

**Incidência Fúngica em Silagem de *Calotropis procera* S. W.
em Associação a *Leersia hexandra*¹**

**Fungi Incidence Determination in Silage of *Calotropis Procera* S.W.
in Association with *Leersia hexandra***

Adalmira Bezerra de Lima^{2*},
Aderbal Marcos de Azevedo Silva,
Ariosvaldo Nunes de Medeiros,
Onaldo Guedes Rodrigues,
Gilvan José Campelo dos Santos,
José Rômulo Soares dos Santos

Resumo

Determinou-se a incidência fúngica na silagem de flor de seda (*C. procera* S. W.) em associação ao capim andrequicé (*L. hexandra*). O experimento foi desenvolvido no LPF/LANA/CSTR/UFCG, campus de Patos-PB. Os tratamentos experimentais constaram de silagens formadas pela associação de flor de seda com pré-secagens em 12, 24 e 36 horas ao capim andrequicé nas seguintes proporções: 33:67; 66:34; 100:0, respectivamente. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, num arranjo fatorial 3 X 3 (níveis de flor de seda e tempos de pré-secagem), com 5 repetições. As forragens foram ensiladas em silos experimentais de PVC, que permaneceram lacrados por 90 dias. Após a abertura dos silos foram colhidas amostras das silagens para isolamento, identificação e quantificação dos fungos. Os gêneros incidentes foram: *Aspergillus spp.*, *Epicocum spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicilium spp.*, *Torula spp.*, *Nigrospora spp.*, *Mucor spp.* e levedura. As silagens, com pré-secagem de 24 horas apresentaram menores valores de fungos toxigênicos, e os níveis crescentes de flor de seda indicaram redução nos níveis de fungos toxigênicos.

Palavras-chaves: silagem, flor de seda, capim andrequicé, fungos toxigênicos.

Abstract

It was aimed at with this work to determine the fungi incidence on silage of fror de seda (*C. procera* S.W) in association with andrequise glass (*L. hexandra*) The experiment was developed in LPF/LANA/CSTR/UFCG, in Patos-PB. The experimental treatments consisted of silagens formed by the association *Calotropis procera* withered in 12, 24 and 36 hours with andrequise glsass. in the following proportions: 33:67; 66:34; 100:0; with *Calotropis*. The experimental samples were distribuied in a completely randomized design in 3 X 3 (levels and time of the drying) factorial scheme; with five repetitions. The forage were ensiled in experimental silos of P.V.C, that stayed sealed by 90 days. After the opening of the silos, samples of the silagens were collected for isolation, identification and quantification of fungi. The fungi incidents were: *Aspergillus spp.*, *Epicocum spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicilium spp.*, *Torula spp.*, *Nigrospora spp.*, *Mucor spp.* and levedura. It was aimed that silages, drying 24 hours, apresented less values of toxigenic fungi. The crescents levels of flor de seda indicated reduction of toxigenics fungi.

Keywords: silage, milk-weed, Andrequice grass, toxigenics fungi.

Introdução

Os fungos têm importante papel nos processos de deterioração da silagem e este fato, em particular, está mais relacionado à ação fúngica do que à composição química (WOOLFORD *et al.*, 1982).

Fungos são microrganismos heterotróficos uni ou multicelulares que crescem em plantas, grãos, alimentos e matéria orgânica em geral; produzem enzimas digestivas que digerem a matéria orgânica, causando deterioração do substrato, resultando em alterações na qualidade dos alimentos. Há casos em que alterações fúngicas são desejáveis, como na reciclagem de resíduos da matéria orgânica, na produção de alimentos e na produção de antibióticos. Em contrapartida, existem os fungos patogênicos que durante o crescimento das colônias liberam micotoxinas que estão associadas a alterações na composição dos alimentos (DINIZ, 2002).

Após a formação das toxinas, elas permanecerão no produto, mesmo que o fungo seja destruído. As cinco micotoxinas de importância agro-econômica são as aflatoxina, zearalenona, deoxivalenol, nivalenol, fumonisinas e ocratoxina, produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (HUSSEIN & BRASEL, 2001). MCDONALD *et al.*, (1991), MUCK *et al.*, (1992) relataram que alguns bolores, como as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* desenvolvem-se em silagens na presença de ar produzindo toxinas que oferecem riscos aos animais e ao homem. A pré-secagem permite que as forragens sejam armazenadas com teor de matéria seca ideal, podendo-se controlar as fermentações indesejáveis, facilmente, através do aumento da pressão osmótica (MUCK, 1990).

A deterioração aeróbica, por sua complexidade, necessita da interação de fatores químicos, físicos e microbiológicos (SANDERSON, 1993). Além disso, a penetração de ar pode favorecer aos microrganismos aeróbios influenciando a qualidade das silagens (MCDONALD *et al.*, 1991).

Tal assertiva é corroborada por McDonald *et al.*, (1991) quando afirmam que os fungos, especificamente as leveduras, são os mais assíduos nos frequentes processos de deterioração da silagem. Além disso, Lindgren *et al.*, (1985) apontam para o fato de que a assimilação de lactato da silagem por fungos, leveduras e bacilos diminui o potencial da conservação da silagem. Para McDonald *et al.*, (1991) e Muck *et al.*, (1992), a ação direta na degradação do açúcar e ácido láctico pela via normal da respiração, bem como a hidrólise e metabolização da celulose e demais constituintes da parede celular indicam como indesejável a existência desses fungos nas silagens. Culmina em perda de nutrientes e, conseqüentemente, compromete o valor nutritivo da silagem.

A *C. procera* vem sendo explorada na região Semi-árida como forrageira, seja através da fenação natural, seja com a pré-secagem pós trituração. Esta planta possui 20,97% de matéria seca, ENN de 34,80 % e teor de proteína variando de 13,61 % (OLIVEIRA, 2002) a 19,42 % (ABBAS, 1992) e, quando na forma de feno, seu teor protéico se eleva para 21,23 % (VAZ *et al.*, 1998), com digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica, apenas das folhas, de 72 e 68 %, respectivamente (FALL, 1991), além de possuir alguns princípios farmacológicos com ação abiótica (AKHTAR, 1992). Aliado aos valores nutritivos desta forrageira, observa-se que sua produção na região semi-árida ocorre durante todo o ano, apresentando seu pique de produção no período das chuvas, momento em que há excedente de forragem nesta região. Merece, portanto, estudos acerca de sua conservação e incidência fúngica como forrageira, na forma de silagem, uma vez que na forma de feno, tem-se obtido resultados satisfatórios (VAZ *et al.*, 1998).

Assim, objetivou-se com este experimento determinar a incidência fúngica nas silagens de *C. procera* S. W. associada à *L. hexandra*.

Material e Métodos

Este experimento foi conduzido nos Laboratórios de Patologia Florestal e de Nutrição Animal do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). As plantas de *C. procera* S. W e *L. hexandra* foram colhidas na fazenda Maria Paz, no município de São José de Espinharas - PB. *C. procera* S. W. passou por um processo de pré-secagem de 12, 24 e 36 horas, no local de colheita. Após a pré-secagem foi associada ao *L. hexandra*, que teve apenas 12 horas de pré-secagem) nas proporções 33:67; 66:34; 100:0, respectivamente, em silos de PVC de 200 mm de diâmetro, armazenados no anexo do Laboratório de Nutrição Animal/CSTR/Campus de Patos/UFCG, durante 90 dias.

Após o período de conservação da silagem, por ocasião da abertura dos silos, foram retiradas amostras para incubação e posterior análise de incidência de fungos na silagem de cada um dos nove tratamentos.

A quantificação e isolamento dos fungos e leveduras envolvidos no processo de deterioração das silagens seguiram as recomendações de Woolford (1984) e Silva *et al.*, (1997). As amostras das silagens foram acondicionadas em frascos esterilizados e vedados. As amostras das silagens foram colocadas em água estéril, em seguida, transferidas para placas de Petri (nove centímetros de diâmetros) contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Logo após, as placas foram acondicionadas em temperatura ambiente no Laboratório de Patologia Florestal/CSTR/Campus de Patos/UFCG, para se observar o crescimento fúngico durante 15 dias. Posteriormente, foram retiradas amostras para quantificação, identificação e isolamento de microrganismos através de microscópios estereoscópio e ótico.

O Delineamento Experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado com um arranjo fatorial 3 X 3 (níveis de flor de seda e tempo de pré-secagem) com 5 repetições.

Para efeito da análise estatística os dados de incidência de fungos, em percentagem, foram transformados em $\text{ArcSen } \sqrt{X/100}$ e analisados através do procedimento de análise de variância PROC ANOVA do SAS (1999), adotando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + FS_i + TP_j + FSTP_{ijk} + E_{ijk};$$

Y_{ijk} = valor observado para a característica analisada;
 m = média geral;
 FS_i = efeito do nível de flor de seda i , com $i = 33, 67$ e 100% ;
 TP_j = efeito do tempo de pré-secagem j , com $j = 12, 24$ e 36 horas;
 $FSTP_{ijk}$ = efeito da interação entre ($FS_i \times TP_j$);
 E_{ijk} = erro experimental associado a Y_{ijk} .

Os contrastes entre médias foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Resultados e Discussão

A incidência de fungos observados nos silos de flor de seda (FS), *C. procera* S. W em associação com ao *L. hexandra* encontra-se nas Tabelas 01 e 02.

Tabela 01 - Incidência fúngica (X_{ij} , dados transformados em $\text{arcSen } \sqrt{X/100}$) em silagem de *C. procera* S. W., nas proporções de 33, 66 e 100 % associada ao *L. Hexandra*.

Fungos	Níveis de Flor de Seda		
	33 %	66 %	100 %
<i>A. niger</i>	0,031	0,062	0,124
<i>A. candidus</i>	0,000	0,000	0,031
<i>Nigrospora spp.</i>	0,000	0,031	0,000
<i>Torula spp</i>	0,000 ^A	0,031 ^{AB}	0,0124 ^B
<i>Epicocum spp.</i>	0,031	0,000	0,000
<i>Fusarium spp.</i>	0,000	0,031	0,031
<i>Penicillium spp.</i>	0,031	0,000	0,000
<i>Levedura</i>	0,000	0,062	0,093

X Médias seguidas de diferentes letras entre colunas, diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. NFS = Níveis de flor de seda

Os tratamentos estudados não apresentaram efeito significativo ($P > 0,05$) quanto à presença dos fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, *Nigrospora*, *Epicocum spp.*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Levedura* (Tabela 01).

Observou-se que no tratamento com 33 % de FS ocorreu uma incidência de três gêneros (*Aspergillus spp.*, *Epicocum spp.* e *Penicillium spp.*), enquanto no tratamento com 66 % de FS, verificou-se a ocorrência de cinco gêneros (*Aspergillus spp.*, *Nigrospora spp.*, *Torula spp.*, *Mucor spp.* e *Fusarium spp.*) e leveduras, e no de 100% ocorreu a incidência de três gêneros (*Aspergillus spp.*, *Torula spp.* e *Fusarium spp.*) e leveduras.

Dentre os tratamentos estudados, apenas o gênero *Torula spp.* teve efeito independente, em que a concentração desse fungo cresceu à medida que se elevou o NFS (Tabela 01) e quanto ao tempo de pré-secagem (TPS), o período de 12 horas (0,00) diferiu do TPS de 36 horas (0,124) ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Contudo, este fungo não é toxigênico, podendo apenas ter afetado a composição bromatológica da silagem.

Quanto à proliferação dos fungos *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus*, *A. alutaceus* e *mucor spp.* nas silagens estudadas, houve efeito de interação entre o nível de flor de seda e o tempo de pré-secagem ao nível de 5 % de probabilidade (Tabela 02).

Tabela 02 - Incidência fúngica em silagem de flor de seda (*Calotropis procera* S.W.), nas proporções de 33, 66 e 100 %, com 12, 24 e 36 horas de pré-secagem, associada ao capim andrequicé (*Leersia Hexandra*).

Fungos	33%			66%			100%		
	12	24	36	12	24	36	12	24	36
<i>A. glaucus</i>	0,18 ^{Aa}	0 ^B	0 ^B	0 ^{Bb}	0 ^B	0 ^B	0 ^{Bb}	0 ^B	0 ^B
<i>A. flavus</i>	0,18 ^{Ba}	0,093 ^B	0 ^B	0,46 ^{Ab}	0 ^B	0 ^B	0 ^{Ba}	0,093 ^B	0 ^B
<i>A. alutaceus</i>	0,093 ^A	0 ^A	0,37 ^{Aa}	0 ^A	0 ^A	0 ^{Aa}	0,093 ^A	0 ^A	0 ^{Ab}
<i>Mucor spp.</i>	0 ^B	0 ^{Bb}	0 ^B	0 ^B	0,37 ^{Aa}	0 ^B	0 ^B	0 ^{Bb}	0 ^B

X_{ij} Dados transformados em $\text{ArcSen } \sqrt{X/100}$, \bar{X} Médias seguidas de diferentes letras minúsculas entre colunas dos diferentes NCP, em cada TPS e maiúsculas entre colunas dos diferentes TPS, para cada NCP, diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quanto ao efeito do NFS dentro do TPS de 12 horas na proliferação de *A. flavus*, constatou-se que não houve presença do fungo com 100 % de FS, e a presença do referido fungo foi maior em nível de 66 % de FS que em nível de 33% de FS. E a proliferação deste fungo dentro do nível de 66% de FS, em função dos TPS, ocorreu apenas com 12 horas de pré-secagem da FS.

Analisando o efeito dos NFS, em função dos TPS, na proliferação de *A. glaucos*, observou-se que só houve proliferação do fungo no nível de 33 % de FS, dentro do TPS de 12 horas ($P < 0,05$).

Ao analisar o efeito do NFS, dentro do TPS na proliferação de *A. alutaceus* constatou-se que houve efeito apenas no tempo de 36 horas no NFS de 33 %, e dentro do NFS de 33 % não houve efeito do TPS ($P > 0,05$).

Quanto ao *Mucor spp.*, só houve proliferação do fungo no nível de 66 % de FS, dentro do TPS de 24 horas ($P < 0,05$). Observa-se que os níveis crescentes de FS contribuíram para ligeira redução na proliferação fúngica com ação toxigênica, provavelmente devido a seus princípios farmacológicos (AKHTAR *et al.*, 1992; ALI *et al.*, 2001).

Os fungos para se desenvolverem e produzirem micotoxinas necessitam de condições favoráveis, sendo a temperatura, a umidade e o tipo de substrato, as mais importantes (MALLOZZI & CORRÊA, 1998). O conhecimento da utilização destes fatores para o controle do crescimento de fungos e a produção de micotoxinas pode constituir uma poderosa ferramenta para diminuir a incidência fúngica.

Para Bullerman *et al.*, (1984), a presença do fungo produtor não indica a presença da micotoxina, especialmente se o crescimento fúngico não ocorrer. Neste sentido, o simples isolamento e confirmação de fungos micotoxigênicos em alimentos não indicam presença de micotoxinas (HUSSEIN & BRASEL, 2001), pois tanto o crescimento do fungo quanto a produção de micotoxinas são dependentes de vários fatores, sendo os limites para a produção normalmente mais estreitos do que para o crescimento (FRISVAD & SANSON, 1992).

Conclusão

Dessa forma concluiu-se que a pré-secagem de 12 e 24 horas da *C. procera S. W* na ensilagem não comprometem a qualidade da silagem, quanto ao aparecimento de fungos toxigênicos. Os Níveis crescentes de *C. prócera S. W*) reduzem a presença de fungos toxigênicos.

Referências Bibliográficas

- ABBAS, B. A. E., EL TAYEB, SULLEIMAN, Y. R. (1992). *Calotropis procera*: feed potential for arid zones. *Veterinary Record*. V.131, n. 6. 132 p.
- AKHTAR, N., MALIK, A., ALI, S.N., KAZMI, S.U. (1992). Proceragenin, an antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, v. 31, no. 8, p. 2821 – 2824.
- ALI, N.A.A., JULICH, W. D., C. KUSNICK, C., LINDEQUIST, U. (2001). Screening of Yemini medicinal plants for antibacterial and citotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 74, p. 173 – 179.
- BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. (1984). Formation and control of mycotoxins in food. *J. Food Prot.*, v. 47, n. 8, p. 637 - 646.
- DINIZ, S.S.S. (2002). *Micotoxinas*. Campinas-SP: Emopi., 181 p.
- FALL, S. T. (1991). Digestibilité in vitro et dégradabilité in situ dans le rumen de ligneux fourragers disponibles sur pâturages naturels au sénegal. *Premiers resultatas. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays. Trop.* V. 44, n. 3, p. 345 - 354.
- FRISVAD, J.C. & SAMSON, R.A. (, 1992). Filamentous in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARARI, D.K. (Eds.) *Handbook of Applied Mycology: "Mycotoxins in Ecological Systems"*. New York:

Marcel Dekker. v. 5, p. 32 - 57.

HUSSEIN, S.H. & BRASEL, J.M. (2001) Toxicology, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v. 167, p. 101 - 134.

LINDGREN, S., PETTERSON, K. KASPRSON, A. *et al.*,. (1985). Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 36, p. 765 - 774,

MALLOZZI, A.B. & CORRÊA, B. (1998). Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. *Bol. Técn. Inst. Biol, São Paulo*, n. 12, p. 5 - 26.

McDONALD, A. R. Henderson, and S.J.E. Heron. (1991). *The Biochemistry of Silage*. 2nd Ed. Chalcombe publ., Marlow, Bucks, U. K.

MUCK, R. E. (1990). Dry matter level effects on alfafa silage quality. II Fermentation products and starch hydrolysis. *Transaction of ASAE*, v. 33, n. 2, p. 373 – 381.

MUCK, R. E., SPOETRA, S. F., WIKESLAAR, P. G. (1992). Effects of carbon dioxide on fermentation and aerobic stability of mayze silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 59, p. 405 – 412.

OLIVEIRA, V. M. de. (2002). Estimativa da biomassa de *Calotropis procera* (Ait) R. Br. E determinação de sua composição química nos municípios de Patos e Santa Luzia-PB. 40 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB.

SANDERSON, M. (1993). Aerobic stability and in vitro digestibility of microbiology inoculated corn and sorghum silages. *Journal of Animal Science*, v. 71, p. 501 – 514.

SILVA, N. JUNQUEIRA, V. C. A. e SILVEIRA, N. F. A. (1997). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela. 295 p.

SMITH, J.E. & HENDERSON, R.S. (1991). *Mycotoxins and animal foods*. London: CRC Press. p. 816 - 841.

STATISTICS ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. (1999). *User's Guide*. North Caroline SAS Institute Inc.

WOOLFORD, M. K. BOLSEN, K. K., & PEART, L. S. (1982). Studies on the aerobic deterioration of whole-crop cereal silages. *Journal of Agricultural Science. Cambridge* 98, 529 – 535.

WOOLFORD, M. K. (1984). *The Silage Fermentation*. New York: Marcel Dekker.

VAZ, F. L. *et al.*,. (1998). Avaliação do potencial forrageiro do algodão de seda (*Calotropis procera*) I – Consumo voluntário e digestibilidade da MS. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38. Botucatu – SP. V. 1. p.62–63.