

## ***Plumbum metallicum* ultradiluído na reversão da neurotoxicidade causada por chumbo em *Danio rerio***

Ultradiluted *Plumbum metallicum* in reversal of neurotoxicity caused by lead in *Danio rerio*

*Plumbum metallicum* ultradiluido en la reversión de la neurotoxicidad causada por plomo en *Danio rerio*

Received: 11/07/2022 | Revised: 11/19/2022 | Accepted: 11/20/2022 | Published: 11/26/2022

**Henrique Carvalho Vieira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8857-8074>

Universidade Santo Amaro, Brasil

E-mail: [henrique.vetimagem@gmail.com](mailto:henrique.vetimagem@gmail.com)

**Katia Lima Traldi Cappelli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4773-2837>

Universidade Santo Amaro, Brasil

E-mail: [katiatraldicappelli@gmail.com](mailto:katiatraldicappelli@gmail.com)

**Rafael Acordi dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7675-2757>

Universidade Santo Amaro, Brasil

E-mail: [rafaelacordivet@gmail.com](mailto:rafaelacordivet@gmail.com)

**Marco Aurelio Gonçalves Manzoli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0176-7102>

Universidade Santo Amaro, Brasil

E-mail: [medvet.marcoaurelio@gmail.com](mailto:medvet.marcoaurelio@gmail.com)

**Melina Castilho de Souza Balbuena**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8200-6315>

Universidade Santo Amaro, Brasil

HD Science, Brasil

E-mail: [mecastilho3@yahoo.com.br](mailto:mecastilho3@yahoo.com.br)

**Cidéli de Paula Coelho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0492-1822>

Universidade Santo Amaro, Brasil

HD Science, Brasil

E-mail: [cpc Coelho@prof.unisa.br](mailto:cpc Coelho@prof.unisa.br)

### **Resumo**

A poluição ambiental causada por resíduos de metais pesados, que são desreguladores endócrinos, é muito relevante por seu amplo uso em processos industriais e agrícolas. O Chumbo é um metal pesado altamente tóxico ao meio ambiente e à organismos como peixes e invertebrados aquáticos. Este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações comportamentais no zebrafish (*Danio rerio*) induzidas por Chumbo, através de análises de atividade locomotora e parâmetros de ansiedade, verificando se medicamentos homeopáticos são capazes de diminuir os efeitos neurotóxicos causados no organismo dos peixes. Os *Danio rerio* foram mantidos em aquários de manutenção, com parâmetros controlados, até o momento dos experimentos. Os animais foram expostos ao metal pesado e os grupos foram compostos por 8 animais cada: controle branco, medicação na 6cH, 30cH e Solução inerte, o experimento foi em cego. Após isso, os animais passaram por testes comportamentais (locomoção e ansiedade) para avaliação de neurotoxicidade. O Chumbo causou ansiedade nos animais submetidos a ele sem medicação (solução inerte) uma vez que o tempo de permanência no lado claro do aquário foi menor nestes animais além de diminuir a distância percorrida pelos animais no lado claro. No campo aberto, é notável a diminuição de quadrantes percorridos pelos animais que receberam Chumbo sem exposição à medicação em comparação ao grupo controle branco. O grupo que tomou *Plumbum metallicum* 6cH obteve seus quadros locomotores revertidos, já o grupo que tomou *Plumbum metallicum* 30cH teve seus quadros neurotoxicológicos revertidos.

**Palavras-chave:** Homeopatia; Zebrafish; Metais pesados; Chumbo; Ansiedade; Neurotoxicidade.

### **Abstract**

Environmental pollution caused by heavy metal residues, which are endocrine disruptors, is very relevant due to its wide use in industrial and agricultural processes. Lead is a heavy metal that is highly toxic to the environment and organisms such as fish and aquatic invertebrates. This work aims to evaluate the behavioral changes in zebrafish (*Danio rerio*) induced by Lead, through the analyzes of locomotor activity and anxiety parameters, verifying if

homeopathic medicines are able to reduce the neurotoxic effects caused in the fish organism. The *Danio rerio* fishes were kept in maintenance aquariums, with controlled parameters, until the time of the experiments. The animals were exposed to heavy metal and the groups were composed of 8 animals each: white control, medication at 6cH, 30cH and inert solution, the experiment was blinded. After that, the animals underwent behavioral tests (locomotion and anxiety) to assess neurotoxicity. Lead caused anxiety in animals submitted to it with no medication (inert solution) since the time spent on the bright side of the aquarium was shorter in these animals, also reducing the distance traveled by the animals on the bright side. In the open field, the decrease in quadrants traveled by the animals that received lead without exposure to the medication is notable compared to the white control group. The group that took *Plumbum metallicum* 6cH had their locomotor conditions reversed, whereas the group that took *Plumbum metallicum* 30cH had their neurotoxicological conditions reversed.

**Keywords:** Homeopathy; Zebrafish; Heavy metals; Lead; Anxiety; Neurotoxicity.

### Resumen

La contaminación ambiental causada por residuos de metales pesados, que son disruptores endocrinos, es muy relevante debido a su amplio uso en procesos industriales y agrícolas. El plomo es un metal pesado que es altamente tóxico para el medio ambiente y organismos como peces e invertebrados acuáticos. Este trabajo tiene como objetivo evaluar los cambios de comportamiento en el pez cebra (*Danio rerio*) inducidos por Plomo, a través de análisis de parámetros de actividad locomotora y ansiedad, verificando si los medicamentos homeopáticos son capaces de reducir los efectos neurotóxicos causados en el organismo del pez. Los *Danio rerio* se mantuvieron en acuarios de mantenimiento, con parámetros controlados, hasta el momento de los experimentos. Los animales fueron expuestos a metales pesados y los grupos estuvieron compuestos por 8 animales cada uno: control blanco, medicación a 6cH, 30cH y solución inerte, el experimento fue ciego. Posteriormente, los animales se sometieron a pruebas de comportamiento (locomoción y ansiedad) para evaluar la neurotoxicidad. El plomo provocó ansiedad en los animales sometidos a él sin medicación (solución inerte) ya que el tiempo de permanencia en el lado luminoso del acuario fue menor en estos animales, además de reducir la distancia recorrida por los animales del lado luminoso. En campo abierto, es notable la disminución de cuadrantes recorridos por los animales que recibieron plomo sin exposición al medicamento en comparación con el grupo control blanco. El grupo que tomó *Plumbum metallicum* 6cH tuvo revertidas sus condiciones locomotoras, mientras que el grupo que tomó *Plumbum metallicum* 30cH tuvo revertidas sus condiciones neurotoxicológicas.

**Palabras clave:** Homeopatía; Pez cebra; Metales pesados; Plomo; Ansiedad; Neurotoxicidad.

## 1. Introdução

A poluição ambiental causada por substâncias químicas se tornou maior e mais frequente após a revolução industrial e apresenta importante relevância em relação à vida humana (Costa et al., 2014). O uso de agrotóxicos também causa impactos na saúde humana e ambiental. Embora seus efeitos sejam conhecidos na agricultura, os efeitos adversos aos humanos permanecem sendo estudados, uma vez que estas substâncias podem agir como desreguladores endócrinos e carcinogênicos (Dutra et al., 2020). Grande parte destes resíduos liberados acontece por interferência antrópica com agravamento por má gestão dos efluentes domésticos e industriais (Berlanda et al., 2019).

O chumbo é um metal tóxico principalmente para ambientes aquáticos. Peixes expostos ao metal podem apresentar em estresse oxidativo, conseqüentemente a toxicidade resulta em danos sinápticos e mau funcionamento neurotransmissor como neurotoxicidade (Lee et al., 2019; Zhang et al., 2021).

No corpo humano, o chumbo pode ser ingerido ou inalado do solo, alimentos, poeiras e até produtos de uso diário. O chumbo então se acumula nos tecidos moles e duros, sendo excretado, principalmente pelo sistema urinário e digestivo, e o acúmulo do metal também resulta em intoxicação (Patocka; Cerny, 2003; Charkiewicz; Backstrand, 2020, Ravipati et al., 2021).

A exposição aguda frequentemente resulta em início rápido de náuseas, dores de cabeça, alterações cognitivas e perturbações emocionais. Entretanto, a exposição crônica, mais comum em profissionais que trabalham em ambientes industriais, acarreta neurodegeneração e manifestações psiquiátricas, como perda de memória, aumento da depressão, ansiedade e irritabilidade (Lindgren et al., 2003; Stewart et al., 2006; Mason et al., 2014).

Um ensaio patogenético homeopático do medicamento *Plumbum metallicum* foi realizado para caracterização dos sintomas gerados pela medicação em pessoas saudáveis, avaliando a patogênese. Foram relatados sintomas físicos em pele e mucosas, gastroesofágicos e colite (inflamação do cólon) além de neurocomportamentais como ansiedade, depressão, letargia (Signorini et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar alterações comportamentais no zebrafish induzidas pelo Chumbo, através da análise da atividade locomotora e parâmetros relacionados à ansiedade. E, avaliar se os medicamentos ultradiluídos foram capazes diminuir os efeitos neurocomportamentais assim como modular os efeitos do estresse/ansiedade, colaborando com o Bem-Estar dos animais.

## 2. Metodologia

O presente trabalho consiste em uma pesquisa experimental, a qual determinou um objeto de estudo, selecionou grupos e submeteu a diferentes tratamentos, definindo as formas de controle e de observação dos efeitos, com coleta de dados para assegurar a eficácia da pesquisa (Fonseca, 2002; Silveira; Córdova, 2009). Pesquisa realizada com zebrafish, que é considerado um modelo experimental, por ser mantido em laboratório, além de ser um animal pequeno com baixo custo de manutenção (Trigueiro et al., 2020).

A natureza dessa pesquisa é quali-quantitativa, uma vez que no presente trabalho houve a interpretação do pesquisador na coleta de dados numéricos, que geraram dados para serem analisados posteriormente e encaminhados para análise estatística (Pereira et al., 2018).

### Sujeitos

Foram utilizados 32 peixes *Danio rerio* machos, de 2 a 3 cm de comprimento, comprados da empresa Power fish, e mantidos em condições de laboratório.

O experimento foi conduzido no Laboratório da Universidade Santo Amaro (UNISA) – Campus I, São Paulo/SP. Para caracterização física e química da água de manutenção e cultivo, foram efetuadas análises físicas e químicas nas amostras – temperatura, pH, oxigênio dissolvido e alcalinidade.

O estudo foi aprovado pelo CEUA da Universidade Santo Amaro através do parecer nº 07/2016.

### Manutenção dos organismos

Foram dispostos inicialmente em aquários com capacidade total de 100 litros, onde foram colocados 80 litros de água de manutenção obtida de rede de abastecimento, descloradas com aeração intensa durante 24 horas.

No recipiente foi colocada uma quantidade de organismos que mantenham a relação entre massas de organismos e volume de água de manutenção igual 1,0 g de peixe por litro de água, conforme a norma CETESB L5.019-II, (1990). Foram mantidos nesta condição durante uma semana para aclimação total.

Água de manutenção foi mantida à temperatura de 25°C ( $\pm$  2°C), e pH 7,0 ( $\pm$  0,2°C), intensidade luminosa de 600 lux e fotoperíodo de 12 horas/luz. A água foi aerada por meio de compressores de ar com saídas conectadas a sistemas de filtragem com lã acrílica e carvão ativado, auxiliando, assim, a manutenção de qualidade de água, embora 25% do volume total seja trocado a cada 7 dias.

A alimentação dos peixes constituiu de rações Tetramin®, com pelo menos 40% de proteína bruta, fornecida diariamente a média de 4% de ração por massa fresca dos peixes.

Os medicamentos foram feitos segundo a farmacotécnica e Farmacopéia Homeopática.

## Procedimentos

Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo que 3 grupos ficaram 96 horas expostos ao Chumbo (Pb [(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> – Acetato de chumbo) na concentração de 20 µg/L de água, capaz de promover a redução significativa na atividade locomotora e um aumento no tempo gasto na zona inferior do tanque de teste, sugerindo um efeito ansiogênico (Senger et al., 2006)

Um grupo não recebeu nenhum tratamento (Controle Branco). O desenho experimental foi planejado para atender aos requisitos de bem-estar animal e ao conceito dos 3 Rs (reduction, replacement, refinement).

Grupo CB – Controle Branco;

Grupo 1 – com Chumbo, receberá 0,5ml/L de *Plumbum metallicum* 6cH; Grupo 2 - com Chumbo, receberá 0,5ml/L de *Plumbum metallicum* 30cH; Grupo 3 - com Chumbo, receberá 0,5ml/L de solução inerte.

Todos os medicamentos homeopáticos que trataram o metal pesado, iniciaram 5 dias antes do término do experimento, portanto os animais já estavam tomando a medicação 1 dia antes da exposição.

O estudo foi realizado em cego e os códigos foram revelados somente após os resultados obtidos pela análise estatística.

## Avaliações

### *Avaliação dos sinais de neurotoxicidade do Danio rerio após a exposição às diferentes substâncias*

Foram observados tremores, tempo e frequência na superfície e movimentos erráticos. Para a presença de tremores e movimentos erráticos foram atribuídos escores: ausente - 0, leve - 1, média - 2, moderada - 3, forte - 4 e muito forte - 5.

Os parâmetros observados foram gravados em câmeras GoPro e posteriormente analisados através do programa Windows Media Player® (Microsoft® 1998). Em alguns momentos os vídeos foram reproduzidos em câmera lenta para melhor avaliação e visualização dos movimentos dos animais.

### *Teste de atividade geral em campo aberto*

Os peixes foram transferidos para o campo aberto e, após um período de aclimação, foram avaliados por 5 minutos por meio de vídeos gravados. Os parâmetros observados foram: tempo de locomoção e imobilidade em segundos.

### *Teste de ansiedade (Claro/escuro)*

O peixe foi colocado em outro aquário de 40 centímetros de comprimento com água, dividido em 3 compartimentos: o claro (20 cm), o diametralmente oposto escuro (20 cm). O animal foi colocado no compartimento intermediário aguardando-se a habituação por 2 minutos. A seguir as paredes deste compartimento foram retiradas e foi feita a contagem do número de vezes que o animal cruzou o compartimento claro para o escuro, o tempo que o peixe permaneceu em cada lado, o número de tentativas de entrar em cada compartimento bem como o tempo de imobilidade em cada compartimento. Os testes foram feitos em duas condições de luz: luz normal do laboratório e luz colocada diretamente no lado claro do aquário.

### *Descarte das carcaças e de resíduos*

O metal foi precipitado no local de sua geração. O resíduo líquido aquoso foi descartado na pia, somente após análise para verificação da eficiência do procedimento de precipitação e acerto de pH. O precipitado foi empacotado e armazenado em depósitos até sua retirada por empresa credenciada (em anexo “Cadri”: “Certificado de movimentação de resíduos de interesse ambiental”. Validade Unisa: 10/01/2018).

Procedimento: Metais pesados (e seus sais): identificar, precipitar (como sais insolúveis), filtrar e recolher o sólido em recipientes separados. A precipitação foi realizada com soda cáustica (NaOH + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) em excesso. Neutralizou-se o sobrenadante, verificou-se a eficiência da precipitação e o descarte foi realizado na pia sob água corrente.

As carcaças dos peixes foram colocadas em saco apropriado para descarte, mantidas em câmara fria e posteriormente levadas para incineração, pelos órgãos competentes (Informações cedidas pelo responsável pelos laboratórios da Universidade – Campus I).

### Análise estatística

Para análise dos dados da atividade geral será empregada a ANOVA de dados repetidos. Para a análise dos testes de ansiedade será empregada a ANOVA para os dados independentes. E a análise do aprendizado será empregada o teste T de Student.

O valor de  $P < 0,05$  será considerado capaz de indicar diferenças significativas (ZAR, 2010).

### 3. Resultados

Os animais que foram submetidos ao Chumbo sem receber medicação (controle positivo), houve uma diminuição do número total dos quadrantes percorridos ( $297,90 \pm 86,51$ ) em relação ao grupo controle ( $520,5 \pm 131,6$ ). *Plumbum metallicum* 6cH aumentou o número de quadrantes totais percorridos pelos peixes no campo aberto ( $415,70 \pm 26,61$ ) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Média  $\pm$  desvio padrão dos grupos Controle Branco, Controle Positivo, *Plumbum metallicum* 6cH e 30cH com relação ao tempo em segundos de locomoção e imobilização, e quadrantes totais percorridos por *Danio rerio* no aquário experimental Campo Aberto Redondo. ANOVA seguido do Teste de Tukey.

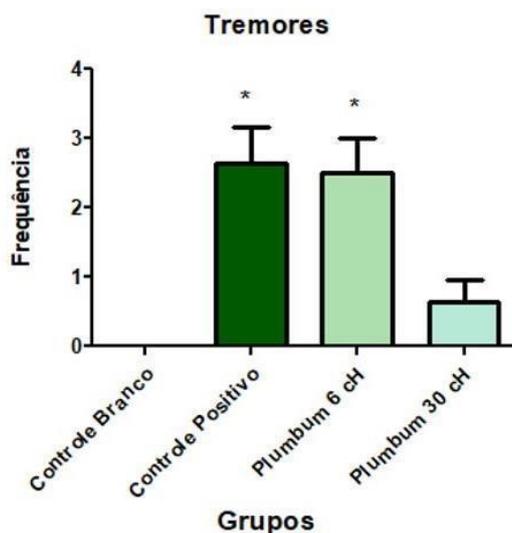
	Controle branco	Solução inerte (controle positivo)	<i>Plumbum metallicum</i> 6cH	<i>Plumbum metallicum</i> 30cH
Locomoção (seg)	$278,40 \pm 30,50$	$291,0 \pm 20,16$	$299,10 \pm 2,40$	$291,0 \pm 20,16$
Imobilização (seg)	$11,29 \pm 14,12$	$0,87 \pm 2,40$	$0,87 \pm 2,40$	$4,28 \pm 5,30$
Quadrantes Totais	$520,5 \pm 131,6$	$297,9 \pm 87,51^a$	$415,70 \pm 26,61$	$341,90 \pm 52,48^a$

Fonte: Autores (2017).

Diante dos valores visualizados na tabela, é possível notar que conforme a ansiedade reduz há aumento da atividade locomotora, observado no grupo que recebeu o *Plumbum* 6 cH.

O medicamento *Plumbum metallicum* 30cH gerou resultados melhores na reversão dos sintomas, como observado na apresentação de tremores (Gráfico 1).

**Gráfico 1** – Relação de tremores entre controle branco, controle positivo, *Plumbum* 6cH e *Plumbum* 30cH. ANOVA seguido do Teste de Tukey.



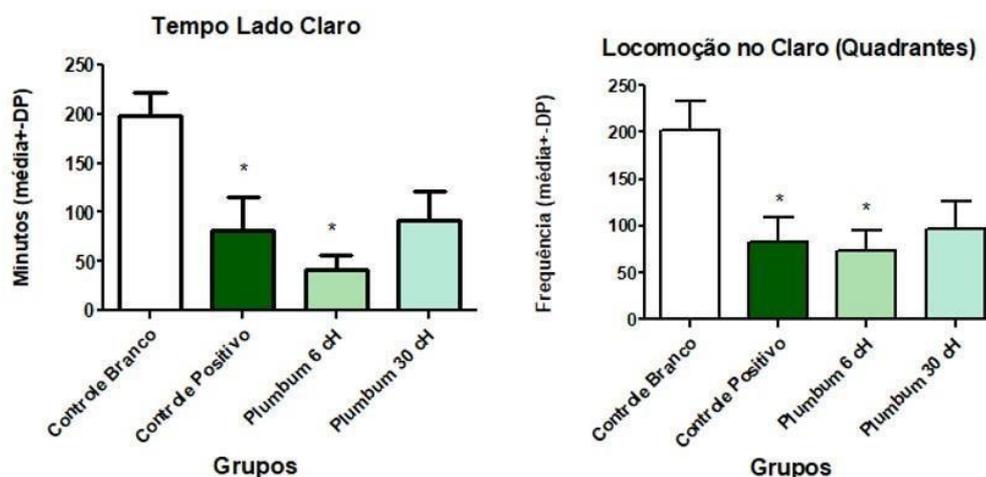
Fonte: Autores (2021).

Esta redução de tremores, observada no Gráfico 1, demonstra ação ansiolítica nos peixes que receberam o *Plumbum metallicum* 30cH.

No teste claro/escuro é possível observar que no grupo controle positivo houve redução no tempo de permanência dos peixes no lado claro em relação com o grupo controle branco (Gráfico 2a,b). Houve queda na frequência de locomoção (em quadrantes) dos animais do grupo controle positivo no lado claro. Observa-se que o medicamento *Plumbum metallicum* 30cH foi capaz de reduzir a ansiedade dos animais, uma vez que ele aumentou o tempo e a locomoção dos animais no lado claro.

**Gráfico 2a,b** - Relação de tempo e locomoção no lado claro entre controle branco, controle positivo, *Plumbum* 6cH e *Plumbum* 30cH. ANOVA seguido do Teste de Tukey.

## Teste Claro/Escuro



Fonte: Autores (2021).

De acordo com o Gráfico 2 é possível observar que o Chumbo produziu efeito ansiogênico nos animais que não foram medicados com *Plumbum metallicum*.

#### 4. Discussão

Apesar dos metais pesados serem comuns no meio ambiente, eles são preocupantes à saúde humana, animal e ambiental por possuírem efeito acumulativo pelo consumo de água e alimentos contaminados e não serem biodegradáveis (Sarath; Puthur, 2021). Em pesquisa realizada in vitro com metais pesados, o Chumbo foi um dos metais responsáveis pela redução da viabilidade celular A549, resultando inclusive em morte celular após co-exposição ao metal (Yuan et al., 2019).

No presente estudo no Campo aberto, os animais que foram submetidos ao Chumbo sem receber medicação (controle positivo), apresentaram diminuição do número total dos quadrantes percorridos em relação ao grupo controle. *Plumbum metallicum* 6cH aumentou o número de quadrantes totais percorridos pelos peixes no campo aberto confirmando os dados literários de que há aumento da atividade locomotora com a redução da ansiedade (Blaser et al., 2010).

Além disso, o grupo controle positivo também apresentou dos tremores do grupo controle positivo em relação ao controle branco, indicando a neurotoxicidade ocasionada pelo metal pesado (Kavlock et al, 1996), na qual o medicamento *Plumbum metallicum* 30cH apresentou resultado superior na reversão deste sintoma.

O metal Chumbo produziu efeito ansiogênico nos animais que não foram medicados com *Plumbum metallicum*, observando-se uma diminuição no tempo de permanência dos peixes no lado claro, além de redução na locomoção, em quadrantes, dos animais no lado claro. Nos animais que receberam *Plumbum metallicum* 30cH houve aumento no tempo e na locomoção dos animais no lado claro, agindo de maneira ansiolítica nos animais devido a redução da ansiedade, corroborando com resultados de outras literaturas de que, peixes Zebrafish, ao serem expostos à medicamentos ansiolíticos, tendem a permanecer mais tempo no lado claro do aquário (Siebel et al, 2015).

O chumbo é um metal altamente tóxico encontrado livremente na natureza. O chumbo vem sendo largamente empregado na fabricação de diversos produtos que vão de tinta de parede, gasolina à projéteis balísticos (Jaishankar et al., 2014). Os sinais de envenenamento por chumbo são, basicamente, direcionados ao Sistema Nervoso Central e trato gastrointestinal em crianças e adultos (Markowitz, 2000).

Moreira *et al.* (2003) realizaram um experimento para redução dos níveis de chumbo no sangue de pacientes intoxicados no ambiente de trabalho. Todos os pacientes possuíam níveis sanguíneos de chumbo acima dos valores de referência pré-tratamento. Após o emprego de *Plumbum metallicum* 15cH, os pacientes relataram melhoras de 100% em alguns dos sintomas neurocomportamentais provocados pelo saturnismo, com redução de 58%, em média, dos níveis de chumbo no sangue, sem efeitos colaterais durante e após o tratamento. Os benefícios da terapia com o *Plumbum metallicum* também foi observado no presente trabalho, principalmente no grupo tratado com a potência 30cH.

#### 5. Considerações Finais

Concluiu-se que o chumbo provocou aumento da ansiedade nos animais que foram expostos. Este quadro foi revertido pelo medicamento *Plumbum metallicum*.

*Plumbum metallicum* 6cH mostrou-se efetivo nos parâmetros relacionados à atividade locomotora e *Plumbum metallicum* 30cH reduziu a ansiedade nos animais intoxicados.

O grupo de pesquisa do presente artigo possui trabalhos publicados e a serem publicados na área animal e ambiental, com foco em homeopatia, visando a saúde única.

## Referências

- Berlanda, A., Baum, C. A., Becegato, V. A., & Souza, N. C. (2021). Avaliação temporal e espacial da qualidade das águas superficiais da bacia hidrográfica do rio Desquite, Santa Catarina. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*.
- Blaser, R. E., Chadwick, L., & McGinnis, G. C. (2010). Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 208(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.009>
- Charkiewicz, A. E., & Backstrand, J. R. (2020). Lead Toxicity and Pollution in Poland. *International journal of environmental research and public health*, 17(12), 4385. <https://doi.org/10.3390/ijerph17124385>
- Costa, E. M. F., Spritzer, P. M., Hohl, A., & Bachega, T. A. S. S. (2014). Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 58(2), 153–161. doi:10.1590/0004-2730000003031
- Dutra, L.S., Ferreira, A.P., Horta, M.A., & Palhares, P.R. (2020). Uso de agrotóxicos e mortalidade por câncer em regiões de monoculturas. *Saúde em Debate.*, 44(127), 1018-1035.
- da Fonseca, J. J. S. (2002). *Apostila de metodologia da pesquisa científica*. Fortaleza: UEC.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60–72. doi:10.2478/intox-2014-0009
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., & Tilson, H. A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104(suppl 4), 715–740.
- Lee, J. W., Choi, H., Hwang, U. K., Kang, J. C., Kang, Y. J., Kim, K. I., & Kim, J. H. (2019). Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 68, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.010>
- Lindgren, K. N., Ford, D. P., & Bleecker, M. L. (2003). Pattern of blood lead levels over working lifetime and neuropsychological performance. *Archives of environmental health*, 58 6, 373-9.
- Markowitz, M. (2000). Lead Poisoning. *Pediatr Rev* 21(10): 327–335.
- Mason, L. H., Harp, J. P., & Han, D. Y. (2014). Pb neurotoxicity: neuropsychological effects of lead toxicity. *BioMed research international*, 2014, 840547. <https://doi.org/10.1155/2014/840547>
- Moreira, H. M., Leite, L. B., Almeida, A. A., Biagini, M., et al. Emprego de *Plumbum metallicum* 15 cH no Saturnismo Ocupacional, *Homeopat. Bras.*, 9(1), 33-36, 2003.
- Patocka, J., & Cerný, K. (2003). Inorganic lead toxicology. *Acta medica (Hradec Kralove)*, 46(2), 65–72.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica [Scientific Research Methodology] (e-book). Santa Maria Ed., UAB/NTE/UFSM.
- Ravipati, E. S., Mahajan, N. N., Sharma, S., Hatware, K. V., & Patil, K. (2021). The toxicological effects of lead and its analytical trends: an update from 2000 to 2018. *Critical reviews in analytical chemistry*, 51(1), 87–102. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1678381>
- Sarath, N. G., & Puthur, J. T. (2021). Heavy metal pollution assessment in a mangrove ecosystem scheduled as a community reserve. *Wetlands Ecol Manage*, 29, 719–730.
- Senger, M. R., Rico, E. P., de Bem Arizi, M., Frazzon, A. P., Dias, R. D., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2006). Exposure to Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology*, 226 2-3, 229-37.
- Siebel, A. M., Bonan, C. D., & Silva, R. S. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. Citado por Resende, R.R.; Soccol, C.R. *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações*. Volume 1. São Paulo. Blucher. 2015.
- Silveira, D. T., & Córdova, F. P. (2009). A pesquisa científica. *Métodos de pesquisa*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009. p. 33-44.
- Signorini, A., Lubrano, A., Manuele, G., Fagone, G., Vittorini, C., Boso, F., Vianello, P., Rebuffi, A., Frongia, T., Rocco, V., & Pichler, C. (2005). Classical and new proving methodology: provings of *Plumbum metallicum* and *Piper methysticum* and comparison with a classical proving of *Plumbum metallicum*. *Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy*, 94(3), 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2005.02.009>
- Stewart, W. F., Schwartz, B. S., Davatzikos, C., Shen, D., Liu, D., Wu, X., Todd, A. C., Shi, W., Bassett, S., & Youssef, D. (2006). Past adult lead exposure is linked to neurodegeneration measured by brain MRI. *Neurology*, 66(10), 1476–1484. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000216138.69777.15>
- Trigueiro, N. S. S., Canedo, A., Braga, D. L. S., Luchiari, A. C., & Rocha, T. L. (2020). Zebrafish as an emerging model system in the global south: two decades of research in Brazil. *Zebrafish*, 17(6), 412–425. <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1930>
- Yuan, Y., Wu, Y., Ge, X., Nie, D., Wang, M., Zhou, H., & Chen, M. (2019). In vitro toxicity evaluation of heavy metals in urban air particulate matter on human lung epithelial cells. *The Science of the total environment*, 678, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.431>
- Zar, J. H. (2010) *Biostatistical Analysis*. 5th Edition, Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River, xiii, 944 p.
- Zhang, Y., Zhang, P., Shang, X., Lu, Y., & Li, Y. (2021). Exposure of lead on intestinal structural integrity and the diversity of gut microbiota of common carp. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 239, 108877. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108877>