

**Sistema imune inato de peixes e o uso do alho como imunoestimulante: revisão de literatura**

**Innate immune system and the use of garlic as an immunostimulant: literature review**

**Sistema imune innato de pescado y el uso de ajo como imunoestimulante: revisión de literatura**

Recebido: 05/03/2020 | Revisado: 09/03/2020 | Aceito: 10/03/2020 | Publicado: 21/03/2020

**Fabício Sado Rodrigues**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8679-0482>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: [fabricao\\_sado@hotmail.com](mailto:fabricao_sado@hotmail.com)

**Sarah Rodrigues Chagas**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0844-0436>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: [sarahchagas94@gmail.com](mailto:sarahchagas94@gmail.com)

**Maria Cristina Veríssimo Rocha**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2945-6186>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: [crismaria20161@outlook.com](mailto:crismaria20161@outlook.com)

**Eduardo de Paula Nascente**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9862-9127>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: [eduardodepaula100@gmail.com](mailto:eduardodepaula100@gmail.com)

**Fernanda Gomes de Paula**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7794-7874>

Professora Adjunta, Universidade Federal de Goiás, Brasil

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

**Lívia Mendonça Pascoal**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4900-5334>

Professora Adjunta, Universidade Federal de Goiás, Brasil

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

## **Resumo**

O objetivo desta revisão de literatura é evidenciar os principais aspectos do sistema imune inato dos peixes demonstrando a necessidade de novas alternativas para controle de enfermidades, respeitando a premissa da sustentabilidade, com o uso de imunostimulantes biologicamente ativos. Nos peixes não há presença de tecidos ou órgãos mieloides, os componentes do seu sistema imune são classificados apenas como linfóides, ou seja, a imunidade inata, é considerada a primeira linha de defesa do organismo frente ao patógeno. Dessa forma, o uso de aditivos alimentares e imunostimulantes auxiliam a melhorar o sistema imune natural desses animais. Podem ser substâncias sintéticas, químicas ou biológicas que induzem a ativação ou aumento de componentes do sistema imune, proporcionando assim defesa precoce contra enfermidades, podendo ser utilizado como tratamento preventivo. Os compostos vegetais, óleos essenciais e extrato de plantas bioativas tem grande potencial, pois possuem funções antimicrobianas e antiparasitária comprovadas. Dentre eles, o alho é apontado como um dos mais eficazes, por atuar como promotor de crescimento, estimulador de apetite, antimicrobiano, antioxidante e imune estimulante, ajuda ainda em parâmetros hematológicos e aumentando o bem-estar dos peixes, bem como, capacidade de melhorar a qualidade da carne e estender o tempo de prateleira.

**Palavras-chave:** Aditivos alimentares; Compostos bioativos; Piscicultura.

## **Abstract**

The objective of this literature review is to highlight the main aspects of the fish's innate immune system, demonstrating the need for new alternatives for disease control, respecting the premise of sustainability, with the use of biologically active immunostimulants. In fish there is no presence of myeloid tissues or organs, the components of your immune system are classified only as lymphoids, and innate immunity is considered the organism's first line of defense against the pathogen. Thus, the use of food additives and immunostimulants help to improve the natural immune system of these animals. They can be synthetic, chemical or biological substances that induce the activation or increase of components of the immune system, thus providing early defense against diseases, and can be used as preventive treatment. Vegetable compounds, essential oils and bioactive plant strata have great potential, as they have proven antimicrobial and antiparasitic functions. Among them, garlic is considered one of the most effective, as it acts as a growth promoter, appetite stimulator, antimicrobial, antioxidant and immune stimulant, it also helps with hematological parameters

and increases the well-being of fish, as well as the ability to improve meat quality and extend shelf life.

**Keywords:** Feed additives; Bioactive compounds; Fish-farming.

## Resumen

El objetivo de esta revisión de la literatura es resaltar los aspectos principales del sistema inmune innato de los peces, demostrando la necesidad de nuevas alternativas para el control de enfermedades, respetando la premisa de sostenibilidad, con el uso de inmunoestimulantes biológicamente activos. En los peces no hay presencia de tejidos u órganos mieloides, los componentes de su sistema inmunitario se clasifican solo como linfoides, es decir, la inmunidad innata, se considera la primera línea de defensa del organismo contra el patógeno. Por lo tanto, el uso de aditivos alimentarios e inmunoestimulantes ayuda a mejorar el sistema inmunológico natural de estos animales. Pueden ser sustancias sintéticas, químicas o biológicas que inducen la activación o el aumento de los componentes del sistema inmune, proporcionando así una defensa temprana contra enfermedades, y pueden usarse como tratamiento preventivo. Los compuestos vegetales, los aceites esenciales y los estratos de plantas bioactivas tienen un gran potencial, ya que tienen funciones antimicrobianas y antiparasitarias comprobadas. Entre ellos, el ajo se considera uno de los más efectivos, ya que actúa como un promotor del crecimiento, estimulador del apetito, antimicrobiano, antioxidante e inmunoestimulante, también ayuda con los parámetros hematológicos y aumenta el bienestar de los peces, así como la capacidad de mejorar la calidad de la carne y extender la vida útil.

**Palabras clave:** Aditivos alimentarios; Compuestos bioactivos; Piscicultura.

## 1. Introdução

A piscicultura é uma atividade que cresce a cada dia no nosso país (Brasil, 2012), com isso, cresce também a exigência de avanços tecnológicos em diversas áreas, como melhoramento genético, nutrição e sanidade (Sado, 2006). A intensificação da produção tem como consequência o aumento da ocorrência de enfermidades em peixes, tornando um fator limitante na produção, uma vez que sistemas intensivos de produção trabalham com até 200 peixes/m<sup>3</sup> (Ndong et al, 2011; Fazlolahzadeh et al., 2011; Syahidah et al., 2015; Sakai, 1999). Altas densidades com o intuito de aproveitar melhor o espaço produtivo, somado aos manejos como classificação, transporte e manipulação dos peixes, têm como consequência danos aos animais e diminuição da eficiência do sistema imunológico, podendo causar

prejuízos econômicos (Sakai, 1999; Pavanelli et al., 2008; Urbinati et al., 2004).

Neste contexto, o surgimento de enfermidades nos cultivos de peixes se tornou cada vez mais ocorrente e, com isso, o uso de fármacos para tratamentos de doenças tem sido muito utilizado, como por exemplo, o formaldeído, verde malaquita, azul de metileno e os antibióticos, que também é usado como promotor de crescimento (Fazlolahzadeh et al., 2011; Pavanelli et al., 2008; Shalaby et al., 2006). Muitas vezes há o uso indiscriminado, que pode causar diversas consequências como poluição do meio ambiente, acúmulo de resíduos na carcaça dos animais destinados ao consumo, pressão seletiva sobre os microorganismos e resistência do microorganismo a um fármaco específico (Fazlolahzadeh et al., 2001; Shalaby et al., 2006; Shakya et al., 2014; Biller-Takahashi, 2014; Mouriño et al., 2012; Aly et al., 2008).

Contudo, visando evitar ou diminuir a utilização de fármacos como quimioterápicos e antimicrobianos na produção de peixes, produtos alternativos vêm sendo estudados e utilizados. Produtos como os óleos essenciais, extratos vegetais e substâncias sintéticas têm sido estudados para utilização como antimicrobianos e antiparasitários e também por terem propriedade imunoestimulante. Estudos realizados até o momento concluem que a utilização desses produtos naturais não apresentam efeitos nocivos ao homem e meio ambiente (Chagas et al., 2014).

O mercado consumidor está mais exigente a cada dia, desejando produtos mais saudáveis, sem resíduos e livres de antibióticos ou outros produtos químicos (Harikrishnan et al., 2011; Fabregat, 2006). Dessa forma, o uso de produtos naturais, com comprovadas ações medicinais, é uma alternativa para minimizar a incidência de doenças e melhorar o desempenho produtivo (Fazlolahzadeh et al., 2001; Talpur et al., 2012; Hai, 2015).

Por fim, o objetivo desta revisão de literatura é mostrar que com a necessidade de procurar alternativas para lidar com enfermidades de peixes, respeitando a premissa da sustentabilidade, o uso de imunoestimulantes é uma tendência na piscicultura brasileira, e para se obter produtos biologicamente ativos, e que sejam realmente eficazes, é necessária, preferencialmente, avaliações in vivo em campo (Chagas et al., 2014).

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. Sistema imune inato de peixes**

No ambiente em que os peixes vivem, ocorre uma constante interação do animal com diversos microorganismos patogênicos ou não patogênicos. Sendo assim, os peixes possuem

diferentes mecanismos de defesa que garantem a sua sobrevivência (Subramanian et al., 2007). Esses mecanismos do sistema imune atuam contra microorganismos, apresentando componentes inatos, adquiridos, humorais e mediados por células (Ellis, 2001).

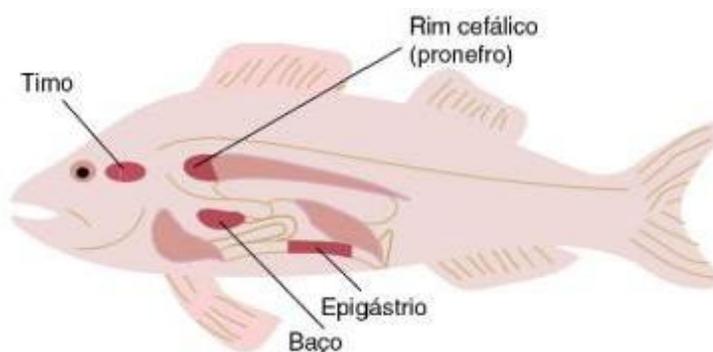
Nos peixes não há presença de tecidos ou órgãos mieloides como nos mamíferos, pois os peixes não possuem medula óssea e linfonodos. Sendo assim, os tecidos e órgãos que constituem o sistema imune de peixes são classificados apenas como linfoides (Biller-Takahashi, 2014). Estes órgãos se formam durante o desenvolvimento larval; são eles: rins, timo, baço e tecidos linfoides associados à mucosa (Press & Evensen, 1999) (Figura 1).

O rim é um órgão par e considerado o maior órgão linfóide (Biller-Takahashi, 2014). É comparado à medula óssea por ter grande importância na hematopoiese, com a função de formação e maturação de células sanguíneas e de defesa (Press & Evensen, 1999). O timo se caracteriza por ser um órgão duplo, e se localiza na região dorsolateral das brânquias (Biller-Takahashi, 2014). É um importante local de desenvolvimento e maturação do linfócito T, e diferentemente do que ocorre em vertebrados adultos, nos peixes a sua involução ocorre dependendo da espécie (Bowden et al., 2015).

O baço é dividido em duas regiões, polpa branca e polpa vermelha. A polpa branca está relacionada à hematopoiese, formação das células de defesa; e a polpa vermelha relacionada com a fagocitose de células velhas ou anormais. Diferentemente do que nos mamíferos, a divisão entre essas duas regiões não é organizada, entretanto, é possível identificar as polpas em várias espécies (Press & Evensen, 1999).

Nos tecidos linfoides associados à mucosa, se incluem também pele e brânquias. Estes tecidos estão dispostos de forma desorganizada por toda a mucosa, e produzem muco contendo alguns componentes do sistema de defesa inato, como lisozima, proteína do sistema complemento e imunoglobulinas (Press & Evensen, 1999).

**Figura 1.** Representação dos órgãos linfoides.



Fonte: Tizard (2014).

A imunidade inata, também conhecida como natural ou não específica, é a primeira linha de defesa do organismo frente a uma exposição a um microorganismo invasor por meio de uma série de mecanismos de proteção, sem necessidade de uma pré exposição ao agente causador da infecção (Mouriño et al., 2012; Biller-Takahashi, 2014; Harikrishnan et al., 2011; Magnadóttir, 2006; Saita, 2010). Apesar do mecanismo de reconhecimento de agentes causadores de enfermidades ser limitado, a imunidade inata possui grande eficiência e é essencial para a função da imunidade adquirida (Magnadóttir, 2006).

Diversos fatores podem promover efeitos supressores nos parâmetros da imunidade inata, como mudanças de parâmetros de qualidade de água, manejo com os animais, e outros fatores que desencadeiam estresse nos animais. Vários aditivos alimentares e imunostimulantes podem melhorar os fatores da imunidade inata (Magnadóttir, 2006).

Os parâmetros da imunidade inata dos peixes vêm sendo bastante estudados em diferentes linhas de pesquisas, como imunoprofilaxia, imunologia comparativa ou imunologia evolutiva (Magnadóttir, 2006).

Há a presença de parâmetros físicos, que são a pele, as mucosas, brânquias e epiderme, que agem como primeira barreira contra infecção (Subramanian et al., 2007; Ellis, 2001; Fast et al., 2002). O muco tem uma importante função de defesa, além da proteção física, que com a descamação, impede a adesão de patógenos (Subramanian et al., 2007; Magnadóttir, 2006, Fast et al., 2002). No muco contém parâmetros imunológicos como lectinas, lisozima, proteínas do complemento, peptídeos antibacterianos e IgM (Subramanian et al., 2007; Magnadóttir, 2006; Fast et al., 2002).

Os parâmetros celulares são compostos por células “chaves” do sistema imune inato, como as células fagocíticas, como os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos / macrófagos, e células citotóxicas (Magnadóttir, 2006).

A fagocitose é um dos mecanismos de defesa mais importantes do sistema imune inato (Talpur et al., 2012; Affonso, 2006), podendo ocorrer por meio de leucócitos, principalmente neutrófilos, monócitos no sangue e macrófagos no tecido (Affonso, 2006). Os fagócitos exercem um papel importante na defesa do organismo contra infecções, e participam de processos imunorregulatórios (Ellis, 2001; Affonso, 2006), limitando a disseminação de agentes infecciosos pelo organismo do peixe (Ellis, 2001). Este parâmetro normalmente mostra um aumento após administração oral de imunostimulantes (Talpur & Ikhwanuddin, 2012).

Dentre as diferentes etapas do processo de fagocitose, uma importante etapa é a chamada explosão respiratória, conhecida também como burst oxidativo (Talpur et al., 2012; Saita, 2010; Affonso, 2006). Nesse processo, o oxigênio é reduzido e diante de uma série de reações metabólicas intracelulares, ocorre a produção elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radicais hidroxila (OH<sup>-</sup>), ânions de oxigênio (O<sub>2</sub>) e superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Saita, 2010; Affonso, 2006). Esses possuem poder oxidantes, contribuindo na destruição dos microorganismos (Saita, 2010). Esses mecanismos são considerados parâmetros importantes quando se pretende avaliar a capacidade microbicida e o metabolismo oxidativo dessas células (Affonso, 2006). De todas as EROs produzidas durante a explosão respiratória, o peróxido de oxigênio (Affonso, 2006) é a mais estável e fácil de mensurar, sendo assim, a quantificação dos níveis dessa substância, é um dos parâmetros utilizados na avaliação da ativação de macrófagos, assim como o ânion superóxido (Ndong et al., 2001; Nya et al., 2009).

Segundo Ellis (Ellis, 2001), os monócitos também possuem a função de interagir o sistema imune não específico ao específico, por meio da produção de citocinas capazes de estimular a produção de linfócitos. Há também a ação de elementos humorais inatos, como os fatores inibidores do crescimento de bactérias, por exemplo, a transferrina, antiproteases, lisozima, proteína C reativa e proteínas do sistema complemento (Biller-Takahashi, 2014).

Dentre estes fatores inibidores do crescimento de bactérias se destaca um elemento com grande utilização para a determinação de uma imunestimulação, a lisozima, apesar de que há trabalhos que também mensuram outros elementos. A lisozima é uma enzima que está presente no muco, ovos, sangue e tecidos onde há a presença de leucócitos (Magnadóttir, 2006; Fast et al., 2002), e tem poder de atuação sobre os peptídeoglicanos da parede de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e pode ativar o sistema complemento e fagócitos (Magnadóttir, 2006).

### **2.1.1. Parâmetros hemato-imunológicos**

Diversos parâmetros podem ser mensurados para confirmar a eficácia do efeito imunestimulante de um composto. Parâmetros hemato-imunológicos podem ser considerados importantes indicadores de saúde em peixes (Sado, 2006).

A determinação do hematócrito, contagem de eritrócitos e leucócitos totais (Nya & Austin, 2009), é uma ferramenta para a determinação da melhora ou não do sistema imune diante a utilização de um composto imunestimulante. O hematócrito representa o volume de sangue, em porcentagem, que corresponde aos glóbulos vermelhos, e o aumento deste, pode

estar relacionado a situações de estresse (Sado, 2006). Os eritrócitos possuem a importante função de transportar O<sub>2</sub> e parte de CO<sub>2</sub> do sangue; sendo assim, qualquer alteração nos níveis de eritrócitos será traduzida como deficiência de O<sub>2</sub> nos tecidos (Sado, 2006). O aumento do número dessa célula na circulação pode indicar que os peixes passaram por algum procedimento imunestimulador, pois mantém níveis de oxigênio mais estáveis nos tecidos, o que é favorável em caso de condições desafiadoras.

Nya e Austin 2009 (Nya & Austin, 2009) consideraram que os aumentos na proteína sérica total, de albumina e globulina, refletem melhorando a imunidade inata. A contagem de leucócitos, atividade fagocítica, índice fagocitário, atividade bactericida, atividade de lisozima e antiprotease, e explosão respiratória são parâmetros que podem ser avaliados para determinar a eficácia de um composto imunestimulante (Syahidah et al., 2015; Nya & Austin, 2009).

## **2.2. Imunoestimulantes na piscicultura**

A intensificação da produção de peixe, resultado do crescimento desta atividade no Brasil, promoveu o aumento da casuística de enfermidades em pisciculturas comerciais, tendo como consequência altos prejuízos econômicos. Devido ao intenso manejo que os animais são submetidos em um sistema intensivo de produção, pode ocorrer um desequilíbrio homeostático, afetando o sistema imune e deixando os peixes mais susceptíveis às enfermidades (Mouriño et al., 2012; Biller-Takahashi, 2014). Com isso, diversos fármacos vêm sendo utilizados no combate às doenças de peixe, e muitas vezes indiscriminadamente, podendo causar diversos danos ao meio ambiente, à saúde humana e aos próprios peixes, no caso de resistência bacteriana (Syahidah et al., 2015; Mouriño et al., 2012; Biller-Takahashi, 2014; Harikrishnan et al., 2011). Sendo assim, substâncias imunestimulantes vêm ganhando a atenção nos centros de pesquisas em aquicultura, uma vez que, estes compostos não apresentam efeitos nocivos ao homem e nem ao meio ambiente, tornando uma alternativa aos fármacos e produtos químicos convencionalmente utilizados (Syahidah et al., 2015; Biller-Takahashi, 2014; Chagas et al., 2014; Harikrishnan et al., 2011; Vaseeharan et al., 2013).

A utilização dos imunestimulantes na piscicultura tem grande importância nos manejos que causam estresse nos animais (Fazlolahzadeh et al., 2001; Harikrishnan et al., 2011), como classificações, transferências, transporte e vacinação. Manejos estes que rotineiramente os piscicultores utilizam antibióticos e produtos químicos para evitarem a mortalidade de peixes e assim, o prejuízo econômico. O uso dos imunestimulantes também tem grande indicação nas fases de desenvolvimento em que os peixes são mais susceptíveis ao

acometimento de enfermidades, como na larvicultura e alevinagem (Chagas et al., 2014; Vaseeharan et al., 2013).

Imunoestimulantes podem ser substâncias sintéticas, químicas ou biológicas, capazes de aumentar e melhorar a resistência do animal, induzindo a ativação ou aumentando qualquer componente do sistema imune, atuando nos mecanismos de defesa não-específicos diante de um desafio contra enfermidades, como vírus, fungos, bactérias e parasitas (Sado, 2006; Biller-Takahashi, 2014; Vaseeharan et al., 2013), proporcionando uma defesa precoce contra enfermidades (Sakai, 1999). Sendo assim, é possível realizar o tratamento preventivo com os imunoestimulantes (Sakai, 1999; Chagas et al., 2014; Araújo, 2006)

Segundo Vaseeharan e Thaya (Vaseeharan & Thaya, 2013), os imunoestimulantes podem ter grande importância na prevenção de doenças quando associados às vacinas, que possuem ação restrita a um patógeno específico, pois esses possuem a capacidade de incrementar as defesas não específicas, e assim, aumentar a resistência a diversas enfermidades, e conseqüentemente, a eficácia da vacina.

A administração destes produtos aos animais pode ser de forma contínua, expondo-os ao agente por um longo período; ou de forma periódica, em curtos períodos, sendo a forma mais indicada. A administração por longos períodos pode tornar o animal tolerante ao composto, deixando-o dessensibilizado, podendo até induzir imunossupressão (Shakya et al., 2014; Selvaraj et al., 2015). Contudo, quando utilizado de forma periódica, os imunoestimulantes induzem o aumento na resposta imunológica e após a metabolização do composto no organismo do animal, o sistema imune retorna às condições de normalidade (Sado, 2006).

Há diferentes formas de administrar os imunoestimulantes na piscicultura, sendo elas por via oral (pelo alimento), injeção ou imersão (banhos terapêuticos) (Shakya et al., 2014; Chagas et al., 2014; Harikrishnan et al., 2011; Talpur et al., 2012), com efeitos imunológicos diferentes, dependendo da via de administração (Shakya & Labh, 2014). O método considerado mais vantajoso por alguns autores é o de injeção intraperitoneal, devido à rápida absorção e efeito do imunoestimulante, porém é um manejo que requer mão de obra especializada, é estressante aos animais e não é prático em peixes pequenos (Sakai, 1999; Harikrishnan et al., 2011). Contudo, o método via oral, pela incorporação da substância ao alimento, é o mais aplicado, por ser mais prático (Shakya et al., 2014; Chagas et al., 2014; Chakraborty et al., 2011), menos estressante e permite que um número maior de peixes seja tratado com um manejo menos oneroso e menos laborioso (Shakya et al., 2014; Selvaraj et al., 2015). O método por imersão é eficaz (Harikrishnan et al., 2011), porém, pode se apresentar

dificuldades ao realizar banhos terapêuticos, devido ao grande volume de água, elevada dose eficaz, e manejo no tratamento (Shakya & Labh, 2014).

Os efeitos de imunostimulantes nos peixes dependem de vários fatores, como o tempo de exposição, dose, método de administração, condição fisiológica do animal e espécie do animal. Sendo assim, para a utilização eficaz destes produtos, todos estes fatores citados devem ser levados em consideração (Shakya et al., 2014; Harikrishnan et al., 2011).

Na Tabela 1 podemos observar uma comparação entre quimioterápicos, vacinas e imunostimulantes, onde temos a situação em que cada componente deve ser utilizado; a eficácia de cada composto, onde os imunostimulantes podem variar de excelente a boa, dependendo do da substância utilizada; o espectro da atividade, podendo ser classificados como compostos de largo espectro, por serem eficazes contra parasitas, bactérias, entre outros.

**Tabela 1.** Comparação entre quimioterápicos, vacina e imunostimulantes. Adaptado de Sakai (1999).

| Aspectos        | Quimioterápicos | Vacina      | Imunostimulantes        |
|-----------------|-----------------|-------------|-------------------------|
| Situação de uso | Terapêutico     | Profilático | Terapêutico/Profilático |
| Eficácia        | Excelente       | Excelente   | Excelente/Boa           |
| Espectro        | Médio           | Limitado    | Largo                   |
| Duração         | Curta           | Longa       | Curta                   |

Os imunostimulantes podem ser divididos em diferentes categorias dependendo da composição, como compostos químicos sintéticos (levamisole), substâncias biológicas (derivados de bactérias, polissacarídeos, extrato de plantas ou animais), fatores nutricionais (vitaminas), hormônios (GH) e citocinas (polipeptídeos e glicopeptídeos) (Sakai, 1999; Biller-Takahashi, 2014) concentração ou atividade da mesma.

Os compostos vegetais, óleos essenciais e extratos de plantas bioativas, são substâncias naturais e inócuas, e têm grande potencial de utilização na piscicultura, pois possuem ação imunostimuladora nos peixes (Fazlollahzadeh et al., 2001; Shakya et al., 2014; Chagas et al., 2014; Harikrishnan et al., 2011; Talpur et al., 2012), com comprovadas funções antimicrobiana e antiparasitária, melhorando o nível de saúde do animal, deixando-o preparado para enfrentar as adversidades do meio em que vive (Syahidah et al., 2015; Chagas et al., 2014; Harikrishnan et al., 2011). Plantas com propriedades terapêuticas são, atualmente, fontes importantes de compostos biológicos ativos para o tratamento de doenças em peixes

(Chagas et al., 2014), ainda mais por ter grande disponibilidade, baixo custo, potencial de ação de largo espectro, biodegradáveis (Shakya & Labh., 2014), e portanto, não causam nenhum dano à saúde humana e ao meio ambiente (Fazlolahzadeh et al., 2001; Shakya et al., 2014; Chagas et al., 2014).

Diversos vegetais possuem comprovadas ações imunoestimulantes na piscicultura, como alho (*Allium sativum*), gengibre (*Zingiber officinale*), nim (*Azadirachta indica*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), babosa (*Aloe barbadensis*), linhaça (*Linum usitatissimum*), entre outros. Podem ser utilizadas diferentes partes das plantas para extrair os compostos benéficos, como as folhas, caules, raiz, bulbos, sementes, entre outros.

Portanto, segundo Biller-Takahashi (Biller-Takahashi, 2014), o uso de imunoestimulantes é uma alternativa profilática ao uso de fármacos. Porém, estudos ainda devem ser realizados para comprovar a ação benéfica desses compostos sobre o organismo do animal, uma vez que nem mesmo o sistema imune dos peixes está totalmente desvendado. De acordo com a mesma autora, diversos processos envolvem a interação do sistema imunológico dos peixes com os compostos imunoestimulantes. Assim, o conhecimento do sistema imune dos peixes é necessário para uma boa avaliação do composto imunoestimulante.

### **2.2.1. Alho (*Allium sativum*)**

Alho (*Allium sativum*) provavelmente é uma das mais antigas plantas conhecidas (Jegade, 2012; Harris, 2011), assim como seus efeitos medicinais (Shakya et al., 2014; Jegede, 2012; Harris, 2011). Pesquisas sugerem que o alho se originou na Ásia Central, e não se sabe ao certo a origem do nome. O alho pertence à família Lillaceae, assim como a cebola e cebolinha (Harris, 2011).

Apesar de vários relatos sobre a utilização medicinal do alho ao longo da história, as pesquisas para estudar as reais ações deste vegetal sobre um organismo começaram em meados de 1844, por um cientista alemão (Harris, 2011). A partir desse estudo inicial, vários outros começaram a surgir, e comprovaram diversas ações como antimicrobianas (antiparasitário, antibacteriano, antifúngico) (Shakya et al., 2014; Jegede 2012; Harris, 2011; Corzo-Martínez, 2007), hepatoprotetor, inseticida (Shakya, Labh, 2014), entre outros. O alho é considerado um dos imunoestimulantes naturais mais eficazes (Lee & Gao, 2012).

Na aquicultura os estudos se iniciaram recentemente, e se desenvolveu com a popularização de ervas chinesas na produção de organismos aquáticos (Shakya et al., 2014; Lee et al., 2012). Estudos concluíram possuir diversas ações benéficas aos animais aquáticos,

como promotor de crescimento (Shalaby et al., 2006; Shakya et al., 2014; Lee et al., 2012), estimulador de apetite (Shakya, 2014; Lee et al., 2012) antimicrobiano (Selvaraj et al., 2015; Jegede, 2012; Corzo-Martínez, 2007), antioxidante e imunoestimulante (Corzo-Martínez, 2007; Lee et al., 2012). O vegetal exerce ainda efeito nos parâmetros hematológicos (Talpur & Ikhwanuddin, 2012) e tem a capacidade de aumentar o bem-estar dos peixes (Fazlolahzadeh et al., 2001). Segundo resultados de estudos, o alho incluso na dieta de peixes é capaz de melhorar a qualidade da carne (diminuindo o teor lipídico e de colesterol, e aumentando o teor de proteína) (Shakya et al., 2014; Aly et al., 2008; Lee et al., 2012) e aumentar o tempo de prateleira do produto fresco (Aly et al., 2008). O alho adicionado à ração para peixes não interfere na palatabilidade e aceitação da mesma (Militz, 2013).

Os produtos à base de alho podem ser classificados em quatro grupos: óleo essencial de alho, óleo de alho macerado, alho em pó e extrato de alho (Jegede, 2012). A parte do vegetal utilizada para produção dos produtos é o bulbo (Ndong et al., 2001; Aly et al., 2008; Fabregat, 2006; Alsaïd et al., 2010), onde há grande concentração de alicina, que é o principal composto organosulfurado, considerado um componente imunologicamente ativo (Lee & Gao, 2012), com capacidade de eliminar uma gama de agentes patogênicos como fungos e bactérias, representando em até 70 % dos organosulfurados presentes no vegetal (Aly et al., 2008). O teor de alicina e de outros compostos pode variar dependendo de diferentes fatores (Lee et al., 2012; Huchette et al., 2005) como o genótipo e fatores ambientais, como o nível de enxofre no solo, disponibilidade de água, luminosidade e temperatura (Huchette et al., 2005).

Diversos estudos comprovaram a ação de promotor de crescimento do alho em peixes (Shalaby et al., 2006; Fabregat, 2006; Nya et al., 2009; Corzo-Martínez, 2007; Lee et al., 2012), contudo há estudos que concluíram que o alho não faz efeito no crescimento dos peixes (Ndong & Fall, 2001) Shalaby et al. (2006) concluiu que a concentração de 30 gramas de alho por quilo de ração, promove com sucesso, o crescimento de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), ao comparar com outras doses de alho em pó na dieta (0g, 10g, e 40g) e doses de clorfenicol (15g, 30g e 45 g). Outros autores relataram o sucesso na avaliação do desempenho de crescimento de peixes com a utilização deste vegetal, como o melhor desempenho da Perca Gigante (*Lates niloticus*) com a utilização de 20 gramas de alho por quilo de ração (Fabregat, 2006); 1,3% de alho na ração para a avaliação em Orange Spotted (*Amblyeleotris Guttata*) (Corzo-Martínez, 2007), 0,5 % de alho na dieta ao avaliar esturjão (Lee Dh. et al., 2012); e no desempenho da truta arco-íris, onde a concentração de melhor resultado foi de 1% de inclusão de alho na dieta (Nya & Austin, 2009).

A atividade antimicrobiana do alho é comprovada em diversos estudos, sendo ele um dos mais eficaz imunestimulante natural (Shakya & Labh S.N., 2014). Guo et al. (2012) relatam menor mortalidade de peixes desafiados com *Streptococcus iniae*, quando alimentados com dietas suplementadas com 1,3% de alho na ração. O alho mostrou-se eficaz também contra *Aeromonas hydrophila*, uma das mais importantes bacterioses na piscicultura (Pavanelli, 2008), onde diferentes concentrações mostraram-se eficazes para diversas espécies de peixes. Em truta arco-íris, as concentrações de 0,5 e 1,0% de alho na alimentação foi eficiente na diminuição da mortalidade de peixes desafiados (4% de mortalidade), comparando com o grupo controle (88% de mortalidade) (Nya & Austin, 2009). Em outro estudo, *Carpas indianas* (*Labeo rohita*) desafiados com *Aeromonas hydrophila*, tiveram alto índice de sobrevivência, quando alimentados com dietas contendo 0,1 e 0,5% de *Allium sativum* na dieta (Sahu et al., 2007). Em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a adição de 10 e 20 gramas de alho na dieta mostrou diferença significativa na sobrevivência de peixes desafiados com *Aeromonas hydrophila*, quando comparados com o controle (sem suplementação), porém não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (Aly et al., 2008). Alsaïd et al. (2010) concluíram que o alho também possui ação antibacteriana contra *Streptococcus agalactiae*, uma outra importante bacteriose que acomete peixes no Brasil (Pavanelli, 2008), sendo a única que possui vacina registrada para uso na aquicultura no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Com isso, a associação do efeito antibacteriano do alho, com a vacinação contra *Streptococcus agalactiae* pode ser uma estratégia no combate a este agente que causa grandes prejuízos econômicos (Vaseeharan & Thaya, 2013).

As doenças parasitárias em peixes são de grande importância na piscicultura, devido à diversidade de espécies de parasitas que podem acometer os peixes, causando grandes prejuízos econômicos (Pavanelli, 2008). Militz (2013), concluiu que a adição de alho em pó na dieta de peixes tem grande efeito antiparasitário contra monogenoïdes, podendo reduzir em até 70% da infestação quando comparado a peixes que não se alimentam de dietas suplementadas com alho. Um dos parasitas responsável pelos maiores prejuízos econômicos, em nível mundial, é *Ichthyophthirius multifiliis* (Pavanelli, 2008), e estudos mostram que pode se ter redução da infestação deste parasita, quando peixes são banhados com água em 0,1 grama de extrato de alho por litro de água (Kanani et al., 2012). Outro parasita de grande importância na piscicultura é *Trichodina* sp. que pode ser prevenido com a utilização de 8 gramas de alho em pó por quilo de ração ofertada à tilápia do Nilo (Ahmed et al., 2009); ou

por meio de banho terapêutico com 800 mg de extrato de alho por litro de água durante dois dias, para a mesma espécie de peixe (Chitmanat et al., 2005).

Diante das inúmeras vantagens e resultados positivos da utilização do *Allium sativum* na piscicultura, há também resultados negativos, como ao testar o uso do alho no combate à saprolegniose em ovos de carpa comum (*Cyprinus carpio*), concluiu-se que a dose de 4 gramas de alho por litro de água pode inviabilizar todos os ovos (Abdel-hadi, 2008). Outros autores relataram que o uso do extrato de bulbos de alho em longos períodos (dois meses ou mais), mostrou efeito contraditório em relação ao crescimento e resposta do sistema imunológico (Diab, 2002). A dose ideal e o tempo de exposição dos peixes ao alho ainda não está bem definida para o uso na piscicultura (Syahidah et al., 2015).

O alho promove uma melhoria nas atividades imunológicas e exerce também, efeito nos parâmetros hematológicos de peixes (Nya & Austin, 2009). Diversos autores relataram a melhoria nos parâmetros hemato-imunológicos em peixes submetidos à administração de alho, comprovando a sua função imunoestimulante. O estímulo destas funções imunológicas é importante na proteção contra enfermidades (Lee & Gao, 2012).

Proporções de monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e trombócitos se encontravam elevadas em peixes com dietas suplementadas com alho (Ndong et al., 2001; Shakya et al., 2014; Aly et al., 2008; Fabregat, 2006; Nya et al., 2009), assim como eritrócitos (Shakya et al., 2014; Aly et al., 2008; Nya et al., 2009; Sahu, 2007), hemoglobina (Shakya & Labh, 2014) e hematócrito (Shakya et al., 2014; Nya et al., 2009). Vários autores relataram um maior índice de atividade fagocitária em peixes com dietas com alho, comparados ao grupo controle (Ndong et al., 2001; Fabregat, 2006; Nya et al., 2009; Lee et al., 2012; Sahu et al., 2007). Ocorre também uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em específico do aniôn superóxido (Fabregat, 2006; Sahu et al., 2007) nos tratamentos alimentados com alho, assim como um aumento significativo na explosão respiratória (Ndong et al., 2001; Fabregat, 2006; Lee et al., 2012; Sahu et al., 2007). Nos tratamentos em que peixes foram alimentados com dietas com alho, a atividade da lisozima foi significativamente elevada (Ndong et al., 2001; Fabregat, 2006; Nya et al., 2009; Sahu et al., 2007), assim como a atividade anti-protease (Fabregat, 2006; Nya et al., 2009), e houve atividade bactericida significativa, em que o número de colônias viáveis foram inferiores ao grupo controle (Fabregat, 2006; Nya et al., 2009; Lee et al., 2012).

Contudo, a utilização do alho na piscicultura é de grande valia, por ser um produto amplamente disponível no mercado, de baixo custo, e com comprovada ação a vários agentes que acometem os peixes, e ação imunoestimulante.

### **Considerações Finais**

Diante do exposto, observa-se que os peixes possuem sistema imune imunológico semelhante ao de mamíferos, porém possuem mecanismos não-específicos de defesa. Desse modo, a imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa nesses animais, não sendo necessário o reconhecimento específico do antígeno. Além disso, os problemas com doenças têm se tornado cada vez mais comuns em pisciculturas comerciais, e com isso têm-se buscado alternativas como o uso de imunostimulantes. São produtos inócuos ao ser humano e ao meio ambiente, respeitando a sustentabilidade. O uso de compostos vegetais como imunostimulantes tem sido bem estudado, como por exemplo, o alho. É um vegetal capaz de reforçar a proteção contra patógenos, podendo ser utilizado como alternativa a antibióticos e quimioterápicos. Portanto, é necessário que ainda haja maiores estudos sob condições práticas, para que futuramente possa ser incorporado na rotina das pisciculturas.

### **Referências**

Abdel-Hadi. Study on the use of *Artemisia cina* L. (wormseed plants) and *Allium sativum* (garlic) in the control of Saprolegniosis in egg of *Cyprinus carpio* (common carp) and *Hypophthalmichthys molitrix* (silver carp). (2008). The 30th Malaysian Symposium on Microbiology (MSM). Hyatt Regency Resort, Kuantan, Malaysia, August 16-19, 2008. Abdel-Hadi, Y.M., Saleh, O.A. and Akar, A.M., 2008.

Affonso, SF. (2006) Efeito tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey,1860) causado por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo. [Tese]. São Paulo, Universidade de São Paulo.

Ahmed, IE, Deen, NE, Mohamed A. (2009). Application of some medicinal Plants to eliminate *Trichodina* sp. In tilapia (*Oreochromis niloticus*). Report and Opinion, 1(6):1-5.

Alsaid, M, Daud, h, Bejo, SK, Abuseliana A. (2010). Antimicrobial activities of some culinary spice extravts against *Streptococcus agalactiae* and its ptophylactic uses to prevent Streptococcal infection in red hybrid Tilapia (*Oreochromis* sp.). World journal of fish and marine sciences, 2(6):532-538.

Aly, SM, Atti, NMA, Mohamed, MF. (2008). Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of oreochromis niloticus. In: 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008, Cairo, Egito, p.277-194.

Araújo, GS. (2006). Efeito imunestimulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha Gracilaria caudata na reversão sexual de tilápia do Nilo, Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1766) em condições adversas. [Dissertação]. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará.

Ayroza, LMS, Romagosa, E, Ayroza, DMMR, Filho, JDS, Salles, FA. (2011). Custos e rentabilidade da produção de juvenis de tilápia-do-nilo em tanques-rede utilizando-se diferentes densidades de estocagem. R. Bras. Zootec., 40 (2):231-239.

Biller-Takahashi, JD. Imunoestimulantes e imunidade de organismos aquáticos. (2014). In: Maldi RR, Campos CM, Lizama MAP, Takemoto RM. Responsabilidade intelectual. Patologia e sanidade de ambientes aquáticos. Maringá: Editora Massoni, p.295.

Bowden, TJ, Cook, P, Rombout, JHWM. (2015). Development and function of the thymus in teleosts. Fish & Shekkfish Immunology, 19:413-427.

BRASIL, Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010. (2012). Ministério da Pesca e Aquicultura.

Chagas, EC, Majolo, C, Boijink, CL, Chaves, FCM, Hashimoto, GSO, Figueredo, AB, Martins, ML. (2014). Uso de óleos essenciais e extratos no tratamento de enfermidades de peixes. In: Maldi RR, Campos CM, Lizama MAP, Takemoto RM, responsabilidade intelectual. Patologia e sanidade de ambientes aquáticos. Maringá: Editora Massoni, p.269.

Chakraborty SB, Hancz C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant antipathogenic and antistress agents in fish culture. Reviews in Aquaculture, 3:103-119.

Chitmanat C, Tongdonmuan K, Nunsong W. (2005). The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate Trichodina sp. in tilapia (Oreochromis niloticus) fingerlings. Songklanakarin J. Sci. Technol, 27(1):359-364.

Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18; 609-625.

Diab, A. S., G. O. El-Nagar, and Y. M. Abd-El-Hady. (2002). Evaluation of *Nigella sativa* L (black seeds; baraka), *Allium sativum* (garlic) and BIOGEN as feed additives on growth performance and immunostimulants of *O. niloticus* fingerlings. *Suez Canal Vet. Med. J.*, 745-775.

Ellis, AE. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25:827-839.

Fabregat, TEHP. (2006) Utilização do prebiótico flavofeed® como suplemento dietário para juvenis de tilápia do nilo *oreochromis niloticus*. [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual de São Paulo, Centro de Aquicultura da UNESP.

Fast, MD, Sims, DE, Burks, JF, Mustafa, A, Ross, NW. (2002). Skin morphology and humoral non-specific defense parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132(Part A):645-657.

Fazlolahzadeh, F, Keramati, K, Nazifi, S, Shirian, S, Seifi, S. (2011). Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Hematological Parameters and Plasma Activities of ALT and AST of Rainbow trout in Temperature Stress. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(9); 84-90.

Guo, JJ, Kuo, CM, Chuang, JW, Hong, RL, Chou, TIC. (2012). The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against *Streptococcus iniae* and on growth in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 33-38; 364-365.

Hai, NV. (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture* 446:88-96.

Harikrishnan, R, Balasundaram, C, Heo, MS. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317:1-15.

Harris, JC, Cottrell, SI, Plummer, S, Lloyd, D. (2011). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl microbial biotechnol*, 57:282-286.

Huchette, O, Kahane, R, Bellamy, C. (2005). Influence of environ and genetic factors on the allicin content of garlic bulbs. *Acta Horticulture*, 688:93-99.

Jegede, T. (2012). Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Growth, Nutrient Utilization, Resistance and Survival of *Tilapia zillii* (Gervais 1852) Fingerlings. *Journal of Agricultural Science*, 4(2):269:274.

Kanani, HG, Sahandi, J, Taheri, A. (2012). Influence of Garlic (*Allium sativum*) anf mother worth (*Matricaria chamomulli*) extract on *Ichthyophthirius multificuls* parasite treatment in sail fin molly (*Poecilia latipinna*) ornamental fish. *APCBEE Procedia*, 4:6-11.

Lee, Dh, Ra, CS, Song, YH, Sung, KI, Kim, JD. (2012). Effects of dietary garlic extract on growth, feed utilization and whole body composition of juvenile starlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*). *Asian-Aust J. anim. Sci.*, 25(4):577-583.

Lee, JY, Gao, Y. (2012). Review of the application of garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. *Journal of the world aquaculture society*, 43 (4):447-458

Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish. *Fish & Shekkfish Immunology*, 20:137- 151.

Militz, TA, Southgate, PC, Carton, AG, Hutson, KS. (2013). Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in aquaculture. *Aquaculture*, 95–99:408–409

Mouriño, JIP, Jatobá, A, Silva, BC, Vieira, FN, Martins, ML. (2012). Probióticos na aquicultura. In: Silva-Souza AT, Lizama MAP, Takemoto RM, responsabilidade intelectual. *Patologia e sanidade de organismos aquáticos*. Maringá: Editora Massoni, p.381.

Ndong, D, Fall, J. (2011). The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research*, 3(1); 1-9.

Nya, EJ, Austin, B. (2009). Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 32:963-970.

Pavanelli, GC, Eiras, JC, Takemoto, RM. (2008). *Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3ª Ed. Maringá; Editora da Universidade Estadual de Maringá, p.311.

Press, CM, Evensen, O. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9:309-318.

Sado, RY. (2006). *Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)*. [Tese]. Piracicaba: Universidade de São Paulo.

Sahu, S, Das, BK. (2007). Mishra, J. Pradhan, and N. Sarangi. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Ichthyology*, 23:80- 86.

Saita, MV. (2010). *Parâmetros produtivos, fisiológicos e imunológicos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos à restrição alimentar e estresse de manejo*. [Dissertação]. Jaboticabal: UNESP.

Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172:63-92.

Selvaraj, V, Sampath, K, Sekar, V. (2015). Administration of yeast glucan enhancer survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 19:293-306.

Shakya SR, Labh SN. (2014). Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 2 (4): 44-47.

Shalaby, AM, Khattab, YA, Abdel Rahman, AM. (2006). Effects of garlic (*allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 12 (2); 172- 201.

Subramanian, S, MacKinnon, SL, Ross, NW. (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148:256-263.

Syahidah, A, Saad, CR, Daud, HM, Abdelhadi, YM. (2015). Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(1):27-44.

Talpur, AD, Ikhwanuddin, M. (2012). Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lateolabrax niloticus* (Bloch). *Aquaculture*, 364-365; 6-12.

Urbinati, EC, Carneiro, PCF. (2004). Práticas de Manejo e Estresse dos Peixes em Piscicultura Intensiva. In Cyrino JEP, Urbinati EC, Castagnolli N. *Tópicos Especiais em Piscicultura Tropical*. São Paulo. Editora TecArt, p.171-193.

Vaseeharan, B, Thaya, R. (2013). Medicinal plant derivatives as immunostimulantes: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*, 22(3):1079–1091.

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Fabício Sado Rodrigues – 40%

Sarah Rodrigues Chagas – 10%

Maria Cristina Veríssimo Rocha – 10%

Eduardo de Paula Nascente – 10%

Fernanda Gomes de Paula – 15%

Lívia Mendonça Pascoal – 15%