colinearidade decorrentes de um estudo observacional impedem uma interpretação direta da análise. Isto indica que mesmo que uma dada variável seja significativa, não quer dizer que ela está causando aquele efeito. A causa real pode ser dada por outra variável não medida no estudo e correlacionada com a variável explanatória em questão. Relações causa-e-efeito só podem ser inferidas com segurança em experimentos. Nestes, isolamos todas as outras variáveis e deixamos variar apenas a(s) variável(is) que queremos estudar.

Análise de Variância Fatorial (2-Anova, 3-Anova)

Quando estudamos duas ou mais variáveis explanatórias de interesse (Análise de Variância Fatorial, Regressão Múltipla, Análise de Covariância) podemos testar, além dos efeitos das variáveis

explanatórias, se existe(m) interação(ões) entre estas. Não é muito comum fazer isto em Regressões Múltiplas quando se têm muitas variáveis explanatórias, embora seja praticamente regra quando temos poucas variáveis e estas são categóricas (Análise de Variância Fatorial). Algumas pessoas erroneamente interpretam interações como ‘complicações não interessantes’ da análise, quando, de fato, são interessantíssimas e podem nos fornecer interpretações dos resultados que não teríamos se analisássemos as variáveis explanatórias separadamente. Esta é uma razão pela qual devemos sempre que possível fazer uma análise única que englobe todas variáveis explanatórias e não várias análises separadas para cada variável (uma segunda razão é a maximização de replicações ou ‘replicações escondidas’, visto que uma mesma observação é usada para avaliar mais de uma variável explanatória; ver Kutner *et al.* 2004 p. 816). Por exemplo, imagine que se queira avaliar o efeito de um determinado tipo de monocultura agrícola sobre a abundância de determinada espécie de peixe (a variável resposta) que acreditamos ser sensível a perturbações por sedimentos e pesticidas usados na lavoura. O pesquisador A faz um experimento com 20 pequenos riachos, 10 com cultura agrícola e 10 com vegetação nativa (um teste *t*) e descobre que não existe efeito da modificação da cobertura vegetal. Um pesquisador B repete o experimento em sua área de estudo preferencial e conclui que existe um efeito da cobertura vegetal. O que pode ter acontecido? Talvez outras variáveis importantes não tenham sido incluídas na análise. Na área do pesquisador A, talvez os riachos drenassem micro-bacias com pouco declive e que, portanto, houvesse muito pouco escoamento superficial durante chuvas. Na área do pesquisador B, os riachos poderiam estar em micro-bacias com forte declive, o que ocasionaria o transporte de sedimentos e pesticidas por escoamento superficial durante chuvas. Um experimento mais adequado deveria estudar as duas variáveis explanatórias simultaneamente. Teríamos, portanto, duas variáveis explanatórias com dois níveis cada: cobertura vegetal (monocultura agrícola, vegetação nativa) e inclinação média da micro-bacia (alta, baixa). Na área de estudo, devemos procurar riachos que atendam a todas as combinações dos níveis dos dois fatores. Por exemplo, teríamos que ter: 1) 5 riachos com monocultura agrícola e baixa declividade, 2) 5 riachos com monocultura

agrícola e alta declividade, 3) 5 riachos com cobertura vegetal nativa e baixa declividade e 4) 5 riachos com cobertura vegetal nativa e alta declividade. Na análise veríamos que a interação foi significativa. Um gráfico com as médias dos tratamentos mostraria que o efeito do tipo de cobertura vegetal sobre a abundância de peixes depende da declividade do terreno. Em locais com baixa declividade, não existe efeito da cobertura vegetal. Em locais com alta declividade, existe um efeito da cobertura vegetal. A palavra chave aqui é depende, e pode ser interpretada como sinônimo de interação estatística. Um bom planejamento do estudo deve incluir variáveis explanatórias que podem interagir entre si e melhor explicar as variações na variável resposta.

ANÁLISES MULTIVARIADAS

Análises multivariadas são aquelas em que temos várias variáveis respostas. A situação mais simples em biomonitoramento é quando estamos interessados não em uma espécie em particular ou uma métrica composta (*e.g.* índice de diversidade, índice de integridade biológica), mas nas respostas de várias espécies. Podemos separar as análises multivariadas em dois grandes grupos. No primeiro as análises são feitas apenas com as variáveis respostas. Não usamos variáveis explanatórias. Estas análises, ditas exploratórias, incluem técnicas de ordenação e classificação. O objetivo nestas análises é procurar por semelhanças entre as amostras, semelhança esta baseada na composição de espécies (ou outras variáveis respostas; *e.g.*, características físico-químicas dos locais estudados). O segundo grupo de análises multivariadas incluem técnicas que possuem variáveis explanatórias. Neste segundo grupo estão inclusos Análise de Correspondência Canônica (CCA), Análise de Variância Multivariada (MANOVA) e Teste de Mantel.

Análises multivariadas exploratórias: ordenação e classificação

Ordenação: PCA

Podemos entender o que faz uma ordenação com o seguinte exemplo. Desenhe num papel um eixo (uma reta) com escala, com mínimo de 0 e máximo de 100. Imagine que este eixo represente a abundância

da espécie A. Suponha que coletamos amostras em três sítios e encontramos 14 indivíduos da espécie A no sítio-1, 23 indivíduos no sítio-2 e 45 indivíduos no sítio-3. Sendo a espécie A nossa única resposta (um problema univariado), podemos dizer que o par de amostras mais semelhante entre si é composto pelo sítio-1 e sítio-2. Num nível intermediário de semelhança, temos o par composto pelo sítio-2 e sítio-3. Finalmente, o par menos semelhante é o sítio-1 e sítio-3. Agora imagine que temos uma segunda espécie B e, portanto, um segundo eixo de abundância. Nos três locais, a espécie B possui abundâncias de 2, 80 e 90, respectivamente para os sítios 1, 2 e 3. Neste espaço bi-dimensional, podemos inserir os três sítios amostrais e notar que agora o par mais semelhante é composto por sítio-2 e sítio-3. Podemos continuar o exercício e inserir uma terceira espécie C (um terceiro eixo). Podemos visualizar as distâncias entre os sítios usando uma figura tridimensional. A partir da quarta espécie não podemos representar as distâncias entre nossos sítios amostrais com uma figura. Aqui entra a utilidade de técnicas de ordenação. Na prática temos muitas espécies e, portanto, é impossível visualizar as relações de semelhança entre todos os sítios amostrais. Temos neste caso uma nuvem de pontos num espaço multidimensional. O que a ordenação faz é visualizar esta nuvem de diferentes ângulos neste espaço n -dimensional, onde n =número de espécies, e determinar em qual deles se tem a projeção mais longa. Em outras palavras, traçaríamos várias retas por dentro da nuvem de pontos e escolheríamos aquela em que tivéssemos o maior comprimento. Em seguida, projetaríamos em ângulo reto estes pontos na reta. A reta seria nosso primeiro Eixo Principal e as projeções dos pontos os escores das amostras neste primeiro eixo. Note que as relações de distância neste único eixo não são exatamente iguais às distâncias entre os pontos na nuvem n -dimensional. Perdemos informação neste processo de projeção de objetos num espaço n -dimensional para um espaço 1-dimensional. Podemos seguir com o processo de projeção para um segundo eixo, tendo como restrição o fato de ele ser perpendicular ao primeiro. Portanto, para encontrarmos este segundo eixo, giraríamos uma reta perpendicular ao primeiro eixo e determinaríamos em qual posição esta reta é maior. Este seria nosso segundo Eixo Principal. Novamente, projetamos neste segundo eixo as amostras que estão

no espaço n -dimensional. Para facilitar o processo de visualização descrito acima, tome como exemplo nuvens de pontos num espaço 3-dimensional e tente projetar inicialmente em uma dimensão (uma reta) (um exemplo com duas dimensões é fornecido em Norris & Georges 1993, p. 266). Em seguida tente projetar 2 retas perpendiculares (um plano). Neste caso com três dimensões, imagine que a nuvem de pontos esteja dispersa na forma de uma garrafa. O maior eixo seria aquela entre a tampa e o fundo da garrafa. Fazemos a projeção dos pontos da superfície da garrafa para esta única reta. Os pontos que estavam no gargalo da garrafa estarão próximos entre si, e em conjunto distantes dos pontos que estavam no fundo da garrafa. Apesar disto, as distâncias dos pontos neste único eixo não são exatamente iguais àquelas distâncias na superfície da garrafa. Por exemplo, dois pontos que estavam na mesma altura do gargalo da garrafa, mas em 'lados' distintos, quando projetados no primeiro eixo principal estarão em posição idêntica. Por isto dizemos que o(s) primeiro(s) eixo(s) explicam X% da variação total. Quanto mais concordante a distância original entre as amostras e a distância projetada no(s) eixo(s), maior é a porcentagem explicada. Não existe um valor 'ótimo' para a porcentagem de explicação dos primeiros dois ou três eixos, embora existam procedimentos para escolha do número de eixos a serem interpretados (Jackson 1993, Pillar 1999). Geralmente, quanto maior número de espécies (variáveis), menor a porcentagem de explicação. Ainda, quanto mais correlacionadas as distribuições das espécies nas amostras forem entre si, maior será a porcentagem de explicação. A técnica descrita com o exemplo acima é a Análise de Componentes Principais (PCA) (Legendre & Legendre 1998, Manly 2008).

Ordenação: NMDS

Diferente do PCA, o Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS ou NMS) é obtido não com uma fórmula matemática, mas por tentativa-e-erro. O passo inicial é construir uma matriz de distâncias entre os sítios amostrais usando as informações das espécies em cada sítio. Podemos usar a Distância Euclidiana (linha reta, aquela usada para ilustrar o PCA acima) ou qualquer outra entre as dezenas disponíveis. Algumas destas distâncias levam em consideração a composição apenas (lista de espécies, dados de presença/ausência das espécies nas amostras),

enquanto outras levam em consideração a composição e abundância relativa. Dezenas de índices de distância são descritos em Wolda (1981), Legendre & Legendre (1998), Valentin (1995, 2000) e Gotelli & Ellison (2004, p. 404). Após a escolha do índice de distância, calculamos as distâncias entre todos os pares possíveis de amostras. As distâncias calculadas são arranjadas numa matriz, onde tanto as linhas quanto as colunas são referentes às amostras. Nas células da matriz colocamos os valores de distância referentes a cada par em comparação (Figura 1B). Note que a diagonal desta matriz será composta apenas por zeros, pois serão referentes a comparações entre uma amostra e ela própria. Ainda, note que acima da diagonal os valores de distância repetem os valores abaixo da diagonal. Isto pois a distância entre o amostra-1 e amostra-2 é igual à distância entre amostra-2 e amostra-1. Portanto, geralmente usamos apenas metade da matriz (pois sabemos a diagonal e a outra metade) e devido a forma desta metade, chamamos de matriz triangular (Figura 1B). A idéia do NMDS é projetar num espaço de número de dimensões escolhida (geralmente 2 dimensões) as distâncias da matriz triangular. O resultado é um diagrama de dispersão que melhor reflete a matriz triangular original (Manly 2008). Se duas amostras tinham um valor baixo de distância, espera-se que no diagrama estas duas amostras estarão posicionadas em locais próximos uma da outra. É claro que as distâncias no diagrama não serão idênticas às distâncias originais. Entretanto, apesar da perda de informação, ganhamos em compreensão das principais relações de semelhança entre os objetos em estudo. O quanto as distâncias no diagrama são diferentes das distâncias originais é medido e chamado de *stress* (*STandardized RESidual Sum of Squares*). Um valor baixo de *stress* indica que as distâncias no diagrama refletem bem as distâncias originais. Como dito anteriormente, não existe uma fórmula para se achar a melhor configuração do diagrama (aquela com menor *stress*). O método funciona, de forma simplista, fazendo o diagrama e medindo o *stress*. Modifica-se o diagrama e mede-se o *stress* novamente. Faz-se isto muitas vezes e escolhe-se a configuração do diagrama com menor *stress*. A expressão “Não-Métrico” no nome da análise indica que para a maximização com as distâncias originais são usados os postos (*ranks*) das distâncias no digrama. Minchin (1987) comparou várias técnicas de ordenação e concluiu que o NMDS

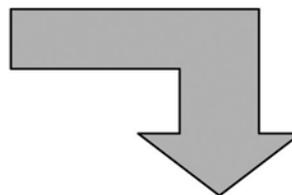
(na verdade, uma variante, chamada local NMDS) usando distância de Bray-Curtis foi o método mais robusto a diversos tipos de conjuntos de dados simulados. A interpretação do diagrama consiste basicamente em verificar a semelhança entre as amostras tal como indicada pela proximidade espacial ao longo dos eixos de ordenação (*e.g.*, bi ou tridimensional), se formam sub-grupos ou não ou se estão alinhadas numa direção (indicativo de um gradiente). Com dados externos (não utilizados na análise), podemos ver se estes grupos ou alinhamento de amostras correspondem a sítios com maior ou menor grau de impacto antrópico. Num programa de recuperação de ambientes degradados, podemos monitorar a mudança da fauna/flora com amostragens repetidas no tempo nos locais em recuperação e em locais controle. Poderíamos avaliar após quanto tempo a fauna/flora se torna semelhante àquela dos locais controle.

Classificação

Os métodos mais comuns de classificação são os de aglomeração, pois iniciam com um par de amostras e vão agregando outras amostras ao par. Falaremos apenas deste tipo de classificação aqui (veja TWINSpan, um método de classificação divisiva em Legendre & Legendre 1998 p. 347). O resultado final é uma representação tipo-árvore chamado de dendrograma. Amostras unidas por sub-grupos terminais são mais semelhantes entre si do que aquelas unidas por grupos formado em posições mais basais. A análise inicia a partir de uma matriz triangular de distância (Figura 1B), a mesma usada em NMDS. Nesta matriz, observa-se o par de amostras com menor distância. Este é o primeiro subgrupo. A partir deste ponto, os diferentes tipos de métodos de ligação vão unir outras amostras a este par inicial ou ainda criar um outro par não ligado ao par inicial com diferentes estratégias. Por simplicidade, podemos ver como funciona o método de Ligação Simples (ou Vizinho Mais Próximo) (Valentin 1995, Legendre & Legendre 1998, Manly 2008). A partir do par de amostras com menor distância formado anteriormente, procura-se na matriz de distâncias a amostra com menor distância em relação a uma das amostras do par inicial. Repete-se então o processo, agora tendo como sub-grupo três amostras. No caso da menor distância não incluir amostras do sub-grupo já formado, cria-se um novo sub-grupo terminal. O processo continua até

a)

	sp1	sp2	sp3	sp4	sp5	sp6	sp7	sp8
a1	0	0	16	5	3	6	0	0
a2	1	0	3	3	7	3	0	0
a3	3	0	21	1	3	0	0	1
a4	2	0	25	0	9	5	0	1
a5	2	4	5	6	0	2	0	1
b1	12	1	8	17	5	9	1	1
b2	15	0	13	12	0	1	2	0
b3	11	1	12	6	9	0	1	0
b4	8	0	11	9	3	0	0	0
b5	6	1	15	14	4	2	0	0



b)

	a1	a2	a3	a4	a5	b1	b2	b3	b4
a1	0								
a2	0,489 (25)	0							
a3	0,322 (12)	0,652 (43)	0						
a4	0,333 (13)	0,525 (30)	0,239 (3)	0					
a5	0,520 (29)	0,514 (28)	0,633 (42)	0,677 (44)	0				
b1	0,476 (22)	0,577 (38)	0,614 (40)	0,562 (37)	0,541 (33)	0			
b2	0,479 (23)	0,733 (45)	0,528 (31)	0,624 (41)	0,556 (34)	0,299 (9)	0		
b3	0,429 (18)	0,509 (27)	0,449 (20)	0,439 (19)	0,533 (32)	0,319 (11)	0,277 (7)	0	
b4	0,377 (15)	0,583 (39)	0,400 (17)	0,562 (36)	0,490 (26)	0,341 (14)	0,243 (4)	0,211 (2)	0
b5	0,306 (10)	0,559 (35)	0,380 (16)	0,452 (21)	0,484 (24)	0,271 (6)	0,247 (5)	0,293 (8)	0,205 (1)

Figura 1. a) Matriz de abundância de oito espécies em 10 unidades amostrais distribuídas em dois grupos (a e b). b) Matriz de distância (triangular) entre as 10 unidades amostrais obtida usando o índice de Bray-Curtis. Valores entre parênteses indicam o posto (rank) dos valores. As distâncias envolvendo unidades amostrais dos dois grupos (entre grupos) estão marcadas em cinza.

Figure 1. a) Abundance matrix of eight species along 10 sampling units distributed in two groups: a and b. b) Distance matrix (triangular) among the 10 samples obtained using Bray-Curtis index. Numbers in parentheses are assigned statistical ranks. Distances between samples of the two groups are given in the gray cells.

não restar mais amostras não-ligadas. Um método de ligação bastante popular é baseado na média do grupo já formado. Assim, juntamos as duas amostras do par inicial e recalculamos as distâncias desta nova amostra com todas as restantes. A cada passo que agregamos uma amostra ao subgrupo, recalculamos a matriz de distâncias. Os métodos de ordenação e classificação basicamente propiciam uma visualização gráfica, à custa da perda de informação, das semelhanças entre amostras. Embora métodos de ordenação e classificação sejam muitas vezes usados para o

mesmo propósito, eles a rigor possuem objetivos distintos. Métodos de ordenação têm como objetivo principal revelar mudanças contínuas e suaves na estrutura da comunidade. Por outro lado, métodos de classificação têm como objetivo revelar grupos de amostras e a interligação entre os grupos. No contexto de biomonitoramento, podemos usar ordenação para revelar possíveis gradientes de perturbação antrópica na fauna/flora e usar classificação para distinguir grupos de amostras com grau de perturbação antrópica semelhante.

Análises multivariadas com variáveis explanatórias: CCA e MANOVA

CCA

Um tipo de ordenação que inclui, além das variáveis respostas (*e.g.* espécies), variáveis explanatórias (Ter Braak 1986, Palmer 1993, Legendre & Legendre 1998). Uma segunda técnica com o mesmo objetivo é Análise de Redundância (RDA), que seria o equivalente multivariado de Regressão Múltipla. A diferença entre RDA e CCA reside na técnica matemática envolvida (veja detalhes em Legendre & Legendre 1998). Com ordenações tipo PCA e NMDS obtemos uma representação gráfica que maximiza a visualização de semelhanças entre as amostras. Tal diagrama pode ser interpretado visualmente ou com auxílio de correlações entre os eixos da ordenação e variáveis explanatórias. Note que tais variáveis explanatórias não são usadas na análise de ordenação. Na CCA usamos duas matrizes de dados (Ter Braak 1986). A primeira matriz, às vezes chamada de principal, em estudos de biomonitoramento é constituída pelas espécies nos locais em avaliação (a mesma usada em PCA, NMDS, classificação). A segunda matriz, às vezes chamada de ambiental, inclui as variáveis explanatórias. No caso de trabalhos em biomonitoramento, poderiam ser variáveis relacionadas a intervenções antrópicas no ambiente, tais como nutrientes (N, P), quantidade de sedimento fino, pesticidas etc. Na CCA, uma ordenação das amostras será feita, mas não com intuito de apenas otimizar as relações de semelhança descritos para o método PCA ou NMDS. Diferentemente, as informações contidas na segunda matriz ambiental serão levadas em consideração. Dizemos que CCA é uma ordenação ‘restrita’ (em Inglês, *constrained*). Isto significa que, para uma mesma matriz principal, diferentes ordenações das amostras podem ser obtidas com diferentes matrizes secundárias. Se a matriz secundária incluir apenas variáveis que não são relacionadas à matriz principal, ou seja, que não explicam a matriz principal, as relações de semelhança entre os objetos de estudo não serão bem representados no diagrama de ordenação. Em outras palavras, a ordenação das amostras produzida poderá ser pouco relacionada às semelhanças entre amostras originais (McCune 1997). Neste sentido, a análise de CCA exige cautela na escolha das

variáveis explanatórias (McCune 1997) e, mais do que nas análises de ordenação simples e classificação, entrada-lixo significa saída-lixo (em Inglês, *garbage in, garbage out*). Se o objetivo do trabalho é apenas visualizar relações de semelhança, deve-se optar por PCA, NMDS ou técnica semelhante (McCune 1997). O resultado principal de uma CCA é um diagrama contendo a ordenação das amostras, espécies e um conjunto de vetores (eixos ou setas) correspondentes às variáveis ambientais na segunda matriz. De acordo com o sentido e comprimento relativo do vetor, podemos avaliar quais amostras e espécies estão mais relacionadas com quais variáveis ambientais. No trabalho original (Ter Braak 1986) existem exemplos ecológicos de como interpretar os resultados da análise. Análises com dados obtidos por simulação podem ser encontradas em Palmer (1993) e McCune (1997).

MANOVA

Basicamente o mesmo procedimento da Análise de Variância (variável[is] explanatória[s] categórica[s]) mas com várias variáveis respostas. Além da Manova ‘tradicional’, baseada no teste F, existem várias formas de Manova baseadas em distância (daqui em diante Manova-d) em que o teste da estatística é feito por aleatorização. O desempenho entre a Manova tradicional e Manova-d não é muito diferente (mas transformação dos dados sim, ver Warton & Hudson 2004). O primeiro ponto é que existem vários tipos de Manova-d, embora todas levem em consideração basicamente o mesmo princípio, diferindo basicamente na estatística usada para avaliar as distâncias dentro-de-grupo e entre-grupos (uma revisão sobre o assunto é fornecido por Warton & Hudson 2004). Entre estes vários tipos, pode-se citar Anosim (*Analysis of Similarities*, Clarke 1993), Pillar-Orloci (Pillar & Orloci 1996) e Teste de Mantel (descrito abaixo; neste caso uma das matrizes de distância é indicadora de grupos, ver Manly 1997 p. 194 e p. 264). Entre estes, talvez Anosim seja a análise mais usada em estudos de biomonitoramento, particularmente no ambiente marinho, e, portanto, vamos examiná-la com mais detalhe. Suponha que queiramos avaliar se lagos que recebem esgoto doméstico possuem fauna de zooplâncton diferente daquela de lagos que não recebem esgoto. Se existe um efeito do lançamento de esgoto, este será dado por todo o lago e, portanto, lago é nossa unidade de replicação. Obtêm-se 10

amostras de lagos, 5 que recebem esgoto e 5 de lagos que não recebem esgoto. Em cada amostra obtêm-se uma lista de espécies e suas abundâncias (nossas variáveis respostas). Suponha que no total tenhamos encontrado 8 espécies. Juntando todos os dados, teremos uma matriz com 10 linhas (amostras) e 8 colunas (espécies). Para facilitar a compreensão do método, coloque as 5 amostras de lagos com esgoto no início da matriz (Figura 1A). O primeiro passo é obter uma matriz triangular de distâncias usando um índice de distância que se considere adequado (Figura 1B). Note que a matriz triangular obtida possui distâncias (1) entre amostras de lagos com esgoto (“dentro de grupo”), (2) entre amostras de lagos sem esgoto (“dentro de grupo”), e (3) entre amostras que diferem quanto a presença ou não de esgoto (“entre grupos”) (Figura 1A, células em cinza). Suponha a situação em que o despejo de esgoto tenha alterado profundamente a composição de espécies. Espécies sensíveis desapareceram e espécies tolerantes se tornaram comuns. Neste caso, as distâncias “entre grupos” seriam muito maiores do que as distâncias “dentro de grupo” de lagos com esgoto e também das distâncias “dentro de grupo” de lagos sem esgoto. No caso do esgoto não ter causado mudança na fauna, as distâncias “entre grupos” seriam semelhantes às aquelas “dentro de grupo”. A diferença entre os vários tipos de Manova-d é a estatística usada para quantificar esta diferença entre distâncias “entre grupos” e distâncias “dentro de grupo”. No caso da Anosim, a estatística é baseada em postos (*ranks*) (valores entre parênteses abaixo das distâncias na matriz triangular da Figura 1B). A fórmula é a seguinte: $R = (r_e - r_d) / (N/2)$, onde r_e = média dos postos das distâncias “entre grupos”, r_d = média dos postos das distâncias “dentro de grupo” e N = número de distâncias. O valor da estatística R varia entre -1 e 1. No caso das amostras de um grupo (*e.g.*, lagos com esgoto) serem completamente diferentes das amostras do outro grupo, as distâncias “entre grupos” serão sempre maiores e o valor de R será 1. No caso dos grupos não diferirem, as distâncias “entre grupos” serão semelhantes às distâncias “dentro de grupo” e o valor de R será próximo do 0. Valores negativos podem ser obtidos, mas não possuem interpretação simples. No exemplo da Figura 1, a média dos postos (*rank*) entre grupos foi igual a 27,96 [(22+ 23+ 18+ 15+ 10+ 38+ 45+ 27+ 39+ 35+ 40+ 31+ 20+ 17+ 16+ 37+ 41+ 19+ 36+ 21+ 33+

34+ 32+ 26+ 24) / 25] e a média dos postos dentro de grupos foi igual a 16,8 [(25+ 12+ 13+ 29+ 43+ 30+ 28+ 3+ 42+ 44+ 9+ 11+ 14+ 6+ 7+ 4+ 5+ 2+ 8+ 1) / 20]. O valor da estatística é dado por $(27,96 - 16,8) / (45/2) = 0,496$. A questão agora é avaliar se um valor tão alto de R quanto o valor obtido com os dados originais poderia ser obtido ao acaso. Para avaliarmos isto, podemos aleatorizar a alocação das amostras nos dois grupos. Das 5 amostras de lagos com esgoto, quando aleatorizadas, algumas poderão ficar no grupo sem esgoto. Note que as distâncias não precisam ser recalculadas e que se aleatoriza as amostras e não as distâncias (uma permutação restrita). Calculamos então o R desta matriz aleatorizada. Esperamos que ele tenha valor próximo de 0, pois com a aleatorização os dois grupos formados terão amostras dos dois tipos de lagos. Repetimos este procedimento muitas vezes (*e.g.*, 999 vezes) e em cada repetição anotamos o valor de R . Agora basta obter o valor de probabilidade dos dois grupos de amostras serem semelhantes. Para isto contamos quantos valores de R obtidos nas aleatorizações foram iguais ou maiores que o valor de R obtido com os dados originais (não aleatorizados) (Figura 2). Com os dados do exemplo da Figura 1, observamos que das 999 aleatorizações, em 7 os valores de R foram iguais ou maiores que o R observado com os dados originais (Figura 2). Portanto $P = (7+1)/999+1 = 0,008$. Note que colocamos o valor ‘1’ no numerador e aumentamos ‘1’ no denominador pois caso a hipótese nula seja verdadeira, o valor da estatística observada é apenas um dos possíveis valores que poderiam ser obtidos na aleatorização (Manly 1997, p. 7). É importante destacar que todos os testes de aleatorização seguem essa lógica.

Teste de Mantel

Muitas vezes queremos estudar a relação de duas matrizes de distância. Por exemplo, podemos querer saber se comunidades próximas no espaço são mais semelhantes entre si em composição de espécies do que aquelas distantes no espaço. Ainda, podemos querer saber se locais com impactos antrópicos semelhantes possuem faunas/floras semelhantes. Uma análise adequada e relativamente simples nestes casos é o teste de Mantel (Legendre & Legendre 1998, Manly 2008). A análise basicamente é uma correlação entre os dois conjuntos de dados. Entretanto, pelo fato de

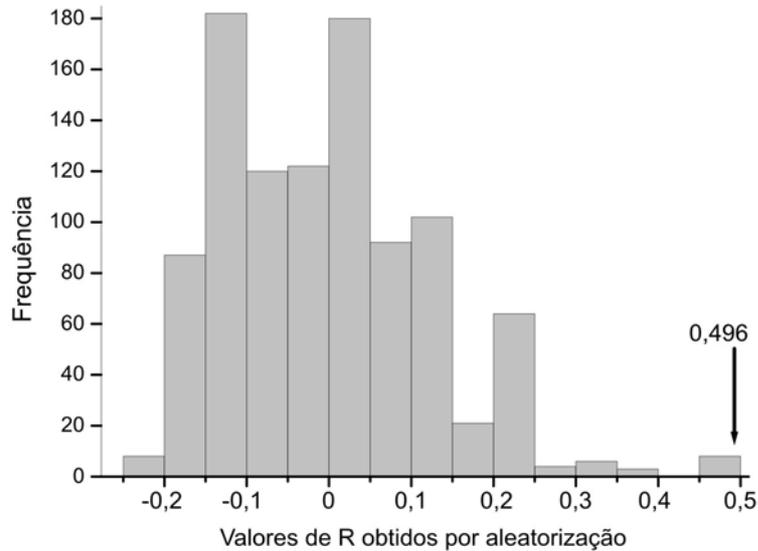


Figura 2. Valores da estatística R da ANOSIM obtidas por aleatorização das amostras entre os dois grupos definidos na Figura 1. O valor da estatística observada (dados originais) é mostrado.

Figure 2. Values obtained with R ANOSIM through randomization of the sample values given in Figure 1. The statistical values of original data are also given.

uma mesma amostra ser usada várias vezes na matriz de distância (Figura 1B), não podemos empregar um teste de correlação comum. Neste caso, o teste é feito por aleatorização, exatamente como aquele descrito acima para a ANOSIM. A única diferença é que a estatística usada na aleatorização não é o R, mas um coeficiente de correlação ou estatística equivalente. Aliás, como citado na descrição da ANOSIM acima, podemos considerar o teste de Mantel e ANOSIM como casos específicos de Manova baseadas em distância. Poderíamos aplicar o teste de Mantel no exemplo da Figura 1. Imagine que além da matriz da Figura 1B, teríamos uma segunda matriz que refletisse o fato do par de amostras estar no mesmo grupo (distância igual a 0) ou em grupos diferentes (distância igual a 1, parte cinza da matriz da Fig 1B). Note que caso exista diferença entre os grupos, esperamos uma correlação positiva entre as duas matrizes: valores dentro de grupos terão valores baixos e serão associados na segunda matriz a valores de distância 0. Para valores “entre grupos” deveríamos ter valores altos e seriam associados a valores de distância 1 na segunda matriz. Embora possível, o teste de Mantel raramente é utilizado nesta situação em que uma das matrizes possui distâncias 0 ou 1 (ver Manly 1997 p. 194 e p. 264). Frequentemente, a segunda matriz possui distâncias com variação contínua.

PROGRAMAS DE COMPUTADOR E LIVROS-TEXTO

É comum ouvir dizer que o melhor programa para realizar análises estatísticas é aquele que você conhece e sabe usar. Implícito nesta afirmação é o fato da maioria dos programas disponíveis realizarem as mesmas análises. Isto é particularmente válido para as análises univariadas citadas acima. Portanto, dizer que o programa X é ‘melhor’ que o programa Y é na maioria das vezes irrelevante. Se você não tem familiaridade com um programa de estatística, é interessante procurar com colegas informações sobre os programas que eles usam e optar por um. No Brasil, os programas SYSTAT (Systat Software, Inc, San Jose, EUA, www.systat.com) e STATISTICA (Statsoft Inc., Tulsa, EUA, www.statsoft.com) são bastante usados, embora bastante caros. Uma alternativa brasileira gratuita é o BIOSTAT (Sociedade Civil Mamirauá, <http://www.mamiraua.org.br>).

As versões recentes dos programas mais comuns de estatística geralmente incluem análises multivariadas. Entretanto, existem programas específicos. Um programa fácil de usar e não muito caro é o PC-ORD (MjM Software, Gleneden Beach, EUA, <http://home.centurytel.net/~mjm/index.htm>). Uma outra opção cuja versão para conjuntos de dados pequenos é gratuita é o MULTIV (V.D. Pillar, Dep.

Ecologia, UFRGS, Brasil, <http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br/arquivos/Software/MultivMinor/>).

Os programas citados acima são em geral voltados aos usuários que querem simplesmente fazer uma dada análise e obter, por exemplo, os valores das estatísticas desejadas e o valor de probabilidade. No caso de usuários que procuram um pouco mais do que isso, particularmente a possibilidade de desenvolver novas análises, uma excelente opção é o Ambiente de Programação R (R Development Core Team 2007, www.r-project.org). Ele é bastante diferente dos pacotes citados acima a começar pelo fato que não se usa muito o *mouse*. Todas as análises são feitas digitando-se os comandos. Você tem que investir um tempo inicial para aprender os comandos iniciais e a lógica do programa. Entretanto, após a aquisição destes conhecimentos básicos, você poderá usar o R não só para fazer suas análises univariadas ou multivariadas, mas também no (1) gerenciamento de dados, (2) programação de análises que você está desenvolvendo, (3) programação de análises existentes em programas que você não tem acesso e (4) estudo dos métodos em si. O passo inicial para uso do R é obter uma cópia na internet e estudar o manual introdutório disponível no menu de ajuda do programa.

Um iniciante ganhará uma boa base estatística após leitura de diversos livros e realização de diversas análises com conjuntos reais e artificiais. Existem diversos livros de análises univariadas e multivariadas, tanto em Inglês quanto em Português. Sugestões para o iniciante em análises univariadas são os livros de Gotelli & Ellison (2004) e de Box *et al.* (1978). O primeiro deles é particularmente interessante para aplicações em Ecologia. Para estudos mais detalhados, embora ainda de fácil entendimento, recomendamos o livro de Kutner *et al.* (2004) que além de descrever detalhadamente os métodos oferece uma abordagem de Modelos Lineares. Para análises multivariadas, uma visão geral pode ser encontrada em Manly (2004). Em Português, Bini (2004), Valentin (1995, 2000) e a tradução do livro de Manly (2008) fornecem uma breve visão geral. Para descrições mais detalhadas um livro excelente é o de Legendre & Legendre (1998).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este artigo abordou um grande número de análises e, dado o espaço restrito, apenas a idéia principal das

análises foram descritas. Embora não se possa esperar que apenas este artigo seja suficiente para um bom uso das análises descritas, esperamos que o leitor possa usar o mesmo como um guia introdutório. Neste sentido, as referências citadas devem ser de grande auxílio.

Esperamos também ter passado a mensagem sobre a importância do planejamento de um trabalho e, associado a este planejamento, a necessidade de se conhecer um pouco das análises estatísticas disponíveis. Embora alguns leitores tenham aversão a números e Estatística, lembramos que a lógica da maioria das análises não necessita de 'números' para ser entendida. Ainda, para a maioria das análises discutidas neste artigo o conhecimento de matemática exigido é mínimo, e inclui as quatro operações básicas, raiz quadrada e logaritmos. Alguns leitores poderão também pensar que eles gostam/necessitam de conhecimentos sobre Biomonitoramento (ou Ecologia geral) e neste caso para que estudar Estatística? A resposta é simples. Estatística é, para nós, uma ferramenta de trabalho. É difícil ser um bom profissional sem saber manejar uma de suas principais ferramentas de trabalho.

AGRADECIMENTOS. Luis M. Bini fez diversas sugestões ao texto. Durante a redação deste artigo ASM e LUH receberam auxílio do CNPq (proc. 476304/2007-5) e ASM recebeu auxílio do International Foundation for Science (IFS A/4107-1, www.ifs.se).

REFERÊNCIAS

- ARSCOTT, D.B.; JACKSON, J.K. & KRATZER, E.B. 2006. Role of rarity and taxonomic resolution in a regional and spatial analysis of stream macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society* 25: 977-997.
- BAILEY, R.C.; NORRIS, R.H. & REYNOLDS, T.B. 2001. Taxonomic resolution of benthic macroinvertebrate communities in bioassessments. *Journal of the North American Benthological Society* 20: 280-286.
- BAPTISTA, D.F.; BUSS, D.F.; EGLER, M.; GIOVANELLI, A.; SILVEIRA, M.P. & NESSIMIAN, J.L. 2007. A multimetric index based on benthic macroinvertebrates for evaluation of Atlantic Forest streams at Rio de Janeiro State, Brazil. *Hydrobiologia* 575: 83-94.
- BEISEL, J.-N.; USSEGLIO-POLATERA, P.; BACHMANN, V. & MORETEAU, J.-C. 2003. A comparative analysis of evenness index sensitivity. *International Review of Hydrobiology* 88: 3-15.
- BINI, L.M. 2004. Análises multivariadas e Limnologia: Exploração, síntese e inferência de um mundo aquático complexo.

- Pp. 73-107. In C.E.M. Bicudo & D.C. Bicudo (eds), *Amostragem em Limnologia*. Rima, São Carlos
- BOWMAN, M.F. & BAILEY, R.C. 1997. Does taxonomic resolution affect the multivariate description of the structure of freshwater benthic macroinvertebrate communities? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 1802-1807.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G. & HUNTER, J.S. 1978. *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. John Wiley & Sons, New York.
- CAO, Y.; WILLIAMS, D.D. & WILLIAMS, N.E. 1998. How important are rare species in aquatic community ecology and bioassessment? *Limnology and Oceanography* 43: 1403-1409.
- CAO, Y.; LARSEN, D.P. & THORNE, R.ST-J. 2001. Rare species in multivariate analysis for bioassessment: some considerations. *Journal of the North American Benthological Society* 20: 144-153.
- CARTER, J.L. & RESH, V.H. 2001. After site selection and before data analysis: sampling, sorting, and laboratory procedures used in stream benthic macroinvertebrate monitoring programs by USA state agencies. *Journal of the North American Benthological Society* 20: 658-682.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 2005. IQA - Índice de qualidade das águas. Acesso em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/indice_iap_iqa.asp.
- CHESSMAN, B.; WILLIAMS, S. & BESLEY, C. 2001. Bioassessment of streams with macroinvertebrates: effect of sampled habitat and taxonomic resolution. *Journal of the North American Benthological Society* 26: 546-565.
- CLARKE, K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18: 117-143.
- COURTEMANCH, D.L. 1996. Commentary on the subsampling procedures used for rapid bioassessments. *Journal of the North American Benthological Society* 15: 381-385.
- DAY, R.W. & QUINN, G. P. 1989. Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology. *Ecological Monographs* 59: 433-463.
- FAITH, D.P.; MINCHIN, P.R. & BELBIN, L. 1987. Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance. *Vegetatio* 69: 57-68.
- FISHER, R.A.; CORBET, A.S. & WILLIAMS, C.B. 1943. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *Journal of Animal Ecology* 12: 42-58.
- FLEITUCH, T.; SOSZKA, H.; KUDELSKA, D. & KOWNACKI, A. 2002. Macroinvertebrates as indicators of water quality in rivers: a scientific basis for Polish standard method. *Archiv fur Hydrobiologie Supplement* 141: 225-239.
- FOWLER, J. & COHEN, L. 1990. *Practical statistics for field biology*. Open University Press, Buckingham.
- FURSE, M.T.; MOSS, D.; WRIGHT, J.F. & ARMITAGE, P.D. 1984. The influence of seasonal and taxonomic factors on the ordination and classification of running-water sites in Great Britain and on the prediction of their macro-invertebrate communities. *Freshwater Biology* 14: 257-280.
- GERRITSEN, J. 1995. Additive biological indices for resource management. *Journal of the North American Benthological Society* 14: 451-457.
- GOTELLI, N.J. & COLWELL, R.K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4: 379-391.
- GOTELLI, N.J. & ELLISON, A.M. 2004. *A Primer of Ecological Statistics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA. 510 p.
- GRAHAM, M.H. 2003. Confronting multicollinearity in ecological multiple regression. *Ecology* 84: 2809-2815.
- GRASSLE, J.F. & SMITH, W. 1976. A similarity measure sensitive to the contribution of rare species and its use in investigation of variation in marine benthic communities. *Oecologia* 25: 13-22.
- HEPP, L.U. & RESTELLO, R.M. 2007. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores da qualidade das águas do Alto Uruguai Gaúcho. Pp. 75-86 In. Zakrzewski, S.B., *Conservação e uso sustentável da água: múltiplos olhares*. Edifapes, Erechim.
- HILL, B.H.; STEVENSON, R.J.; PAN, Y.; HERLIHY, A.T.; KAUFMANN, P.R. & JOHNSON, C.B. 2001. Comparison of correlations between environmental characteristics and stream diatom assemblages characterized at genus and species levels. *Journal of the North American Benthological Society* 20: 299-310.
- HURLBERT, S.H. 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* 52: 577-586.
- HURLBERT, S.H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* 54: 187-211.
- IVES, A.R. & KLOPFER, E.D. 1997. Spatial variation in abundance created by stochastic temporal variation. *Ecology* 78: 1907-1913.
- JACKSON, D.A. 1993. Stopping rules in principal component analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology* 74: 2204-2214.
- KARR, J.R. & CHU, E.W. 1999. *Restoring life in running waters*. Island Press, Washington.

- KEATING, K.A.; QUINN, J.F.; IVIE, M.A. & IVIE, L. 1998. Estimating the effectiveness of further sampling in species inventories. *Ecological Applications* 8: 1239–1249.
- KOZŁOWSKI, G. 2008. Is the global conservation status assessment of a threatened taxon a utopia? *Biodiversity and Conservation* 17: 445–448.
- KUTNER, M.H.; NACHTSHEIM, C.J.; NETER, L. & LI, W. 2004. Applied linear statistical models (Fifth Edition). McGraw-Hill, Boston. 1396p.
- LEGENDRE, P. & LEGENDRE, L. 1998. Numerical Ecology. Elsevier, Amsterdam.
- LENAT, D.R. & RESH, V.H. 2001. Taxonomy and stream ecology - The benefits of genus- and species-level identifications. *Journal of the North American Benthological Society* 20: 287-298.
- LYDY, M. J.; CRAWFORD, C.G. & FREY, J.W. 2000. A comparison of selected diversity, similarity, and biotic indices for detecting changes in benthic-invertebrate community structure and stream quality. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 469-479.
- MAGNUSSON, W.E. & MOURÃO, G. 2003. Estatística sem Matemática. A ligação entre as questões e a análise. Editora Planta. Londrina.
- MAGURRAN, A.E. 2004. Measuring Biological Diversity. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- MANDAVILLE, S.M. 2002. Benthic macroinvertebrates in freshwaters – Taxa tolerance values, metrics and protocols. Soil & Conservation Society of Metro Halifax, Nova Scotia. 48p.
- MANLY, B.F.J. 1997. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology (Second Edition). Chapman & Hall, London. 399p.
- MANLY, B.F.J. 2004. Multivariate Statistical Methods: A Primer (Third Edition). Chapman & Hall, London. 208p.
- MANLY, B.J.F. 2008. Métodos Estatísticos Multivariados. Uma Introdução (Terceira Edição). Artmed, Porto Alegre. 229p.
- MARCHANT, R. 1999. How important are rare species in aquatic community ecology and bioassessment? A comment on the conclusions of Cao *et al.* *Limnology and Oceanography* 44: 1840-1841.
- MARCHANT, R.; BARMUTA, L.A. & CHESSMAN, B.C. 1995. Influence of sample quantification and taxonomic resolution on the ordination of macroinvertebrate communities from running waters in Victoria, Australia. *Marine and Freshwater Research* 46: 501-506.
- MARCHANT, R. 2002. Do rare species have any place in multivariate analysis for bioassessment? *Journal of the North American Benthological Society* 21: 311–313.
- MCCUNE, B. 1997. Influence of noisy environmental data on canonical correspondence analysis. *Ecology* 78: 2617-2623.
- MELO, A.S. 2004. A critic of the use of jackknife and related non-parametric techniques to estimate species richness in assemblages. *Community Ecology* 5: 149-157.
- MELO, A.S. 2005. Effects of taxonomic and numeric resolution on the ability to detect ecological patterns at a local scale using stream macroinvertebrates. *Archiv fur Hydrobiologie* 164: 309-323.
- MELO, A.S. 2008. O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade num índice de diversidade? *Biota Neotropica* 8: <http://www.biotaneotropica.org.br/v8n3/pt/abstract?article+bn00108032008>
- MELO, A.S.; PEREIRA, R.A.S.; SANTOS, A.J.; SHEPHERD, G.J.; MACHADO, G.; MEDEIROS, H.F. & SAWAYA, R.J. 2003. Comparing species richness among assemblages using sample units: why not use extrapolation methods to standardize different sample sizes? *Oikos* 101: 398– 410.
- MINCHIN, P.R.. 1987. An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination. *Vegetatio* 69: 89-107.
- NORRIS, R.H. 1995. Biological monitoring: the dilemma of data analysis. *Journal of the North American Benthological Society* 14: 440-450.
- NORRIS, R.H. & GEORGES, A. 1993. Analysis and interpretation of benthic macroinvertebrates surveys. Pp. 234-286. In D.M. Rosenberg & V.H. Resh (eds.), *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman and Hall, New York. 461 p.
- PALMER, M.W. 1993. Putting things in even better order: the advantages of canonical correspondence analysis. *Ecology* 74: 2215-2230.
- PILLAR, V.D.P. 1999. The bootstrapped ordination re-examined. *Journal of Vegetation Science* 10: 895-902.
- PILLAR, V.D. 2004. Suficiência amostral. Pp. 25-43. In C.E.M. Bicudo & D.C. Bicudo (eds), *Amostragem em Limnologia*. Rima, São Carlos.
- PILLAR, V.D. & ORLOCI., O. 1996. On randomization testing in vegetation science: multifactor comparisons of relevé groups. *Journal of Vegetation Science* 7: 585–592.
- PLAFKIN, J.L.; BARBOUR, M.T.; PORTER, K.D.; GROSS, S.K. & HUGHES, R.M. 1989. Rapid bioassessment protocols for use in streams and rivers: benthic macroinvertebrates and fish. US Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2007). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

- RESH, V.H.; BÊCHE, L.A. & MCELRAVY, E.P. 2005. How common are rare taxa in long-term benthic macroinvertebrate surveys? *Journal of the North American Benthological Society* 24: 976–989.
- SOLER, J.M.P. 2004. Análise estatística univariada. Pp. 45-71. In C.E.M. Bicudo & D.C. Bicudo (eds), Amostragem em Limnologia. Rima, São Carlos.
- TER BRAAK, C.J.F. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* 67: 1167-1179.
- THORNE, R.ST.J.; WILLIAMS, W.P. & CAO, Y. 1999. The influence of data transformations on biological monitoring studies using macroinvertebrates. *Water Research* 33: 343–350.
- TÓTHMÉRÉSZ, B. 1995. Comparison of different methods for diversity ordering. *Journal of Vegetation Science* 6: 283-290.
- UNDERWOOD, A.J. 1997. Experiments in Ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press, Cambridge.
- VALENTIN, J.L. 1995. Agrupamento e ordenação. Pp. 27-55. In P.R. Peres-Neto, J.L. Valentin & F.A.S. Fernandez (eds), Tópicos em Tratamento de Dados Biológicos. Série Oecologia Brasiliensis. PPGE/UFRJ, Rio de Janeiro.
- VALENTIN, J.L. 2000. Ecologia Numérica. Uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. Editora Interciência. Rio de Janeiro.
- WARTON, D.I. & HUDSON, H.M. 2004. A MANOVA statistics is just as powerful as distance-based statistics, for multivariate abundances. *Ecology*, 85: 858-874.
- WASHINGTON, H.G. 1984. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Research*, 18: 653-694.
- WHITTINGHAM, M.J.; STEPHENS, P.A.; BRADBURY, R.B. & FRECKLETON, R.P. 2006. Why do we still use stepwise modelling in ecology and behaviour? *Journal of Animal Ecology* 75: 1182-1189.
- WOLDA, H. 1981. Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia*, 50: 296-302.

Submetido em 10/03/2008.

Aceito em 22/07/2008.