



Estabilidade aeróbia, pH e dinâmica de desenvolvimento de microrganismos da cana-de-açúcar *in natura* hidrolisada com cal virgem¹

Felipe Nogueira Domingues², Mauro Dal Secco de Oliveira³, Gustavo Rezende Siqueira⁴,
Anna Paula de Toledo Piza Roth³, Juliana dos Santos⁵, Diego Azevedo Mota³

¹ Pesquisa financiada pela FAPESP e CNPq.

² Universidade Federal do Pará/Campus de Castanhal/Faculdade de Medicina Veterinária.

³ UNESP/FCAV/Campus de Jaboticabal.

⁴ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Colina – SP.

⁵ Instituto Federal do Rio Grande do Sul/Campus de Sertão.

RESUMO - Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da adição de cal virgem e dos tempos após a aplicação sobre a estabilidade aeróbia e o crescimento de microrganismos (leveduras e fungos) na cana-de-açúcar *in natura*. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Avaliaram-se a estabilidade aeróbia (temperatura), a dinâmica de desenvolvimento de leveduras e fungos e o pH, em um esquema de parcelas subdivididas, com cinco doses de cal (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) e cinco tempos após aplicação (0, 24, 48, 72, 96 horas). Houve efeito significativo das doses de cal para todos os parâmetros avaliados. A cana que não foi tratada com cal (0%) apresentou quebra da estabilidade no menor intervalo de tempo. Os valores de pH aumentaram gradativamente de acordo com a dose de cal aplicada e diminuíram com o tempo após aplicação. Houve aumento numérico na contagem de leveduras até as 72 horas após a aplicação da cal, independentemente da dose, e os valores tenderam a estabilizar no tempo de 96 horas pós-tratamento. Não houve efeito significativo das doses de cal sobre o desenvolvimento dos fungos. A aplicação de cal virgem é eficaz no controle do crescimento de leveduras e aumenta a estabilidade aeróbia da cana-de-açúcar *in natura*.

Palavras-chave: fungo, levedura, óxido de cálcio, temperatura, tratamento alcalino

Aerobic stability, pH and development dynamic of microorganisms on fresh sugarcane hydrolyzed with whitewash

ABSTRACT - The objective of this work was to evaluate the effect of whitewash addition and the times after application on aerobic stability and growth of microorganisms (fungi and yeasts) in fresh sugarcane. It was used a completely randomized experimental design, with four replications. Aerobic stability (temperature) and the concentrations of yeast and fungus and pH were evaluated in a split-plot scheme with five doses of whitewash (0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0%) and five times after treatment (0, 24, 48, 72 and 96 hours). There was a significant effect of doses of whitewash for all evaluated parameters. The sugarcane which was not treated with whitewash (0.0%) showed a break in stability at the shortest time interval. The pH values increased gradually according to the dose of whitewash applied and they decreased over time. There was a numerical increase on the counting of yeast until 72 hours after application of whitewash, regardless to the dose, and the values tended to stabilize in 96 hours after treatment. There was no significant effect of whitewash doses on fungi development. The use of whitewash is effective in yeast growth control and it also promotes aerobic stability in fresh sugar cane.

Key Words: alkali treatment, calcium oxide, fungus, temperature, yeast

Introdução

A sazonalidade da produção das forrageiras tropicais é um dos principais problemas encontrados pelos pecuaristas brasileiros para manutenção dos índices de produtividade durante todo o ano. Visando resolver, ou pelo menos atenuar, esse problema, há muitos anos, os produtores vêm utilizando a cana-de-açúcar como recurso forrageiro no período de escassez de forragem.

Várias são as vantagens da utilização da cana-de-açúcar, entre elas, destacar a alta produtividade de matéria seca e o baixo risco agrônomo. Entretanto, algumas desvantagens desse recurso têm desestimulado sua implantação em algumas propriedades rurais, principalmente a necessidade de corte diário.

Visando à redução dos cortes diários da cana, diversos pesquisadores têm trabalhado em busca de soluções para esse problema. Entre essas soluções, basicamente duas

opções tem sido sugeridas: a conservação da cana na forma de silagem e o tratamento alcalino da cana por meio de agentes alcalinizantes. Inicialmente, foram utilizados agentes alcalinizantes fortes, como o hidróxido de sódio (NaOH) e, mais recentemente, cal virgem ou hidratada. As vantagens da cal sobre o NaOH são sua fácil utilização (menos corrosivas) e seu baixo custo.

A utilização dos agentes alcalinizantes na hidrólise da cana-de-açúcar tem como objetivo melhorar o valor nutritivo da cana e, pela elevação do pH da cana hidrolisada, inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, permitindo assim a estocagem desse material por um período maior.

Nas últimas três décadas, os volumosos (excluindo-se os volumosos utilizados para silagem) hidrolisados com os agentes alcalinos eram alimentos de baixo valor nutritivo que possuíam como principais características a grande quantidade de carboidratos fibrosos e a reduzida digestibilidade. Com a utilização da hidrólise da cana-de-açúcar *in natura* com esses agentes, criou-se um problema até então inexistente: a cana-de-açúcar é um volumoso composto principalmente de carboidratos solúveis e carboidratos fibrosos, e esta grande concentração de carboidratos solúveis torna-se excelente substrato para o desenvolvimento de leveduras, que deterioram o material, reduzindo seu valor nutritivo.

Objetivou-se avaliar a estabilidade aeróbia, o pH, a dinâmica de desenvolvimento de microrganismos da cana-de-açúcar *in natura* hidrolisada com doses crescentes de cal virgem (CaO) e diferentes tempos de exposição ao ar.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Unesp, Campus de Jaboticabal, São Paulo, entre os dias 28 de outubro e 2 de novembro de 2005, Setor de Bovinocultura de leite, com temperatura média anual de 22 °C, pluviosidade 1400 mm/ano e umidade relativa do ar média de 70,8%.

A cana-de-açúcar utilizada foi a variedade IAC 86-2480 plantada no campus da UNESP/Jaboticabal, sendo o corte realizado em soqueira com 12 meses (2^o corte).

A cana foi cortada manualmente e picada em picadeira estacionária (marca Menta Mint[®]) em partículas de 8 a 10 mm. Em seguida foram feitos amontoados de cana picada de aproximadamente 15 kg (matéria natural), que foram tratados com cal virgem (CaO) nas doses 0,0 (controle); 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%, com base na matéria natural da cana. Amostras das

canas foram retiradas nos seguintes tempos após o tratamento alcalino: 0, 24, 48, 72 e 96 horas. De acordo com o fabricante a cal empregada apresentou 94,1% de óxido de cálcio e 0,5% de óxido de magnésio.

A cal foi diluída em água, na quantidade de 4 L de água para cada 100 kg de cana, com base na matéria natural, pelo fato de que a cal virgem não é previamente hidratada e para obtenção de caldas com mais de 0,5% de cal.

A avaliação da estabilidade aeróbia foi realizada no Laboratório do Setor de Forragicultura da FCAV/Unesp.

Uma parte da amostra (2,0 kg) foi colocada em baldes com capacidade de 7 L e armazenadas em câmara climática a 25°C, para avaliação da estabilidade aeróbia. A variação da temperatura da cana-de-açúcar hidrolisada foi medida três vezes ao dia, durante 11 dias, por meio de um termômetro inserido dentro da massa de cana contida no balde. A estabilidade aeróbia foi calculada como o tempo gasto, em horas, para a massa da forragem elevar em 1°C a temperatura acima daquela do ambiente (Driehuis et al., 2001).

Também foi considerado na avaliação da estabilidade aeróbia o acúmulo, de três e cinco dias, da diferença média diária entre a temperatura da cana e a ambiente (ADITE-3 e ADITE-5, expressa em °C).

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da FCAV/Unesp. Para análise da população de leveduras, foram pesados 25 g de forragem (matéria verde), que foram adicionados a 225 mL de solução peptonada 0,1% (0,1 g de peptona por litro de água destilada). Após agitação, foram retirados 10 mL da diluição para posteriores diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁵ e, a partir dessas diluições, foram realizadas as semeaduras de 0,1 mL em placas de petri contendo o meio ágar batata acidificado (Difco) e incubadas em aerobiose a 35 °C por 72 horas, quando então foi procedida a contagem das colônias.

A variação no pH da cana após a aplicação da cal foi medida utilizando-se peagâmetro digital, de acordo com metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002).

O experimento foi arranjado em delineamento inteiramente casualizado, esquema de parcelas subdivididas, com as doses de cal alocados nas parcelas e os tempos de exposição ao ar nas subparcelas, com quatro repetições por tratamento. Os dados foram analisados estatisticamente pelos procedimentos de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Também foram determinadas as equações de regressão para as variáveis correlacionadas à estabilidade aeróbia.

Resultados e Discussão

Houve efeito significativo das doses de cal ($P < 0,05$) sobre todos os parâmetros relacionados à estabilidade aeróbia: a cana sem cal (0,0%) apresentou quebra da estabilidade no menor intervalo de tempo (16 horas) se comparada à cana tratada com as doses de 1,0; 1,5 e 2,0% (34,7; 37,3 e 32 horas, respectivamente). A dose de 0,5% propiciou valor intermediário (24 horas), não diferindo estatisticamente das demais doses de cal (Tabela 1).

Os valores dos tempos gastos para acúmulo de três e cinco dias da diferença média diária entre a temperatura da cana e a temperatura ambiente (ADITE-3 e ADITE-5) acompanharam a mesma tendência, e seu valor reduziu à medida que se aumentou a dose de cal. Os maiores valores ocorreram na ausência de cal (dose de 0%), enquanto os valores intermediários foram observados na dose de 0,5% e se estabilizaram a partir da dose de 1%.

À medida que a dose de cal foi aumentada, o tempo gasto para a cana atingir sua temperatura máxima também elevou e sofreu efeito inverso. Logo, a taxa de aquecimento, que é determinada pela equação $TMAX/TEMPMAX$, também diminuiu. Santos (2007) também encontrou tendência semelhante nos resultados de $TEMPMAX$ e $TMAX$, em comparação a este estudo, comprovando a efetividade da cal sobre o controle da elevação da temperatura da cana-de-açúcar *in natura* hidrolisada.

Infere-se a partir dos resultados da Tabela 1 que a cal foi capaz de controlar o aumento de temperatura da cana e que, a partir da dose de 1,0%, houve tendência de estabilização nas respostas de todas as variáveis estudadas.

De acordo com Santos (2007), a utilização de elevadas doses de cal virgem possivelmente reduziu a atividade de água e aumentou a pressão osmótica da massa de forragem,

difícultando o desenvolvimento de microrganismos espoliadores e diminuindo a produção de calor ao longo do período de exposição aeróbia.

A temperatura inicial foi mais elevada na cana tratada (Figura 1), uma vez que, no momento de mistura da cal com a água, há liberação de calor (reação exotérmica), elevando a temperatura inicial. À medida que o tempo passa, ocorre queda na temperatura. Em seguida eleva-se de maneira gradativa até atingir o pico máximo e reduzir novamente, tendendo a estabilizar-se com a temperatura ambiente. Essa variação ocorreu para todas as doses utilizadas.

Houve efeito significativo das doses de cal e do tempo de tratamento e suas respectivas interações sobre a dinâmica de desenvolvimento de leveduras e medidas de pH ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Os valores de pH aumentaram gradativamente de acordo com a dose cal aplicada e diminuíram com o passar do tempo. A cana que não continha cal (controle) foi a que apresentou

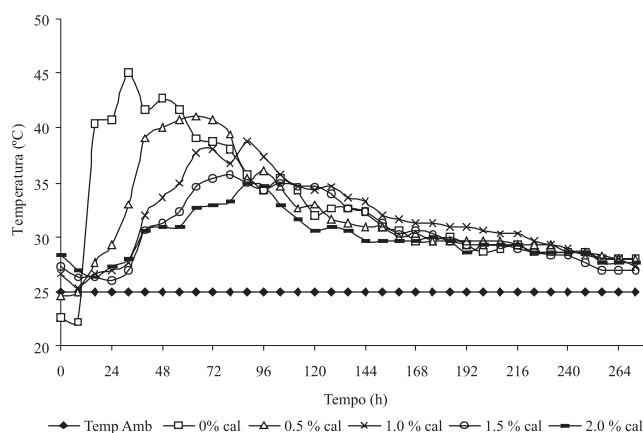


Figura 1 - Efeito da adição de cal virgem (CaO) sobre a temperatura da cana-de-açúcar tratada em relação ao tempo de exposição ao ar.

Tabela 1 - Parâmetros de estabilidade aeróbia de cana-de-açúcar tratada com cal virgem

	Doses de cal (%)					Média	CV (%)	Equação de regressão
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0			
Tempo para quebra da estabilidade aeróbia (horas)	16,0b	24,0ab	34,7a	37,3a	32,0a	28,8	20,29	1
ADITE-3 (°C)	40,9a	28,7b	18,1c	13,8c	13,2c	22,9	11,29	2
ADITE-5 (°C)	60,5a	48,7b	40,3c	33,2cd	28,9d	42,3	6,31	3
Tempo para atingir temperatura máxima (horas)	32,0c	56,0b	74,7a	74,7a	88,0a	65,1	10,53	4
Temperatura máxima (°C)	45,0a	41,3b	38,7c	35,7d	35,0d	39,1	1,62	5
Taxa de aquecimento (°C/hora)	1,41a	0,75b	0,53c	0,48c	0,40c	0,71	9,76	6

ADITE-3 e ADITE-5 = acúmulos, respectivamente, de três e cinco dias da diferença média diária entre a temperatura da cana e a temperatura ambiente.

Médias nas linhas seguidas da mesma letra minúscula não diferem ($P > 0,05$) entre si pelo teste Tukey.

Equações de regressão:

1: $y = 14,78095 + 28,87619x - 9,90476x^2$ ($r^2 = 0,65$).

2: $y = 41,20762 - 30,91714x + 8,42857x^2$ ($r^2 = 0,95$).

3: $y = 60,34857 - 25,01429x + 4,65714x^2$ ($r^2 = 0,96$).

4: $y = 33,21905 - 48,99048x + 11,42857x^2$ ($r^2 = 0,87$).

5: $y = 45,07619 - 8,37143x + 1,61905x^2$ ($r^2 = 0,97$).

6: $y = 1,36229 - 1,22181x + 0,3819x^2$ ($r^2 = 0,93$).

Tabela 2 - pH e dinâmica de desenvolvimento de leveduras e fungos na cana-de-açúcar tratada com cal virgem

Dose de cal (%MN ¹)	Tempo de exposição ao ar (horas)					Médias
	0	24	48	72	96	
	pH					
0	5,56cA	3,48dB	3,31cB	3,22cB	3,21cB	3,76
0,5	9,84bA	7,07cB	4,16cC	3,71bcC	3,65bcC	5,69
1,0	11,43aA	9,21bB	7,61bC	4,84bD	4,69bD	7,56
1,5	12,06aA	9,70abB	8,67abC	7,71aD	7,27aD	9,08
2,0	12,16aA	10,91aB	8,85aC	7,66aD	7,13aD	9,34
Médias	10,21	8,07	6,52	5,43	5,19	
CV da dose (%)						16,11
CV do tempo (%)						4,38
	Leveduras (log ufc ³ /g de forragem)					
0	6,57aA	7,28aA	7,54aA	7,66aA	6,99aA	7,21
0,5	4,27bC	6,23abB	6,53abAB	7,55aA	6,85aAB	6,29
1,0	3,77bcC	5,80bcB	6,32abAB	7,18aA	7,18aA	6,05
1,5	2,84bcC	4,59cdB	5,83bA	6,96aA	6,26aA	5,29
2,0	2,52cB	3,59dB	5,79bA	6,28aA	5,76aA	4,78
Médias	3,99	5,50	6,40	7,12	6,61	
CV da dose (%)						14,93
CV do tempo (%)						8,83
	Fungos (log ufc ³ /g de forragem)					
0	0,94	1,00	1,43	1,10	4,11	1,72
0,5	2,21	1,86	0,82	ND ²	3,74	1,73
1,0	0,67	0,77	2,82	2,47	2,67	1,88
1,5	ND ²	1,57	1,78	2,29	2,85	1,70
2,0	0,57	2,38	1,68	0,67	3,45	1,75
Médias	0,88B	1,51B	1,71B	1,30B	3,36A	
CV da dose (%)						73,99
CV do tempo (%)						68,08

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram ($P>0,05$) estatisticamente pelo teste Tukey.

CV = coeficiente de variação.

¹ Matéria natural.

² Não-determinado.

³ Unidades formadoras de colônia.

os menores valores de pH em todos os tempos, confirmando assim a influência desse aditivo na elevação do pH. As doses 0,5 e 1,0% mantiveram o pH no padrão alcalino até o tempo de 24 e 48 horas, respectivamente. Os valores de pH das doses 1,5 e 2,0% foram estaticamente semelhantes em quase todos os tempos, com exceção do tempo 24 horas.

Conforme os resultados apresentados, a cana hidrolisada com cal virgem atingiu o padrão de neutralidade nas doses 0,5; 1,0; 1,5 nos tempos 24, 48 e 72 horas, respectivamente, sendo que, na dose 2,0, a neutralidade foi alcançada com a dose 1,5% (Tabela 2). Essa observação é interessante e pode ser utilizada como critério de decisão para o fornecimento da cana-de-açúcar hidrolisada *in natura* para os animais, visto que o fornecimento de alimento com pH alcalino pode causar redução na ingestão de matéria seca. Moraes et al. (2008) afirmaram que o pH demasiadamente alcalino da cana-de-açúcar tratada com 1,0% de óxido de cálcio e armazenada por 24 horas pode ter prejudicado a aceitabilidade e limitado o consumo do volumoso tratado, o que ocasionou menor desempenho dos animais que consumiram a cana-de-açúcar tratada com esse agente alcalinizante.

Ao crescerem nos amontoados de cana os microrganismos consomem os açúcares presentes neste volumoso produzindo ácido, o que causa a redução no pH.

Os valores de pH observados neste estudo são semelhantes aos apresentados por Oliveira et al. (2008a) e inferiores aos descritos por Oliveira et al. (2008b), de 11,63, para a dose de 0,5% no tempo zero. O alto valor de pH atingido com a utilização da cal pode ter sido o responsável pelo menor desenvolvimento das leveduras no momento inicial (tempo zero).

Na dose zero de cal (controle), a contagem de leveduras (em ufc/g de forragem) manteve-se estável. As maiores taxas de crescimento das leveduras foram obtidas nas primeiras horas de exposição ao ar, e isso indica que as doses de cal foram eficientes em controlar o desenvolvimento das leveduras até as 48 horas iniciais. A partir de 72 horas de exposição ao ar, a população de leveduras nos tratamentos que continham a cal foram semelhantes à da cana sem tratamento alcalino.

Miyazaki (2005), estudando o desenvolvimento de microrganismos (leveduras e fungos) na cana-de-açúcar tratada com hidróxido de sódio, inferiu que a dose de 4% de

NaOH na matéria natural e 72 horas após aplicação inibiu por completo o desenvolvimento de fungos e leveduras.

Ao relacionar a população de leveduras com a estabilidade aeróbia (Figura 2), observou-se que, nos tratamentos que apresentaram maiores populações de levedura, houve também menor estabilidade aeróbia, dessa forma, as leveduras seriam as principais responsáveis pela deterioração do material, e seu controle é de extrema importância para que se possa armazenar a cana-de-açúcar hidrolisada *in natura* por um período maior.

Segundo McDonald et al. (1991), em condições aeróbicas, as leveduras crescem muito rapidamente e produzem energia através da glicose pela via da glicólise e do ciclo do ácido tricarbóxico, a completa oxidação dos açúcares pelas leveduras forma dióxido de carbono e água. Não houve efeito significativo com relação às doses de cal e a interação doses de cal e tempo após o tratamento ($P>0,05$), havendo efeito apenas no tempo ($P<0,05$) na dinâmica de crescimento de fungos,

A média da contagem dos fungos da forragem no tempo de 96 horas foi superior às médias dos tempos 0, 24, 48, 72 horas. A ausência de diferença estatística entre as médias da contagem de fungos entre as doses de cal e sua respectiva

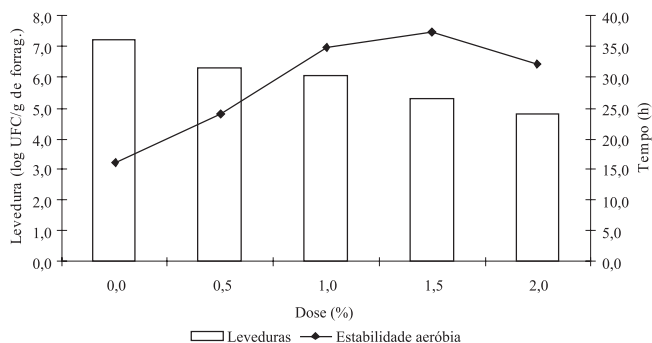


Figura 2 - Relação entre população de leveduras e o tempo gasto para quebra da estabilidade aeróbia da cana-de-açúcar hidrolisada com doses crescentes de cal virgem.

interação com o tempo deve-se à inconstância dos dados para esta variável-resposta, o que acarretou alto coeficiente de variação (Tabela 2).

Conclusões

A cal microprocessada (CaO) é eficaz no controle do crescimento de leveduras nas primeiras 48 horas após a aplicação, fato não observado para os fungos. O uso de cal virgem aumenta a estabilidade aeróbia da cana *in natura* tratada, e a dose de 0,5% é a mais indicada.

Referências

- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, W.H.; VAN WIKSELAAR, P.G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculant with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v.56, n.4, p.330-343, 2001.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalomb Publications, 1991. 340p.
- MIYAZAKI, M.K. **Composição química e dinâmica de fungos e leveduras na cana-de-açúcar tratada com NaOH**. 2005. 51f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MORAES, K.A.K.; VALADARES FILHO, S.C.; MORAES, E.H.B.K. et al. Cana-de-açúcar tratada com óxido de cálcio fornecida com diferentes níveis de concentrado para novilhas de corte em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.7, p.1293-1300, 2008.
- OLIVEIRA, M.D.S.; BARBOSA, J.C.; MOTA, D.A. et al. Efeito da hidrólise com cal virgem sobre a composição bromatológica da cana-de-açúcar. **Veterinária Notícias**, v.14, n.1, p.19-27, 2008a.
- OLIVEIRA, M.D.S.; SANTOS, J.; DOMINGUES, F.N. et al. Avaliação da cal hidratada como agente hidrolisante de cana-de-açúcar. **Veterinária Notícias**, v.14, n.1, p.9-17, 2008b.
- SANTOS, M.C. **Aditivos químicos para o tratamento de cana-de-açúcar in natura e ensilada (*Saccharum officinarum* L.)**. 2007. 113f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. 235p.