

# APLICACION DEL METODO DE MAXIMA VEROSIMILITUD AL ANALISIS CUANTAL

A. GIL CRIADO

Centro de Cálculo Electrónico. C. S. I. C.

M. MUÑIZ DAZA

Instituto Español de Entomología. C. S. I. C.

## INTRODUCCIÓN.

Los primeros autores que intentaron evaluar los efectos toxicológicos de productos químicos sobre insectos, lo hicieron sólo sobre la base del porcentaje de mortalidad obtenido. De hecho, esto no puede dar más que una información cualitativa.

Actualmente el método se basa en la respuesta cuantal, cuyo efecto se juzga por una reacción de todo o nada, generalmente la mortalidad o supervivencia, aunque en el ejemplo que utilizamos para su ilustración, hemos escogido como criterio la eclosión o no eclosión, al tratarse de huevos de *Dacus oleae* Gmel. y *Ceratitis capitata* Wied. Por este método, el tratamiento estadístico de los datos se aproxima a una valoración cuantitativa. Los datos requeridos son las proporciones de individuos de cada lote que reaccionan de una forma determinada. El objetivo del método es estimar la dosis mínima que se requiere para producir la muerte (no eclosión, etc.), en una población considerada. El grado de toxicidad de los productos químicos puede ser comparado sobre la base de esta dosis crítica (BUSVINE J. R., 1957).

Es nuestra intención examinar con cierto detalle los fundamentos de las técnicas empleadas en el tratamiento estadístico de la respuesta cuantal para que a los lectores de la bibliografía en castellano les sea fácil encontrar una orientación de sus trabajos en ese campo.

Sobre las bases de estas técnicas se ha elaborado, en el Centro de Cálculo Electrónico del C. S. I. C., el programa Probit-MV, escrito en lenguaje Fortran IV y procesado con la computadora IBM 360/44.

### 1. *Esquema de Bernouilli.*

En todas las pruebas se ha dispuesto de un cierto número de individuos (muestra), sometidos a la acción del producto químico (estímulo), utilizando para ello poblaciones muy adaptadas a las condiciones del experimento.

Además, y en orden a la simplificación, se supone que cada individuo responde o no al estímulo; es decir, sólo puede obtenerse uno de estos sucesos: supervivencia o mortalidad (eclosión o no eclosión).

Resumiendo, las hipótesis básicas de la población son

H — 1 *Cada individuo responde o no al estímulo, independientemente de los demás.*

H — 2 *La probabilidad de respuesta es la misma para todos los individuos.*

Si, como es usual en estos esquemas,  $p$  es la probabilidad de respuesta (mortalidad o no eclosión) y  $q = 1 - p$ , la probabilidad de no respuesta (supervivencia o eclosión), y se supone que los  $n$  individuos de la muestra se ordenan para su observación, entonces se tiene una serie de *sucesos repetidos*, cuya probabilidad viene dada por el producto

$$p q p p p \dots q q$$

donde, si el factor  $p$  se repite  $r$  veces, el factor  $q$  ha de repetirse  $n - r$  veces.

Más aún, la probabilidad de que salgan  $r$  individuos muertos (no eclosionados) y  $n - r$  vivos (eclosionados) *sin importar el orden*, es

$$\binom{n}{r} p^r q^{n-r} \quad (1.1)$$

ya que el número de permutaciones distintas que se pueden formar con  $n$  objetos, entre los que hay  $r$  iguales entre sí, y otros  $n - r$  también iguales entre sí, es

$$\binom{n}{r} = \frac{n!}{r!(n-r)!}$$

En particular,  $q^n$  es la probabilidad de que vivan (eclosionen) todos los  $n$  individuos, mientras que  $1 - q^n$  es la probabilidad de que al menos uno muera (no eclosionen).

La expresión (1.1) indica que la variable aleatoria  $r$  (*respuesta*) sigue una ley binomial, de media  $np$ , y desviación típica  $\sqrt{npq}$  (CRAMER H., 1953). Cuando  $n$  es grande, el teorema central del límite, de De Moivre y P. S. Laplace (FELLER W., 1962) permite calcular aquella expresión, de una manera aproximada con la ley normal

$$\binom{n}{r} p^r q^{n-r} \approx \frac{1}{\sqrt{2\pi n p q}} \cdot e^{-\frac{(r-np)^2}{2npq}}$$

## 2. Ecuaciones de máxima verosimilitud.

Supongamos ahora que el experimento consiste en disponer de  $\kappa$  muestras, de tamaños (\*)

$$n_1, n_2, \dots, n_\kappa$$

y que se aplican las dosis

$$\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_\kappa$$

del mismo producto químico.

Aun cuando ahora  $p$  y  $q = 1 - p$  son funciones de la dosis, podemos seguir manteniendo las hipótesis sobre la independencia. Por tanto, la probabilidad de obtener respuestas

$$r_1, r_2, \dots, r_\kappa$$

se calcula mediante el producto

$$L = \prod_{i=1}^{\kappa} \binom{n_i}{r_i} p^{r_i} q^{n_i - r_i}$$

llamado *verosimilitud* por FISHER (FISHER R. A., 1922 y FISHER R. A., 1925).

En particular, si suponemos que las probabilidades  $p$ , en todas las muestras, dependen de dos parámetros,  $\theta_1$  y  $\theta_2$ , el problema de estimarlos es de gran importancia teórica y práctica. Una manera de hacerlo consiste en imponer la condición de que la cantidad  $L$  sea máxima, lo que equivale a hacer máximo su logaritmo neperiano

$$\log L = \text{const.} + \sum_{i=1}^{\kappa} r_i \log p + \sum_{i=1}^{\kappa} (n_i - r_i) \log q$$

Las condiciones necesarias para alcanzar ese máximo se obtienen anulando las derivadas parciales, respecto de los parámetros

$$\frac{\partial \log L}{\partial \theta_1} = \sum_{i=1}^{\kappa} \frac{r_i}{p} \frac{\partial p}{\partial \theta_1} + \sum_{i=1}^{\kappa} \frac{n_i - r_i}{q} \frac{\partial q}{\partial \theta_1} = 0$$

$$\frac{\partial \log L}{\partial \theta_2} = \sum_{i=1}^{\kappa} \frac{r_i}{p} \frac{\partial p}{\partial \theta_2} + \sum_{i=1}^{\kappa} \frac{n_i - r_i}{q} \frac{\partial q}{\partial \theta_2} = 0$$

(\*) En nuestros experimentos todas las muestras son de tamaño 50.

Estas ecuaciones pueden transformarse sustituyendo, en los factores de derivación parcial,  $q$  por  $1-p$ , y poniendo como denominador común  $pq$  en los otros factores. Así, queda

$$\left. \begin{aligned} \frac{\delta \log L}{\delta \theta_1} &= \sum_{i=1}^{\kappa} \frac{n_i (p_i - p)}{pq} \cdot \frac{\delta p}{\delta \theta_1} = 0 \\ \frac{\delta \log L}{\delta \theta_2} &= \sum_{i=1}^{\kappa} \frac{n_i (p_i - p)}{pq} \cdot \frac{\delta p}{\delta \theta_2} = 0 \end{aligned} \right\} \quad (2.1)$$

donde  $p_i = \frac{r_i}{n_i}$  ( $i = 1, 2, \dots, \kappa$ ) son las *frecuencias relativas* de respuesta observada, correspondientes a las  $\kappa$  muestras; no son otra cosa sino estimaciones de  $p$ .

El cálculo de los parámetros se hace partiendo de ciertas aproximaciones,  $\theta'_1$  y  $\theta'_2$  (\*), para obtener otras mejores

$$\theta''_1 = \theta'_1 + \delta \theta_1 \quad \text{y} \quad \theta''_2 = \theta'_2 + \delta \theta_2$$

lo que se consigue, de forma sencilla, tomando únicamente los términos de primer orden en los desarrollos de Taylor, correspondientes a las funciones  $\frac{\delta \log L}{\delta \theta_1}$  y  $\frac{\delta \log L}{\delta \theta_2}$  en el punto  $(\theta'_1, \theta'_2)$

$$\left. \begin{aligned} \frac{\delta \log L}{\delta \theta'_1} + \delta \theta_1 \cdot \frac{\delta^2 \log L}{\delta \theta'^2_1} + \delta \theta_2 \cdot \frac{\delta^2 \log L}{\delta \theta'_1 \delta \theta'_2} &= 0 \\ \frac{\delta \log L}{\delta \theta'_2} + \delta \theta_2 \cdot \frac{\delta^2 \log L}{\delta \theta'_1 \delta \theta'_2} + \delta \theta_1 \cdot \frac{\delta^2 \log L}{\delta \theta'^2_2} &= 0 \end{aligned} \right\} \quad (2.2)$$

Para expresar los términos de derivación parcial, de las ecuaciones (2.2), en función de  $p$  y de  $q = 1-p$ , se hace una nueva simplificación, que consiste en derivar en (2.1), anulando los términos donde aparezcan las diferencias  $p_i - p$ . De esta manera, las ecuaciones (2.2) se transforman en estas otras

(\*) Estas primeras aproximaciones son, frecuentemente, valores experimentales.

$$\begin{aligned}
 & \sum_{i=1}^k \frac{n_i (p_i - p)}{p q} \cdot \frac{\partial p}{\partial \theta'_1} - \delta \theta_1 \cdot \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{p q} \left( \frac{\partial p}{\partial \theta'_1} \right)^2 - \delta \theta_2 \cdot \\
 & \quad \cdot \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{p q} \left( \frac{\partial p}{\partial \theta'_1} \right) \left( \frac{\partial p}{\partial \theta'_2} \right) = 0 \\
 & \sum_{i=1}^k \frac{n_i (p_i - p)}{p q} \cdot \frac{\partial p}{\partial \theta'_2} - \delta \theta_1 \cdot \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{p q} \left( \frac{\partial p}{\partial \theta'_1} \right) \left( \frac{\partial p}{\partial \theta'_2} \right) - \\
 & \quad - \delta \theta_2 \cdot \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{p q} \left( \frac{\partial p}{\partial \theta'_2} \right)^2 = 0
 \end{aligned} \tag{2.3}$$

Las aproximaciones  $\theta'_1$  y  $\theta'_2$  se determinan resolviendo el sistema (2.3) en las variables  $\delta \theta_1$  y  $\delta \theta_2$ ; partiendo de aquellas aproximaciones se pueden conseguir otras nuevas, y así sucesivamente.

Este método de aproximaciones sucesivas tiene un amplio campo de aplicaciones, pero nosotros lo utilizaremos en un caso particular.

### 3. Distribución de tolerancias.

Ya hemos sugerido la hipótesis adicional de que, en nuestra población, la probabilidad de respuesta  $p$  (en todas las muestras) va a depender de dos parámetros.

Trataremos de explicar más esta hipótesis, para lo cual llamaremos *tolerancia* de un individuo a una dosis suficiente (del estímulo), tal que produce la respuesta deseada, mortalidad (no eclosión) (FINNEY D. J., 1947). Claro está que la tolerancia, en general, variará con el tiempo, pero nosotros únicamente nos hemos fijado en el valor que tiene en el instante de la prueba. Por tanto, si se aplica la dosis  $\lambda_0$ , responderán todos los individuos cuyas tolerancias sean menores que  $\lambda_0$ .

En los experimentos se observa muy frecuentemente el hecho de que la distribución de tolerancias sigue, aproximadamente, una ley normal, cuando se hace una simple transformación de la escala de medida de las dosis. Por esta razón, admitiremos una nueva hipótesis de trabajo

H — 3 La proporción esperada de individuos, que responden al aplicar la dosis  $\lambda_0$ , viene dada por

$$p = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{x_0} e^{-\frac{1}{2\sigma^2}(x-\mu)^2} dx \tag{3.1}$$

donde  $x_0 = \log_{10} \lambda_0$  (logaritmo decimal), que, como se ve, de-

pende de dos parámetros: la media  $\mu$  y la desviación típica  $\sigma$ , ambos comunes a todas las muestras del experimento. Son estos parámetros los que tratamos de estimar, con el método de máxima verosimilitud, expuesto en el párrafo anterior.

#### 4. Ecuación de probits.

El término *probit* (\*), dado por BLISS (BLISS C. I., 1934) para evitar valores negativos de la variable  $x$  (nueva escala de dosis), es bien conocido en la literatura científica. Por ello, nos ha parecido conveniente mantenerlo en nuestro lenguaje.

Recuérdese que se llama probit a la abscisa correspondiente a la probabilidad  $p$ , en una distribución normal de media  $\delta$  y desviación típica 1. Si en (3.1) hacemos la sustitución

$$\frac{x - \mu}{\sigma} = u, \quad dx = du$$

se obtiene

$$p = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{u_0} e^{-\frac{u^2}{2}} du \quad (4.1)$$

y, por consiguiente, el probit que corresponde a la proporción  $p$  es

$$y = \delta + u$$

o bien

$$y = \delta + \frac{x - \mu}{\sigma}.$$

Con esto, el problema de estimar los parámetros  $\mu$  y  $\sigma$  de la población es equivalente al de obtener la ecuación de probits

$$y = \alpha + \beta x \quad (4.2)$$

donde

$$\alpha = \delta + \frac{\mu}{\sigma} \quad y \quad \beta = \frac{1}{\sigma}.$$

(\*) Abreviatura de *probability unit*.

## 5. Algoritmo de cálculo.

En primer lugar consideraremos unas *aproximaciones razonables* (\*),  $a'$  y  $b'$ , de los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente; es decir, partiremos de la ecuación

$$y = a' + b'x.$$

Los términos de derivación parcial, de las ecuaciones (2.3), se calculan, en nuestro caso particular, de una forma sencilla, sin más que sustituir el límite superior de la integral de (4.1) por  $y - 5$ , con objeto de aplicar la regla de derivación compuesta

$$\frac{\partial p}{\partial \alpha} = \frac{\partial p}{\partial y} \cdot \frac{\partial y}{\partial \alpha} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2}(y-5)^2} = D$$

$$\frac{\partial p}{\partial \beta} = \frac{\partial p}{\partial y} \cdot \frac{\partial y}{\partial \beta} = x \cdot D$$

(D representa la ordenada de la curva normal en el punto de abscisa  $y - 5$ ).

Sustituyendo los valores de  $\frac{\partial p}{\partial \alpha}$  y  $\frac{\partial p}{\partial \beta}$  en las ecuaciones (2.3) queda

$$\left. \begin{aligned} \delta \alpha \cdot \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{pq} \cdot D_i^2 + \delta \beta \cdot \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{pq} \cdot D_i^2 x_i &= \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{pq} \left( \frac{p_i - p}{D_i} \right) D_i^2 \\ \delta \alpha \cdot \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{pq} \cdot D_i^2 x_i + \delta \beta \cdot \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{pq} \cdot D_i^2 x_i^2 &= \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{pq} \left( \frac{p_i - p}{D_i} \right) D_i^2 x_i \end{aligned} \right\} (5.1)$$

Para cada valor de  $i$ , el cálculo de  $p$ ,  $q$  y  $D_i$  se hace como sigue. Con la dosis logarítmica  $x_i$  se determina el *probit esperado*  $y_i = a' + b'x_i$ , y a continuación se pasa a la abscisa de la curva normal  $u_i = y_i - 5$ , para calcular su

(\*) Nosotros hemos tomado valores iniciales

$$a' = \frac{\sum_i y_i}{m} - b' \cdot \frac{\sum_i x_i}{m}, \quad b' = \frac{\sum_i x_i y_i - \frac{(\sum_i x_i)(\sum_i y_i)}{m}}{\sum_i x_i^2 - \frac{(\sum_i x_i)^2}{m}}$$

donde las sumas están extendidas a todos los valores de  $i$  para los que  $p_i \neq 0$  y  $p_i \neq 1$ , siendo  $m$  el número de ellos. Además  $y_i = 5 + u_i$ , siendo  $u_i$  el valor de la variable normal de media 0 y desviación típica 1.

correspondiente ordenada  $D_i$ , así como la probabilidad  $p$  de que la variable normal sea menor o igual que  $u_i$ .

Seguiremos, en líneas generales, el método de Garwood (GARWOOD F., 1940), para resolver el sistema (5.1), poniendo la primera aproximación de la ecuación de probits en la forma

$$y = c' + b'(x - \bar{x}),$$

o bien

$$y = c' + b'v,$$

donde

$$\begin{aligned} v &= x - \bar{x} \\ \bar{x} &= \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i x_i}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} && \text{(dosis ponderada)} \\ c' &= a' + b' \bar{x} \\ w_i &= \frac{D_i^2}{pq} && \text{(coeficiente de ponderación)} \end{aligned}$$

En definitiva, se trata ahora de estimar los parámetros  $\gamma$  y  $\beta$  de la nueva ecuación de probits

$$y = \gamma + \beta v.$$

Sustituyendo las nuevas variables en (5.1) se obtiene

$$\left. \begin{aligned} \delta \gamma \cdot \sum_{i=1}^k n_i w_i + \delta \beta \cdot \sum_{i=1}^k n_i w_i v_i &= \sum_{i=1}^k n_i w_i \left( \frac{p_i - p}{D_i} \right) \\ \delta \gamma \cdot \sum_{i=1}^k n_i w_i v_i + \delta \beta \cdot \sum_{i=1}^k n_i w_i v_i^2 &= \sum_{i=1}^k n_i w_i v_i \left( \frac{p_i - p}{D_i} \right) \end{aligned} \right\} \quad (5.2)$$

Ahora bien, la suma

$$\sum_{i=1}^k n_i w_i v_i = \sum_{i=1}^k n_i w_i (x_i - \bar{x}) = \sum_{i=1}^k n_i w_i x_i - \bar{x} \sum_{i=1}^k n_i w_i = 0$$

y, por tanto, el sistema (5.2) se reduce a este otro

$$\left. \begin{aligned} \delta \gamma \cdot \sum_{i=1}^k n_i w_i &= \sum_{i=1}^k n_i w_i \left( \frac{p_i - p}{D_i} \right) \\ \delta \beta \cdot \sum_{i=1}^k n_i w_i v_i^2 &= \sum_{i=1}^k n_i w_i v_i \left( \frac{p_i - p}{D_i} \right) \end{aligned} \right\} \quad (5.3)$$

que permite hallar cómodamente  $\delta \gamma$  y  $\delta \beta$ .



Para simplificar aún más los cálculos es conveniente definir como *probit de trabajo* correspondiente a la frecuencia de respuesta  $p_i$ , el valor

$$t_i = y_i + \frac{p_i - p}{D_i} \quad (5.4)$$

Obsérvese que el mayor probit de trabajo corresponde a una frecuencia de respuesta igual a 1

$$t_{\max} = y_i + \frac{q}{D_i},$$

mientras que el mínimo probit de trabajo corresponde a una frecuencia de respuesta nula

$$t_{\min} = y_i + \frac{p}{D_i}.$$

En términos de los probits de trabajo, la primera ecuación de (5.3) se resuelve así

$$\begin{aligned} \delta \gamma &= \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i (t_i - y_i)}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i t_i - \sum_{i=1}^k n_i w_i (c' + b' v_i)}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} = \\ &= \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} - c' \end{aligned}$$

siendo las nuevas estimaciones de  $\gamma$  y  $\alpha$ , respectivamente

$$c'' = c' + \delta \gamma = \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} = \bar{t} \quad (5.5)$$

y

$$a'' = c'' - b' \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} - b' \cdot \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i x_i}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} \quad (5.6)$$

En cuanto a la segunda ecuación del sistema (5.3)

$$\begin{aligned} \delta\beta &= \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i v_i (t_i - y_i)}{\sum_{i=1}^k n_i w_i v_i^2} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i v_i t_i - \sum_{i=1}^k n_i w_i v_i (c' + b' v_i)}{\sum_{i=1}^k n_i w_i v_i^2} = \\ &= \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i v_i t_i - b' \sum_{i=1}^k n_i w_i v_i^2}{\sum_{i=1}^k n_i w_i v_i^2} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i v_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i w_i v_i^2} - b' = \\ &= \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i (x_i - \bar{x}) (t_i - \bar{t})}{\sum_{i=1}^k n_i w_i (x_i - \bar{x})^2} - b' \end{aligned}$$

y la nueva estimación de  $\beta$  es

$$b'' = b' + \delta\beta = \frac{\sum_{i=1}^k n_i w_i (x_i - \bar{x}) (t_i - \bar{t})}{\sum_{i=1}^k n_i w_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (5.7)$$

Cuando se utilizan las ecuaciones (5.6) y (5.7) una y otra vez se consiguen estimaciones suficientemente buenas. Nosotros hemos seguido el criterio de que la suma de las diferencias cuadráticas entre probits, calculados en tres etapas consecutivas, no supera el valor  $10^{-7}$ .

## 6. Intervalos de confianza.

En el párrafo anterior se ha visto cómo se pueden estimar los parámetros  $\gamma$  y  $\beta$  (fórmulas (5.5) y (5.7), respectivamente). Si representamos por  $c$  y  $b$  sus estimaciones en la última etapa del cálculo, el probit esperado, correspondiente a una dosis dada  $x$  (escala logarítmica), se determina con la fórmula

$$y = c + b(x - \bar{x})$$

siendo su varianza (\*):

(\*) Las varianzas de  $c$  y  $b$  son

$$\text{Var}(c) = \frac{1}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} \quad \text{y} \quad \text{Var}(b) = \frac{1}{\sum_{i=1}^k n_i w_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$\text{Var}(y) = \frac{1}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} + \frac{(x - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^k n_i w_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (6.1)$$

que es tanto mayor cuanto más alejada está la dosis  $x$  del valor  $\bar{x}$ . Más aún, una estimación de la varianza de la dosis  $x$  viene dada por

$$\text{Var}(x) = \frac{1}{b^2} \left[ \frac{1}{\sum_{i=1}^k n_i w_i} + \frac{(x - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^k n_i w_i (x_i - \bar{x})^2} \right] \quad (6.2)$$

De una manera general hemos utilizado las expresiones (6.1) y (6.2) para construir intervalos de confianza de probits esperados y sus correspondientes dosis, fijando de antemano los porcentajes de respuesta

5, 10, 20, 50, 70, 80, 90 y 95.

A cada uno de esos porcentajes le corresponde un probit esperado  $y$ , y una dosis efectiva  $x$  ( $10^x = \lambda$ ); el primero se obtiene con la curva normal, de media cero y desviación típica 1, mientras que la dosis efectiva se calcula con la ecuación de probits

$$y = a + b x$$

lo cual es lícito siempre que su pendiente  $b$  sea distinta de cero. Y aunque en términos del cálculo es irrelevante el número de dosis efectivas, hemos procurado, en todos los casos, manejar series centradas alrededor de la *dosis efectiva media*, es decir, la que causa el 50 % de respuesta.

Por último, con la  $t$  de Student, es posible construir intervalos de confianza, uno alrededor de la dosis efectiva  $x$  y otro alrededor del correspondiente probit esperado  $y$ :

$$x \pm s_x \cdot t_\alpha, \quad y \pm s_y \cdot t_\alpha \quad (6.3)$$

siendo

$$s_x = \sqrt{\text{Var}(x)}, \quad s_y = \sqrt{\text{Var}(y)}$$

$t_\alpha$  el valor de la  $t$  de Student (FISHER R. A. y YATES F., 1943) con  $k-2$  grados de libertad y  $\alpha$  el nivel de confianza; por ejemplo, si el nivel elegido es el 5 % hay una probabilidad igual a  $1 - \alpha = 0.95$  de que tanto la dosis efectiva como el probit esperado estén en los intervalos definidos por (6.3).

## 7. Fórmula de Abbott.

Hasta aquí hemos estado suponiendo, en orden a la simplificación, que la respuesta se debe únicamente al estímulo. Sin embargo, en la realidad la situación

es algo más compleja, ya que, por causas incontroladas, en todos los experimentos se encuentran individuos muertos (no eclosionados), no aptos para el estudio y que perturban la observación. Teniendo en cuenta que se trata de estudiar el efecto del estímulo en la supervivencia (eclosión), parece natural separar de antemano esos individuos no aptos (*respuesta natural*).

Hemos creído conveniente utilizar la fórmula de Abbott para corregir la respuesta observada

$$r'_i = n_i \cdot \frac{\frac{r_i}{n_i} - \frac{r_c}{n_c}}{1 - \frac{r_c}{n_c}}$$

donde  $r_i$  es la respuesta natural, que se controla en una muestra previa, de tamaño  $n_i$ .

Para justificar esta fórmula es necesario admitir una hipótesis complementaria:

H — 4 *Si un individuo muere (no eclosiona) es por causa del estímulo o por otra causa natural, pero no por ambas a la vez.*

En el lenguaje del cálculo de probabilidades se expresa diciendo que los sucesos

A (de respuesta natural)

y

B (de respuesta por efecto del estímulo)

son incompatibles; y con probabilidades

$$P_r(B) = P_r(A \cup B) - P_r(A).$$

Obsérvese que son ciertas las relaciones conjuntistas

$$B = (A \cup B) \cap \bar{\delta}(A) = B \cap \bar{\delta}(A)$$

donde  $\bar{\delta}(A)$  es el suceso complementario de A (no respuesta natural), cuya probabilidad de realizarse es  $1 - P_r(A)$ .

Por todo lo cual, *la probabilidad del suceso  $A \cup B$  (respuesta observada), condicionado por que no haya respuesta natural es*

$$P_r(A \cup B / \bar{\delta}(A)) = \frac{P_r(B)}{1 - P_r(A)} = \frac{P_r(A \cup B) - P_r(A)}{1 - P_r(A)}$$

### 8. Heterogeneidad.

Con la fórmula de Abbott se evita la heterogeneidad del material experimental, pero en cambio la respuesta observada, en las  $\kappa$  muestras, puede ser muy irregular, debido sobre todo a una fuerte dispersión de la dosificación. Para comprobarlo hemos empleado el estadístico

$$\sum_{i=1}^{\kappa} \frac{(r'_i - n_i p)^2}{n_i p q} \quad (8.1)$$

donde  $r'_i$  es la respuesta corregida con la fórmula de Abbott y  $n_i p$  es la respuesta esperada en la última etapa del cálculo.

La cantidad (8.1) se distribuye aproximadamente como una  $\chi^2$  con  $\kappa - 2$  grados de libertad, y es tanto mayor cuanto más fuerte es la dispersión en las dosis empleadas. En los casos extremos pueden encontrarse valores de  $p$ , o de  $q$ , próximos a cero.

De cualquier manera, ya sea esa cantidad grande o moderada, existe la posibilidad de construir con ella un test de significación, relativo a una *heterogeneidad compuesta*, en la que intervienen no sólo la dispersión de la dosificación, sino la discrepancia entre las respuestas observadas y las respuestas esperadas.

Incluso se pueden contrastar los probits correspondientes a las frecuencias de respuesta  $p_i$  ( $\neq 0$  y  $\neq 1$ ) con las dosis logarítmicas, mediante el coeficiente de correlación ordinario, que de alguna manera permite decidir si el método empleado es adecuado o no.

### 9. Aplicación a un ejemplo concreto.

En trabajos realizados con anterioridad (REY J., y MUÑIZ M., 1970; MUÑIZ M., 1973) se han hecho diversos estudios sobre la influencia de la presión osmótica y otros factores físico-químicos en la eclosión de huevos de *Dacus oleae* Gmel. y *Ceratitidis capitata* Wied., cuando se les somete a un tratamiento con varios productos químicos de naturaleza electrolítica o no electrolítica. Los resultados que entonces se observaron nos permitieron establecer la hipótesis de que "son los iones presentes los responsables de la acción letal sobre los huevos y no la presión osmótica de por sí". Sin embargo, estas conclusiones no fueron deducidas más que de la simple observación de tales resultados y, ahora, valiéndonos del método que hemos expuesto, queremos confirmar esta hipótesis de una forma más sólida, mediante el tratamiento estadístico de respuesta cuantal.

En los cuadros 1, 2, 3 y 4 aparecen los datos que ya figuraron en los trabajos mencionados con la salvedad de que las columnas correspondientes a presión osmótica son diferentes; además se han añadido las de mortalidad corregida.

CUADRO 1.

*Mortalidad de huevos de Dacus oleae Gmel. en diferentes soluciones de Glucosa.*

Concentración (%)	Presión Osmótica (atm.)	Huevos puestos	Huevos no eclosionados	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida (%)
4,00	5,614	360	79	21,95	1,97
8,00	11,877	470	105	22,35	2,47
12,00	18,520	320	81	25,42	6,20
16,00	25,545	600	163	27,17	8,53
20,00	32,950	350	64	18,29	0,00
24,00	40,736	440	96	21,82	1,81
32,00	45,265	437	137	31,36	13,79
40,00	75,688	340	79	23,24	3,59
56,00	116,733	350	90	25,72	6,71
Control (H <sub>2</sub> O)	—	1.080	220	20,38	—

CUADRO 2.

*Mortalidad de huevos de Dacus oleae Gmel. en diferentes soluciones de Cloruro potásico.*

Concentración (%)	Presión Osmótica (atm.)	Huevos puestos	Huevos no eclosionados	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida (%)
0,50	3,505	350	69	19,72	7,99
1,00	6,276	350	67	19,15	7,33
1,50	9,064	350	102	29,15	18,80
3,00	17,536	350	174	49,72	42,37
4,00	23,273	350	215	61,43	55,79
6,00	33,678	350	309	88,29	86,58
8,00	46,932	350	350	100,00	100,00
Control (H <sub>2</sub> O)	—	400	51	12,75	—

CUADRO 3.

*Mortalidad de huevos de Ceratitis capitata Wied. en diferentes soluciones de Glucosa.*

Concentración (%)	Presión Osmótica (atm.)	Huevos puestos	Huevos no eclosionados	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida (%)
4,00	5,614	650	47	7,24	1,63
8,00	11,877	650	48	7,39	1,79
12,00	18,520	650	44	6,77	1,13
16,00	25,545	650	63	9,70	4,24
20,00	32,950	650	49	7,54	1,95
24,00	40,736	550	49	8,91	3,40
32,00	45,265	550	44	8,00	2,44
40,00	75,688	550	47	8,55	3,02
56,00	116,733	550	77	14,00	8,80
Control (H <sub>2</sub> O)	—	650	37	5,70	—

CUADRO 4.

*Mortalidad de huevos de Ceratitis capitata Wied. en diferentes soluciones de Cloruro potásico.*

Concentración (%)	Presión Osmótica (atm.)	Huevos puestos	Huevos no eclosionados	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida (%)
4,00	23,273	600	41	6,81	2,61
8,00	46,932	600	61	10,67	6,62
12,00	71,730	600	61	10,17	6,09
16,00	97,668	600	118	19,67	16,02
20,00	124,745	600	240	40,00	37,28
24,00	152,961	400	219	54,75	52,70
Control (H <sub>2</sub> O)	—	600	26	4,33	—

Respecto a la presión osmótica hemos de aclarar que tales diferencias se deben a que sus valores se han obtenido aquí de forma más correcta, al ajustar los calculados entonces con los valores del coeficiente osmótico encontrado en la bibliografía (STOKES, 1948; ROBINSON y STOKES, 1949), a funciones polinómicas para, en su caso, poder interpolar o extrapolar los que se necesitaran, según las concentraciones de los productos utilizados.

Las ecuaciones correspondientes son:

$$\pi = -0,2679 + 1,4229 \lambda + 0,0119 \lambda^2 \quad \gamma$$

$$\pi = 0,7528 + 5,4876 \lambda + 0,0356 \lambda^2, \text{ donde } \pi \text{ es la presión osmótica (en atm.) y } \lambda \text{ la concentración de la solución (en \%)} \text{ para Glucosa y Cloruro potásico, respectivamente. Hemos añadido, por otra parte, las columnas de mortalidad corregida, puesto que son estos datos los que entran en el cálculo; tales valores se han obtenido, como ya se indicó en el párrafo 7, por aplicación de la fórmula de Abbott. Con los datos de presión osmótica (dosis) y mortalidad corregida se hicieron las gráficas de la figura 1, donde puede apreciarse que la glucosa, no electrolito, apenas ejerce acción letal sobre los huevos de ambas especies de insectos, para los niveles de dosis utilizados, mientras que el cloruro potásico, sustancia electrolítica, sí. También puede deducirse del examen de las gráficas de esta figura que, considerando el efecto tóxico de esta sal, son más sensibles a su acción los huevos de la mosca del olivo.}$$

En los cuadros 2 y 4 y en la fig. 1 observamos que una concentración del 8 % en la sal, correspondiente a una presión osmótica de 46,9 atm. produce (una vez corregida la mortalidad natural) mortalidad total en el caso de Dacus, mientras que en Ceratitis mueren sólo el 6,62 % de los huevos.

Pues bien, como vemos, estas conclusiones se deducen sólo de la simple observación de los resultados experimentales, como ya dijimos anteriormente. So-

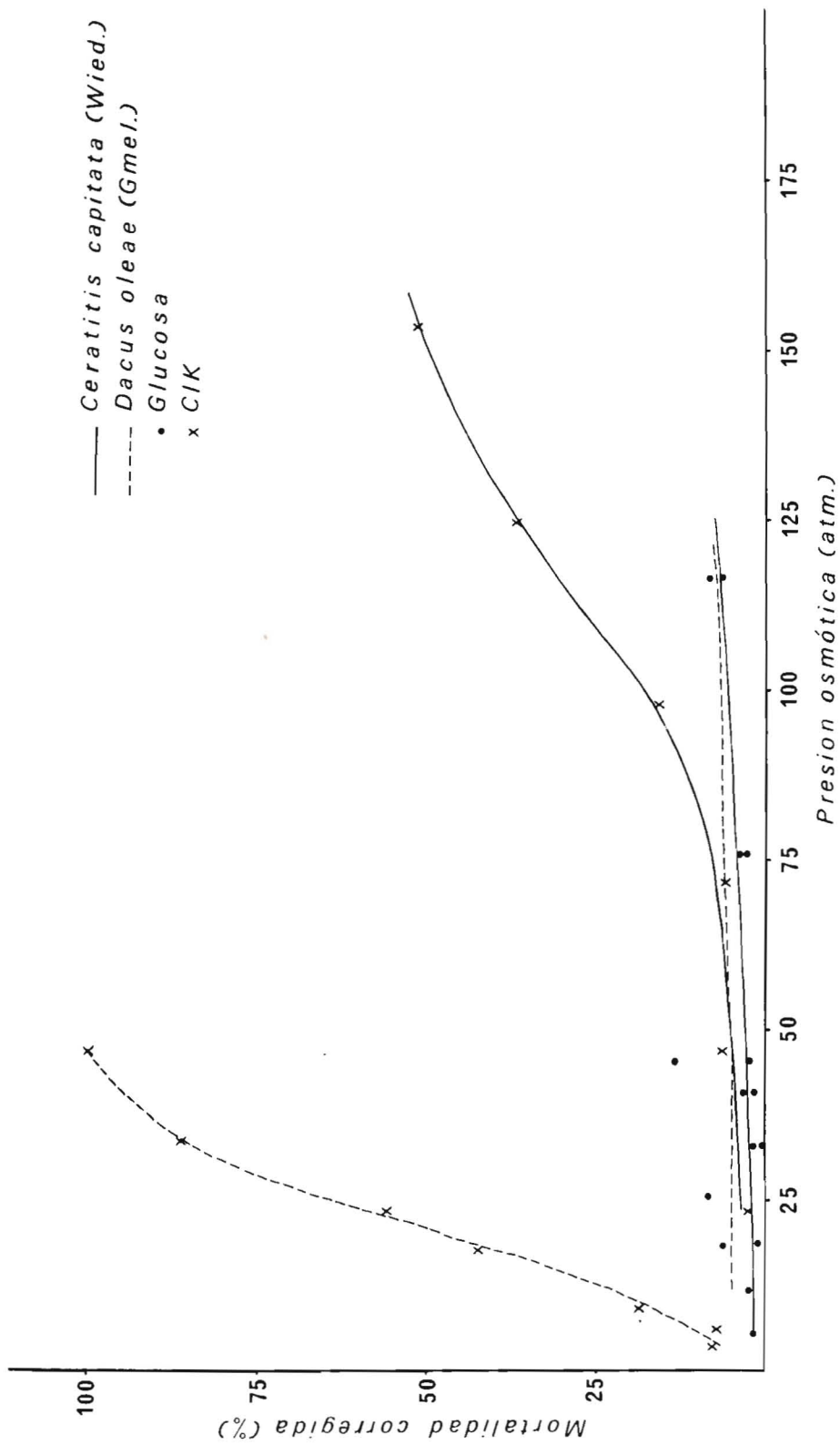


Fig. 1.—Variación de la mortalidad corregida en huevos de *Dacus oleae* Gmel. y *Ceratitis capitata* Wied. respecto a la presión osmótica de soluciones de glucosa y cloruro potásico.



metidos ahora los datos de presión osmótica, huevos puestos y huevos no eclosionados al análisis estadístico con el método de máxima verosimilitud, según el programa indicado en la introducción, se ha obtenido la información que aparece en el cuadro 5.

Las ecuaciones de probits correspondientes muestran pendientes que no difieren demasiado (3,02 para *Dacus* y 2,83 para *Ceratitis*) en el tratamiento con cloruro potásico; no obstante, hemos de tener presente que las ordenadas en el origen sí son muy diferentes (1,29 para *Dacus* y  $-1,37$  para *Ceratitis*), lo que se debe a que se han elegido dosis diferentes en ambas poblaciones con objeto de hacer más válido el método.

Representando gráficamente la variación de los probits esperados (nueva escala de mortalidades) con los logaritmos decimales de las dosis iniciales (presión osmótica en atm.) vemos (cuadro 6 y fig. 2) que si consideramos un valor cualquiera en el eje de abscisas, por ejemplo 1,5 (al que corresponde aproximadamente una concentración del 18 % de Clk), observamos un probit de 2,86 en *Ceratitis* y de 5,82 en *Dacus*, diferencia muy considerable que da idea del distinto grado de toxicidad de la sal en los huevos de ambas especies de insectos.

Como ya se indicó en el parágrafo 5, estas ecuaciones están determinadas con un elevado grado de precisión.

En el cuadro 5 aparecen también los coeficientes de correlación entre los probits observados y las dosis logarítmicas. Los valores 0,98003 y 0,92816 para *Dacus* y *Ceratitis*, con 7 y 4 grados de libertad, respectivamente, en el caso de Clk, son superiores a los mínimos que deben obtenerse, incluso al nivel de significación del 99 %, que según la tabla de correlación son 0,7977 y 0,9172 (FISHER R. A., y YATES F., 1963), lo que indica que son altamente significativos; es decir, que la relación entre aquellas variables es muy lineal.

Respecto a los altos valores que se encuentran para los factores de heterogeneidad y niveles de significación, hemos de comentar lo que ya dijimos en el parágrafo 8. El hecho de que tales valores sean altos, así como los del coeficiente de correlación, indican una fuerte dispersión en la dosificación.

Asimismo se incluyen en la información de los análisis la dosis letal al 50 % y su intervalo de confianza al nivel de significación del 95 %. Podemos ver que esta dosis es mucho menor en el caso de la mosca del olivo que en la de las frutas. La obtención de este dato, así como los correspondientes a otros niveles de mortalidad que no incluimos en el cuadro porque resultaría demasiado extenso, pero que aparece en la información del análisis, es de gran utilidad, ya que permite conocer cuál es la dosis que produce el 50 % de mortalidad en la población. En la bibliografía se toma como dosis típica de comparación la dosis letal al 50 %.

El significado estadístico del intervalo de confianza de las dosis letales a un nivel de significación del 95 % es que existe una probabilidad de 0.95 de que una determinada dosis letal esté en ese intervalo y, por tanto, una probabilidad igual a 0.95 de que se obtenga el porcentaje de mortalidad correspondiente en la población.

CUADRO 5.

	DACUS OLEAE GMEL.		CERATITIS CAPITATA WIED.	
	Glucosa	CIK	Glucosa	CIK
Ecuación de Probit (*)	$Y=2.87279+0.34078X$	$Y=1.28734+3.02063X$	$Y=2.24409+0.58191X$	$Y=-1.36716+2.83242X$
Correlación (**)	0.58908	0.98003	0.73575	0.92816
Factor de Heterogeneidad $X^2$	767.69	688.40	200.473	420.520
Grados de libertad	7	5	7	4
Nivel de significación	100.00000	100.00000	99.98315	100.00000
DL50 (***)	$0.17 \cdot 10^7$	17	$0.54 \cdot 10^5$	177
Intervalo de confianza de la DL50 al 95%	$0.10 \cdot 10^7 < DL50 < 0.29 \cdot 10^{10}$	$16 < DL50 < 18$	$0.30 \cdot 10^4 < DL50 < 0.29 \cdot 10^{10}$	$159 < DL50 < 197$

(\*) En estas ecuaciones, Y es el probit correspondiente a una determinada dosis logarítmica X, ya que  $X = \log_{10} \lambda$ , siendo  $\lambda$  la presión osmótica.

(\*\*) Entre los probits observados y las dosis logarítmicas.

(\*\*\*) DL50 es la dosis letal al 50 %, o sea la dosis necesaria para producir un 50 % de mortalidad (no eclosión, etc.) en la población.

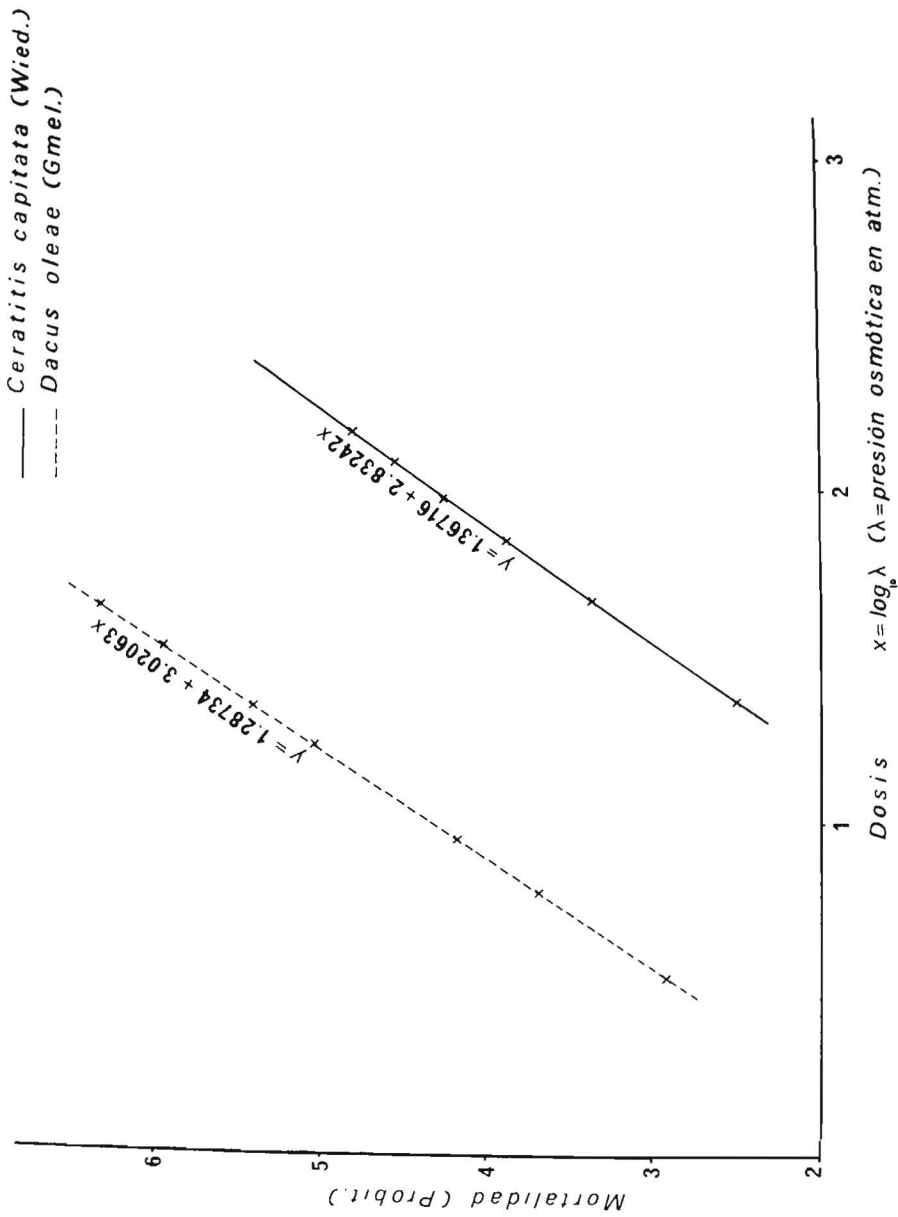


Fig. 2.—Variación de las probits (nueva escala de mortalidad) respecto a diferentes dosis logarítmicas de cloruro potásico, en huevos de *Dacus oleae* Gmel. y *Ceratitis capitata* Wied.

Todo lo anteriormente expuesto se ha referido al efecto toxicológico del cloruro potásico. En el caso de la glucosa ya indicamos antes que de la observación directa de los resultados experimentales (cuadros 1 y 3) se deduce su escasísima acción tóxica sobre los huevos, tanto de *Dacus* como de *Ceratitis*. Ante este hecho no tiene sentido la aplicación de este análisis estadístico para confirmarlo. Además, como queda reflejado en el cuadro 5, la información que se obtiene demuestra que las ecuaciones de probits no son aceptables, ya que los coeficientes de correlación para los dos insectos no son altamente significativos, aun cuando en el caso de *Ceratitis* hay significación al nivel del 95 %. Hemos de tener presente también que para la correcta aplicación del método, la relación existente entre las dosis y las mortalidades ha de corresponderse con curvas de tipo sigmoide que a primera vista reflejen acciones toxicológicas. En el caso de la glucosa, si se cumpliera esta condición nos encontraríamos en una zona muy inferior de las curvas para todos los niveles de las dosis utilizadas, no siendo correcta la extrapolación. También queda patente este hecho al observar que los intervalos de confianza de las dosis letales al 50 % son muy amplios.

CUADRO 6.

*Probits esperados correspondientes a diferentes dosis de cloruro potásico.*

<i>Dacus oleae</i> Gmel.			<i>Ceratitis capitata</i> Wied.		
$\lambda$ (atm.)	$\log_{10}\lambda$	Probit esperado	$\lambda$ (atm.)	$\log_{10}\lambda$	Probit esperado
3.505	0.54	2.93	23.273	1.37	2.50
6.276	0.80	3.70	46.932	1.67	3.37
9.064	0.96	4.18	71.730	1.85	3.89
17.536	1.24	5.04	97.668	1.99	4.27
23.273	1.37	5.47	124.745	2.09	4.57
33.678	1.54	5.95	152.961	2.18	4.82
46.932	1.67	6.34			

Podemos, pues, considerar las siguientes conclusiones:

1.<sup>a</sup> La presión osmótica de por sí no ejerce acción tóxica sobre los huevos de *Dacus oleae* Gmel. y *Ceratitis capitata* Wied. al observarse, para todos los niveles de las dosis utilizadas, que la mortalidad es prácticamente constante y de escaso significado cuando se les trata con glucosa, compuesto no disociable.

2.<sup>a</sup> En el caso del Cloruro potásico sí se aprecia una notable variación de la mortalidad según las dosis empleadas, con valores muy elevados, llegando a ser del 100 % en *Dacus* incluso a concentraciones bajas que, sin embargo, ocasionan efectos tóxicos muy inferiores en *Ceratitis*, por lo que deducimos que los huevos de *Dacus* son menos resistentes que los de *Ceratitis*.

3.<sup>a</sup> Son, pues, los iones presentes los responsables de tal acción letal.

4.<sup>a</sup> El estudio del efecto de la glucosa sobre la eclosión de los huevos de estos insectos, no es tratable con este método estadístico de análisis de probits, puesto que su acción tóxica es prácticamente nula en el intervalo de dosis utilizado, no ajustándose a los esquemas iniciales que se requieren para este tipo de estudios.

Se considera, pues, de indudable interés la aplicación práctica del método en todos los trabajos de investigación sobre este campo.

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. D. José M.<sup>a</sup> REY, por su inestimable colaboración tanto en la discusión de los resultados como en la elaboración de este trabajo. Asimismo a D. J. M. PONS, por su notable participación en los trabajos relacionados con la programación y puesta a punto de los procesos que constituyen el análisis. Y a la Srta. Isabel MARCOS, autora de las gráficas.

#### RESUMEN

Se han explicado detalladamente las bases de las técnicas empleadas en el tratamiento estadístico de la respuesta cuantal con el método de máxima verosimilitud, y su aplicación a un caso de efecto toxicológico de glucosa y cloruro potásico sobre huevos de *Dacus oleae* Gmel. y *Ceratitis capitata* Wied. Se ha elaborado un programa Probit-MV, procesado con la computadora I. B. M. 360/44 del Centro de Cálculo Electrónico del C. S. I. C. Como el método es muy adecuado para obtener información suficiente en estos estudios, hemos considerado muy interesante su exposición en castellano para los investigadores interesados en este campo.

#### SUMMARY

We have explained the basis of the techniques used in the statistical treatment of quantal response with the maximum likelihood solution, and its application to a case of the toxicological effect of the glucose and sodium chloride on eggs of *Dacus oleae* Gmel. and *Ceratitis capitata* Wied. A program, named Probit MV, has been set up for the computer I. B. M. 360/44. Because this method is very adequated to obtain enough information in this kind of studies, we have considered very interesting to expose it in spanish to the scientists interested in this field.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BLISS C. I., 1934. The method of Probits. *Science*, **79**, 38-39, 409-410.
- BUSVINE J. R., 1957. A Critical Review of the techniques for testing insecticides. Commonwealth Agricultural Bureaux. London; 167-184.
- CRAMER H., 1953. *Métodos matemáticos de Estadística*. 660 p. Ed. Aguilar, S. A. Madrid.
- FELLER W., 1962. *An Introduction to probability theory and its Applications*, vol. I, 461 p. John Wiley and sons. Inc.
- FINNEY D. J., 1947. *Probit Analysis*, 256 p. Cambridge University Press.
- FISHER R. A., 1922. On the Mathematical Foundations of Theoretical statistics. *Phil. Trans. R. Soc.*, **222**, 309-368.
- FISHER R. A., 1925. Theory of Statistical Estimation. *Proc. Camb. phil. Soc.*, **22**, 700-725.
- An. INIA / Ser. General / N. 3, 1975.

- FISHER R. A., YATES F., 1943. *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*, 2<sup>a</sup> ed., Oliver and Boyd, Edinburg.
- FISHER R. A., YATES F., 1963. *Tablas estadísticas para investigadores científicos*. p. 64. 3<sup>a</sup> ed., Aguilar, Madrid.
- GARWOOD F., 1940. The application of maximum likelihood to dosage mortality curves. *Biométrie*, **32**, 46-58.
- MUÑIZ M., 1973. Influencia de la presión osmótica en la eclosión de los huevos de *Dacus oleae* y *Ceratitis capitata*. *Boln. R. Soc. esp. Hist. nat.*, (Biol.), **71**, 155-166.
- REY J. M., MUÑIZ M., 1970. Latest investigations on the olive fly: Physiology. Sterile male technique for control of fruit flies STI/PUB/276. I. A. E. Viena.
- ROBINSON R. A., STOKES R. H., 1949. Tables of osmotic and activity coefficients of electrolytes in aqueous solution at 25°C. *Trans. Faraday Soc.*, **45**, 612-24.
- STOKES R. H., 1948. A thermodynamic study of bivalent metal halides aqueous solution. Part. XVII. Revision of data for all 2:1 electrolytes at 25°C, and discussion of results. *Trans. Faraday Soc.*, **44**, 259-307.