

## USO DE PLANÁRIAS COMO BIOINDICADORES DE QUALIDADE DAS ÁGUAS UTILIZANDO ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

Edimar Izidoro NOVAES<sup>1</sup>  
Thiago Gentil RAMIRES<sup>2</sup>  
Miriam Harumi TSUNEMI<sup>1</sup>  
Edwin Moises Marcos ORTEGA<sup>2</sup>

- RESUMO: Na literatura é discutido o uso de planárias como bioindicadores de qualidade das águas, pois diferentes dos ensaios de toxicologia clássica, os animais conseguem captar efeitos de exposição a longo prazo. Atualmente, uma das técnicas de se verificar a qualidade das águas com o uso de planárias é realizando o teste cometa. Propomos uma nova metodologia para verificar a qualidade das águas utilizando planárias, a qual consiste em acompanhar o tempo de vida das mesmas inseridas em diferentes ambientes aquáticos. No estudo presente foram utilizados os dados obtidos por uma empresa que atua no ramo petroquímico e que utiliza as águas do rio Jaguari em seu processo de produção, nos quais foram aplicadas as técnicas estatísticas de análise de sobrevivência para comparar os níveis de poluentes tóxicos nos diferentes ambientes aquáticos. Também propomos um modelo de regressão para realizar inferências nos tempos de vida das planárias para os diferentes locais dos quais foram coletadas as amostras de água. O novo método proposto apresentou uma forma eficiente e de baixo custo no uso das planárias da espécie *Dugesia Tigrina* como bioindicadores de qualidade de águas.
- PALAVRAS-CHAVE: *Dugesia Tigrina*; análise de sobrevivência; bioindicadores.

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Bioestatística, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: [enmatematica@ibb.unesp.br](mailto:enmatematica@ibb.unesp.br), [mtsunemi@ibb.unesp.br](mailto:mtsunemi@ibb.unesp.br)

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo - USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, Departamento de Ciências Exatas, CEP: 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil. E-mail: [thiagogentil@usp.br](mailto:thiagogentil@usp.br), [edwin@usp.br](mailto:edwin@usp.br)

## 1 Introdução

Os platelmintos são animais que vivem na terra a milhões de anos, contendo cerca de 20.000 espécies (Brusca, 2007). Moore (2003) relata que os platelmintos vivem principalmente em ambientes aquáticos, medem desde alguns milímetros até metros de comprimento, são animais de corpo achatado revestido de muco, com epiderme geralmente ciliada, são carnívoros e se alimentam de animais vivos ou mortos, tendo grande importância na degradação da matéria orgânica. Alguns exemplos de platelmintos são as planárias, tênias e esquistossomos.

Na literatura é discutido o uso de planárias como bioindicadores de qualidade das águas, pois diferentes dos ensaios de toxicologia clássica, os animais conseguem captar efeitos de exposição a longo prazo. Outros motivos para se tornarem indicadores de amostras ambientais é por serem de fácil cultivo, terem custo baixo e, por serem organismos considerados simples do ponto de vista filogenético, esses animais podem ser utilizados como indicativo de risco de exposição a poluentes para organismos mais complexos (Lau 2002).

Diversos estudos sobre a sensibilidade dos platelmintos vem sendo apresentados na literatura. Sáfyadi (1993) relata a sensibilidade das planárias *Dugesia Tigrina* ao entrarem em contato com produtos tóxicos e compostos metálicos (mercúrio, cobre, cádmio, cromo e zinco). Lau (1998) testou a sensibilidade genotóxica de planárias ao metil metanossulfonato (MMS) e Alvarado e Newmark (1998) relatam sobre a capacidade de regeneração das planárias de água doce quando entram em contato com poluentes. Estudos mais recentes, como o de Ribeiro (2012), relatam que as planárias de água doce possuem vasta distribuição geográfica, plasticidade biológica, facilidade de cultivo em laboratório, sensibilidade a contaminantes diversos e capacidade regenerativa, por isso vem sendo utilizadas como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos.

Em especial destaca-se a planária *Dugesia Tigrina*, a qual é relativamente resistente a poluição, sendo encontrada em águas paradas, pantanosas e às vezes poluídas, porém possuem alta sensibilidade genotóxica (Lau, 2002). Lau (1998) e Guecheva *et al.* (2001) apresentam resultados de experimentos que garantem que esses organismos são adequados para avaliações de genotoxicidade ambiental, especialmente para amostras de águas ou misturas complexas.

Atualmente, uma das técnicas de se verificar a qualidade das águas utilizando planárias é realizando o teste cometa. Esse teste detecta danos primários causados no DNA, ou seja, ele relaciona a quantidade de mutações genéticas a qualidade da água. Outros mecanismos para verificar mutação gênica são: teste de Ames, ensaio de Salmonella/microssoma, teste de avaliação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia* (Trad-SHM), entre outros. Lau (2002) apresenta avaliação da genotoxicidade das águas da bacia do Guaíba-RS utilizando planárias, no qual foi possível detectar mutações genéticas, por meio do teste cometa, em planárias que ficaram expostas a um novo ambiente aquático por 12 dias.

No Brasil, empresas utilizam águas dos rios em suas atividades de produção, sendo as mesmas devolvida aos rios após um tratamento específico. Nos processos

industriais, as águas dos rios são destinadas, na maior parte dos casos, para a limpeza de materiais, refrigeração de sistemas e geração de vapor. Estima-se que a cada ano acumula-se nas águas de rios cerca de 300 a 500 mil toneladas de dejetos provenientes dos efluentes industriais, que muitas vezes podem transportar resíduos tóxicos (LORA, 2002).

Desta forma, as empresas tratam as águas que por elas são utilizadas e realizam estudos para verificar se o tratamento realizado está sendo correto. Como as planárias *Dugesia Tigrina* são sensíveis aos poluentes tóxicos e possuem um longo ciclo de vida, comparar os tempos de vida das mesmas quando inseridas a um novo ambiente aquático, possivelmente contaminado com produtos tóxicos, foi uma das maneiras encontradas para avaliar a qualidade da água que retorna aos rios. Diferente das técnicas usuais, a nova metodologia proposta neste estudo para avaliação toxicológica das águas possui um custo relativamente mais baixo por dispensar a parte laboratorial.

Sendo assim, o objetivo principal deste estudo é propor uma nova metodologia para verificar a qualidade das águas, em termos de toxicidade, utilizando métodos estatísticos de análise de sobrevivência. Essa técnica consiste em comparar os tempos de vida das planárias *Dugesia Tigrina* em dois ambientes aquáticos, sendo um deles considerado como controle e o outro após sofrer alguma perturbação. Essa técnica também pode ser expandida para comparar o nível de poluentes tóxicos em diferentes ambientes aquáticos distintos. Para exemplificar a nova metodologia, foi realizado um estudo comparando a influência de diferentes lugares de coleta de água, no tempo de vida das planárias. Também propomos um modelo de regressão com o intuito de realizar inferências nos tempos de vida dos animais para cada local onde foi coletado a amostra de água.

## 2 Materiais e métodos

No estudo presente, foram utilizados os dados de uma empresa que atua no ramo petroquímico, localizada na cidade de Paulínia no interior do estado de São Paulo. A empresa capta a água no rio Jaguari para utilizar em suas atividades de produção e, após realizar um tratamento específico, devolve a água ao rio novamente.

O rio Jaguari possui suas nascentes no estado de Minas Gerais, nos municípios de Sapucaí-Mirim, Camanducaia e Itapeva e, ao entrar em território paulista, o rio é represado, sendo este um dos reservatórios integrantes do sistema produtor de água chamado Cantareira, construído para permitir a reversão de água da bacia do Piracicaba para a bacia do Alto Tietê, como reforço ao abastecimento público da Região Metropolitana de São Paulo (DAEE, 1986, e Sabesp, 1989).

Para verificar a qualidade da água devolvida ao rio Jaguari, a empresa retira amostras de locais onde é coletada a água para o uso e onde a água é devolvida ao rio após ser usada pela indústria, periodicamente. Para efeito de comparação ou controle de influência geográfica, a empresa também realiza amostras do rio Atibaia, rio que também situa-se na cidade de Paulínia. Os locais considerados nesse estudo foram os mesmos considerados pela empresa. Também consideramos o local no qual

são criados os platelmintos, pois o mesmo apresenta características ótimas para a criação e pode ser utilizado como controle. Sendo assim denota-se a variável *local* formada por 5 níveis, sendo eles:

**Local 0** - Criadouro;

**Local 1** - Local onde ocorre a captação da água do rio Jaguarí para uso na empresa;

**Local 3** - Local onde é devolvida a água tratada ao rio Jaguarí após o uso na empresa;

**Local 4** - Nascente do rio Atibaia;

**Local 8** - Jusante do rio Atibaia, localizada a 500 metros da nascente.

Para realizar o experimento foram coletadas quatro amostras de água de cada local e, em cada amostra, foram inseridas dez planárias da espécie *Dugesia Tigrina* com idades entre 0 e 15 dias, oriundas do local 0, totalizando os 200 animais que foram disponibilizados para o estudo. Para efeito de controle local, as amostras de água foram obtidas todas no mesmo dia.

Os platelmintos foram criados em recipientes com água mineral a uma temperatura de  $26^{\circ}C$ , cobertos com tecido preto para simular fundo de rios e lagos e são alimentados uma vez por semana com fígado bovino fresco, sendo considerado um local ótimo para a cultura dos mesmos. O tempo de vida dos animais foi escolhido com o limite de até 15 dias para controlar a homogeneidade entre os animais que iriam fazer parte do estudo.

Na realização do experimento, os tempos de vida dos platelmintos foram medidos em dias, fixado por um período de 30 dias para o término da pesquisa, pois os mesmos apresentam longa duração quando não submetidos a efeitos tóxicos e, sendo assim, foram considerados como censurados os tempos de vida dos animais que não obtiveram o evento de interesse (óbito) após o período fixado. Esse tipo de experimento caracteriza, em estatística, a análise de sobrevivência, a qual leva em consideração o tempo até o evento de interesse, assim como incorpora no estudo a presença de dados censurados, também chamados de observações parciais.

Pertencente as técnicas de análise de sobrevivência, o estimador empírico da função de sobrevivência, normalmente denominado de estimador de Kaplan-Meier (KM) (Kaplan e Meier, 1958), destaca-se por incorporar em suas estimativas as informações parcialmente observadas (censuras). Seja  $T$  a variável aleatória que representa os tempos de falha de uma determinada população, a função de sobrevivência é definida por  $S(t) = P[T > t]$ , ou seja, as estimativas de KM  $\hat{S}(t)$  representam as probabilidades estimadas de que um elemento de uma determinada população seja superior ao tempo  $t$ .

Na maioria dos casos, o interesse se dá em comparar as diferentes curvas de sobrevivência e, sendo assim, as estimativas  $\hat{S}(t)$  são construídas para cada grupo, considerando-os independentes. Para testar a hipótese de que os grupos possuem a mesma curva de sobrevivência, ou seja, que os elementos de grupos distintos possuam as mesmas probabilidades de não falhar após um determinado tempo  $t$ , é utilizado o teste de log-rank. O teste foi proposto por Mantel (1966), o qual é apropriado para observações censuradas apresentando como hipótese de nulidade não haver diferença entre as curvas de sobrevivência de todos os grupos, porém

também pode ser utilizado para comparar apenas as curvas de sobrevivência de pares de grupos.

Na prática é comum o uso de modelos de regressão para representar as curvas de sobrevivência estimadas, pois com eles se torna possível a interpretação dos parâmetros regressivos além de permitir realizar inferências sobre a população. A relação existente entre a função de sobrevivência e a função densidade de probabilidade  $f(t)$  é dada por  $f(t) = \frac{d-S(t)}{dt}$ , desde que  $f(t)$  seja positiva e contínua.

Para a seleção do modelo que irá representar a função de sobrevivência é usual realizar o teste da razão de verossimilhanças (TRV), porém esse teste só pode ser utilizado para modelos encaixados também conhecidos como aninhados. Caso os modelos não sejam encaixados faz-se necessário o uso do critério de informação de Akaike (AIC) (BOZDOGAN, 1987) para a comparação dos modelos, no qual quanto menor a estimativa do valor de AIC melhor é o modelo. Outro método utilizado é o critério de informação bayesiano (BIC) (SCHWARZ, 1978), o qual apresenta características semelhantes ao AIC, porém penalizando mais a quantidade de parâmetros do modelo.

### 3 Resultados e discussão

Em uma análise inicial dos tempos de vida das planárias, foi possível observar a porcentagem de observações censuradas, ou seja, a proporção de animais que não entraram em óbito para cada local do qual a amostra de água foi retirada. Como as planárias *Dugesia Tigrina* possuem um longo ciclo de vida, era esperado que a porcentagem de dados censurados fosse alta. Para o local 0 (criadouro) foram apresentados apenas 2 falhas, totalizado 95% de dados censurados a direita. Os locais 1 e 3, relativos ao rio Jaguari, antes e após o uso, apresentaram 82,5% e 70% de censura a direita, respectivamente. Os locais 4 e 8, relativos ao rio Atibaia, nascente e jusante, apresentaram 75% e 90% de censura a direita, respectivamente.

Com o objetivo de comparar os tempos de vida das planárias da espécie *Dugesia Tigrina* para os diferentes locais de coleta de água, foram calculadas as estimativas de KM, considerando como grupos os níveis da covariável “local”. As curvas de sobrevivência para cada grupo são apresentadas na Figura 1.

Com a Figura 1 é possível observar que o local 3 foi o que apresentou as menores probabilidades das planárias sobreviverem acima que qualquer tempo contido no intervalo [0;30] dias. Observa-se também que a probabilidade das planárias sobreviverem acima de 25 dias, para os locais 1 e 3, é de aproximadamente 0.825 e 0.725, respectivamente.

Após o cálculo das estimativas de KM, foi realizado o teste de log-rank para verificar a existência de diferença significativa entre as curvas de sobrevivência para os diferentes locais. O valor-p encontrado foi de  $p = 0,014$  e, considerando o nível de significância como  $\alpha = 0,05$ , a hipótese nula de que não existe diferença significativa entre os níveis da covariável *local* foi rejeitada.

Como foi observado a existência de diferença significativa nos tempos de vida das planárias, considerando os diferentes locais, foi necessário realizar uma análise

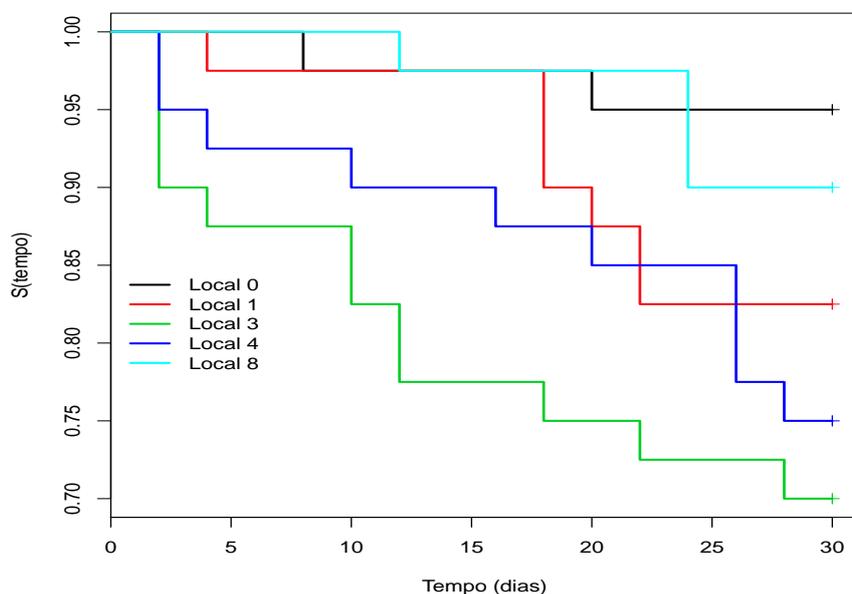


Figura 1 - Estimativas de KM *versus* tempo, para os diferentes locais.

para detectar e agrupar as curvas que não apresentaram diferença. Com a Figura 1 é possível observar que a curva da função de sobrevivência formada pelo local 0 é similar a curva formada pelo local 8, ou seja, as planárias inseridas no local 0, controle, e as planárias inseridas no local 8, jusante do rio Atibaia, possuem o tempo de duração vida muito próximo ao longo dos 30 dias do estudo. O mesmo ocorreu com os locais 1 e 4, porém faz-se necessário o uso do teste de log-rank para confirmar que não existe diferença entre os pares dos locais indicados.

Utilizando o teste de log-rank para a confirmação com maior rigor dos comportamentos parecidos dos tempos de vida, o valor-p encontrado quando comparado as curvas de sobrevivência dos locais 0 *versus* 8 foi de  $p = 0,423$  e o valor-p obtido quando comparado os locais 1 *versus* 4 foi de  $p = 0,416$ . Sendo assim, podemos concluir que os animais inseridos no local 0 e 8, assim como os animais inseridos no local 1 e 4 possuem a mesma curva de sobrevivência ao nível de 5% de significância.

Com o objetivo de construir um modelo de regressão para representar as estimativas das curvas de sobrevivência para cada local de amostra de água, foram escolhidos os modelos mais utilizados na literatura, sendo eles os modelos paramétricos de regressão exponencial, Weibull e log-normal. Como verificou-se não haver diferença significativa entre as curvas de sobrevivência para os pares (locais 0 e local 8) assim como (local 1 e local 4), os mesmos foram considerados como fazendo parte de um novo grupo. A idéia de agrupar os locais tem como o objetivo diminuir

o número de parâmetros do modelo de regressão, já que as estimativas dos mesmos serão próximas e estatisticamente iguais. Sendo assim, foram formado dois novos grupos dados por: **grupo 1** composto pelo local 0 e local 8; **grupo 2** composto pelo local 1 e local 4. Com os grupos formados, tem-se a nova variável *grupos* composta pelos níveis *grupo 1*, *grupo 2* e *local 3*, que deve ser utilizada substituindo a variável *locais*.

Para realizar a seleção dos modelos, foram verificados os critérios AIC e BIC, no qual os mesmos foram obtidos com o uso do *software* estatístico **SAS**. As estimativas dos critérios de informação, assim como os valores das funções de verossimilhança para cada modelo são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Critérios de informação, logaritmo da função de verossimilhança e resultado do TRV

Modelo	AIC	BIC	$\log(L(\theta))$	TRV	valor-p
Gama generalizada	251,22	267,71	-120,61	-	-
Exponencial	245,07	260,96	-122,53	3,848	0,145
Weibull	245,01	266,20	-122,50	3,789	0,050
Log-Normal	242,50	263,69	-121,25	1,278	0,258

Com a Tabela 1 é possível observar que o modelo exponencial apresenta o menor valor BIC enquanto o modelo log-normal apresenta o menor valor de AIC. Para a escolha do melhor modelo optou-se por realizar o ajuste do modelo gama generalizado, o qual seus parâmetros de regressão não possuem interpretação direta, porém ele contém os modelos exponencial, Weibull e log-normal como modelos encaixados, permitindo o uso do TRV para a seleção de um de seus submodelos.

Com os resultados dos testes da razão de verossimilhança, apresentados pela Tabela 1, é possível observar que os modelos exponencial e log-normal apresentaram as maiores diferenças significativas entre o modelo gama generalizado, sendo eles os mais indicados para representar os tempos de vida dos platelmintos da espécie *Dugesia Tigrina*. O modelo de regressão final escolhido foi o log-normal que apresentou o maior valor-p  $p = 0,258$ . A função de sobrevivência para o modelo de log-normal, considerando a variável *grupos* como variável explicativa, é dada por

$$S(t) = \Phi\left(\frac{-\log(\text{tempo}) + \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2}{\sigma}\right),$$

em que  $\Phi(\cdot)$  representa a função de distribuição acumulada de uma normal padrão,  $X_1$  representa a variável indicadora de grupo 1 e  $X_2$  representa a variável indicadora de grupo 2. As estimativas dos parâmetros do modelo de regressão log-normal são apresentadas pela Tabela 2 e seu ajuste apresentado pela Figura 2.

Analisando os valores das estimativas dos parâmetros do modelo log-normal apresentados na Tabela 2, observa-se que o parâmetro  $\beta_1$ , referente ao grupo 1, apresenta valor positivo, ou seja, os tempos de vida das planárias que foram adicionadas nas águas dos locais 0 e 8 apresentam expectativa de vida maior do

Tabela 2 - Estimativas, erro padrão e intervalo de confiança dos parâmetros do modelo log-normal

Parâmetro	Variável explanatória	Estimativa	Erro Padrão	LI	LS
$\beta_0$	Intercepto	4,173	0,397	3,394	4,952
$\beta_1$	grupo 1 ( $X_1$ )	1,847	0,536	0,796	2,898
$\beta_2$	grupo 2 ( $X_2$ )	0,702	0,439	-0,157	1,563
$\sigma$	-	1,776	0,249	1,349	2,340

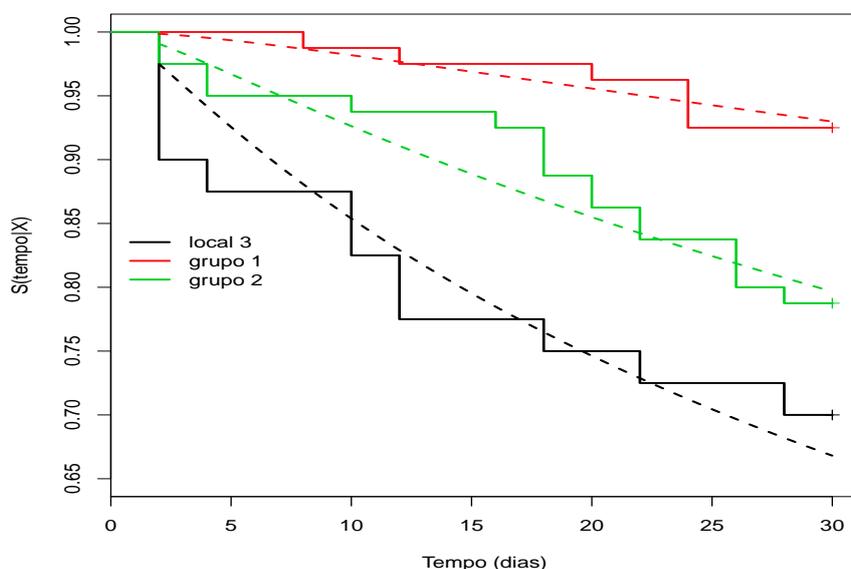


Figura 2 - Curvas de sobrevivência empírica e estimada pelo modelo log-normal.

que os mesmos adicionados nas águas do local 3, local esse considerado como local de comparação no modelo. A mesma interpretação ocorre quando verificado a estimativa do parâmetro  $\beta_2$ , que se refere ao grupo 2, e sendo assim, os locais 1 e 4 também propiciam maior tempo de vida aos platelmintos quando comparado com os mesmos inseridos nas águas do local 3.

Para realizar a interpretação dos coeficientes do modelo de regressão ajustados, Colosimo e Giolo (2006) sugerem que a comparação deve ser feita em termo das razões entre os tempos medianos estimados para cada fator de interesse.

Realizando a comparação dos tempos medianos ajustados pelo modelo log-normal para o grupo 1 e para o local 3 tem-se

$$\frac{t_{0,5}(x_1 = 1, x_2 = 0, \hat{\beta})}{t_{0,5}(x_1 = 0, x_2 = 0, \hat{\beta})} = \frac{\exp\{\sigma z_{0,5}\} \exp\{\beta_0 + \beta_1\}}{\exp\{\sigma z_{0,5}\} \exp\{\beta_0\}} = \exp\{\beta_1\} = 6,34,$$

logo o tempo mediano de vida dos platelmintos inseridos na água coletada no ambiente de controle (local 0) e na jusante do rio Atibaia (local 8) é 6,34 vezes maior que o tempo de vida mediano dos platelmintos inseridos na água utilizada pela empresa (local 3).

Observa-se analogamente à comparação anterior que o tempo mediano de vida dos platelmintos inseridos nas águas dos locais 1 e 4, relativos ao grupo 2, é aproximadamente o dobro do tempo mediano de vida dos mesmos inseridos nas águas do local 3. Por fim, foi possível observar que o tempo mediano de vida dos platelmintos inseridos nas águas do grupo 1 foi aproximadamente 3,14 vezes maior que o tempo mediano de vida dos mesmos tratados com as águas pertencentes ao grupo 2.

## Conclusões

Com base nos resultados da análise, verificou-se que os tempos medianos de vida dos platelmintos inseridos na água que é devolvida pela empresa após o uso é praticamente a metade do tempo mediano de vida dos platelmintos inseridos na água antes de ser utilizada pela empresa, indicando um aumento significativo de poluentes tóxicos existentes.

Também foi possível observar que a nascente do rio Atibaia e o local do qual a empresa capta a água para o uso possuem níveis parecidos de toxicidade e foram agrupados formando o grupo 2. Esse fato acontece pelo fato da nascente do rio Atibaia receber águas de outros rios em sua formação, sendo que as mesmas já estejam poluídas.

Sendo assim, o novo método proposto que utiliza planárias espécie *Dugesia Tigrina* como bioindicadores de qualidade de águas apresentou uma forma eficiente e de baixo custo, quando comparado aos métodos usuais. Como o novo método não consegue quantificar as taxas de produtos tóxicos presentes nas águas, ele é indicado até o momento como um método comparativo, sendo possível comparar as qualidades das águas antes e após uso, assim como detectar quais ambientes aquáticos possuem estatisticamente as mesmas, maiores ou menores quantidades de poluentes tóxicos.

Como estudo futuro pretende-se relacionar a proporção de toxicidade em ambientes aquáticos com as curvas de sobrevivência, assim sendo possível estimar os níveis de poluentes com o tempo de vida das planárias inseridas nas mesmas.

NOVAES, E. I; RAMIRES, T. G; TSUNEMI, M. H; ORTEGA, E. M. M. Use of planarians as bioindicators of water quality using survival analysis. *Rev. Bras. Biom.*, São Paulo, v.32, n.3, p.379-389, 2014.

- **ABSTRACT:** *In literature the use of planarians as bioindicators of water quality is discussed, because differently by classic toxicology tests, the animals are able to capture long term exposition effects. Currently, one of techniques to verify the water quality with the use of planarians is performing the comet assay. We propose a new methodology to verify the water quality by accompany lifetime planarians on different aquatic environments. Water of in the present study we used data obtained from a petrochemical company that uses Jaguari river on its production process. Survival Analysis was used to compare the levels of toxic pollutants on different aquatic environments. We also propose a regression model about planarian lifetime at different places from which the water samples were collected. The new proposed method presented an efficient and low cost way to use planarians of Dugesia Tigrina specie as water quality bioindicators.*
- **KEYWORDS:** *Dugesia Tigrina; survival analysis; bioindicators.*

## Referências

- ALVARADO, A. S; NEWMARK, P. A. The use of planarians to dissect the molecular basis of metazoan regeneration. *Wound Repair Regen*, Washington, v.6, n.4, p. 413-420, 1998.
- BOZDOGAN, H. Model selection and Akaike's Information Criterion (AIC): the general theory and its analytical extensions. *Psychometrika*, New York, v.52, p.345-370, 1987.
- BRUSCA, R. C; BRUSCA, P. *Invertebrados*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2007. 968p.
- COLOSIMO, E. A; GIOLO, S. *Análise De Sobrevivência Aplicada*. 1.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006. 367p.
- Departamento de Águas e Energia Elétrica-DAEE. Plano Global dos Recursos Hídricos da Bacia do Piracicaba. *Tecnosan*, Piracicaba, v.8, 2.<sup>a</sup> etapa, 1986.
- GUECHEVA, T; HENRIQUES, J. A; ERDTMANN, B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mulat. Res.*, n.497, p.19-27, 2001.
- KAPLAN, E. L; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, Washington, v.53, n.282, p.457-481, 1958.
- LAU, A.H. *Testes de Genotoxicidade em Planárias: Análise de Aberrações Cromossômicas e Teste Cometa*. 1998. 83 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- LAU, A.H. *Avaliação Múltipla do Potencial Genotóxico da Poluição Urbana de Porto Alegre - RS*. 2002. p.118. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de

Biociências. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

LORA, E. E. S. *Prevenção e controle da poluição nos setores energético, industrial e de transporte*. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. 481p.

MANTEL, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports*, London, v.3, n.150, p.163-170, 1966.

MOORE, J. *Uma Introdução aos Invertebrados*. 1.ed. São Paulo: Santos, 2006. 356p.

RIBEIRO, A. R. *Potencial do uso de Planárias na Avaliação de Contaminantes Ambientais*. 2012. 71.p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia), Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2012.

SABESP. Data Oper. Sistema Cantareira. São Paulo: Ed. Governo do Estado de São Paulo, 1989.

SAS Institute. SAS/STAT user's guide: version 6, vol. 2. Sas Inst, 1990.

SAFADI, R. S. *Emprego de planárias de água doce *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Platyhelminthes, Tricadida, Paludicola) na avaliação de toxicidade de compostos metálicos*. 1993. 203.p. Proposta metodológica. Dissertação (Mestrado em Ciências e Ecologia), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, Philadelphia, v.6, n.2, p.461-464, 1978.

Recebido em 04.04.2014.

Aprovado após revisão em 27.08.2014.