

## DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NA RIZOSFERA DE CAFEIEIRO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)<sup>1</sup>.

Francisca Alcivania de Melo SILVA - Bolsista do CBP&D-Café, alcivania@hotmail.com;  
Francisco Dias NOGUEIRA - EPAMIG; Larissa Lagoa RIBEIRO Bolsista CBP&D-Café; Paulo  
Tácito Gontijo GUIMARÃES - EPAMIG; Aidene GODINHO - Bolsista CBP&D-Café.

**RESUMO:** Objetivando determinar ácidos orgânicos na rizosfera do cafeeiro (*Coffea arabica*), foram coletadas amostras de rizosfera em lavoura da Fazenda Experimental da EPAMIG (Lavras-MG). Após adaptação da metodologia, as amostras foram submetidas à extração e os ácidos orgânicos de baixo peso molecular determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O método de extração utilizado detectou, nas amostras analisadas, os ácidos cítrico, oxálico, acético, butírico e propiônico, sendo que os ácidos oxálico, acético e cítrico foram encontrados em maiores quantidades em relação aos demais.

**PALAVRAS CHAVE:** Rizosfera; ácidos orgânicos; HPLC; cafeeiro.

**ABSTRACT:** Aiming at to determine organic acids in the rhizosphere of coffee plants (*Coffea arabica*), samples of the rhizosphere of these plants were collected at the Experimental Station of EPAMIG (Lavras-MG). After adaptation of the methodology, the samples were submitted to extraction and the low molecular weight organic acids were determined by Liquid Chromatography of High Precision (HPLC). The extraction method used was efficient to detect citric, oxalic, acetic, butyric and propionic acids in the samples. The oxalic, acetic and citric acids were found in larger amounts than the other organic acids.

**KEY WORDS:** Rhizosphere; organic acids; HPLC; coffee plant, *Coffea arabica*.

### INTRODUÇÃO

No Brasil, a cafeicultura desempenha um importante papel na geração de divisas. Um dos fatores mais limitantes ao desenvolvimento dessa cultura é a pobreza mineral dos solos, que apresentam características desfavoráveis como acidez e problemas de toxidez de alumínio, o que resulta em aumento dos custos de produção. Uma das alternativas seria adaptar ou escolher plantas com características naturais favoráveis à adaptação em solos com problemas de acidez. Essas plantas são capazes de utilizar os nutrientes de modo eficiente e ainda, liberar substâncias capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do alumínio (Muchovej et al.,1988; Jones,1998). A Índia é um país pioneiro no estudo e recomendação de ácido cítrico para a cafeicultura, a fim de promover maior liberação de nutrientes do solo, principalmente P, K e Zn (Jayarama, Shamkar e Violet, 1998). As raízes liberam muitos ácidos orgânicos (cítrico, málico, oxálico, butírico, acético, láctico, etc.), sendo que, a concentração desses ácidos depende de fatores como o tipo de planta e condições de stress as quais estas são submetidas (Jones,1998). Os ácidos orgânicos de baixo peso molecular ocorrem na maioria dos solos cultivados e são intermediários no metabolismo de compostos de alto peso molecular como carboidratos, lipídeos e peptídeos. A determinação de ácidos orgânicos, no solo, é de extrema importância, já que estes podem atuar de forma direta, favorecendo a solubilidade de elementos como fósforo e potássio por processos de quelação e troca de ligantes ou indireta, pelo estímulo da atividade microbiana ( Fox e Comerford,1990). Nos estudos com ácidos orgânicos (Bazimarakenga et al.,1998), o maior problema relatado é a dificuldade de encontrar um método eficiente para identificar e quantificar esses compostos. Os métodos de separação mais usados são a cromatografia líquida e a gás, sendo que o problema reside no processo de extração, anterior à separação. Os objetivos deste estudo foram: adaptar metodologia para a extração de ácidos orgânicos na rizosfera do cafeeiro, identificar, qualificar e quantificar esses ácidos de modo a avaliar o potencial de cultivares diferentes de café para adaptação a solos mais pobres. Verificar se a eficiência nutricional das plantas pode ser função de exsudados específicos na rizosfera.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Extração de ácidos orgânicos no solo:** A extração foi feita de acordo com a metodologia proposta por Bazimarakenga et al.,(1995), com algumas modificações: **Amostras de solo:** Foram utilizadas amostras de

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ-CBP&D-CAFÉ.

rizosfera de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica*) das cultivares Mundo Novo, Icatu Amarelo e Catuai Vermelho. A lavoura foi implantada há aproximadamente 4 anos, na Fazenda Experimental da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) em Lavras-MG, em um Podzólico Vermelho Amarelo distrófico, textura argilosa, 2,5% de matéria orgânica. Amostras da rizosfera (solo aderido à raiz) foram coletadas, para avaliar a concentração de ácidos orgânicos exsudados pelas raízes. A primeira etapa do processo consiste em separar a raiz do solo, isso é feito agitando-se levemente a raiz, de modo que reste apenas uma pequena quantidade de solo aderida. Recomenda-se que a profundidade máxima de coleta de raízes deve ser de 15cm. *Extração:* A combinação raiz + solo (50 g), obtida pelo procedimento descrito anteriormente foi colocada em erlenmeyers, sendo adicionados 50mL de água destilada e esse material agitado no escuro por 12h. Em seguida, o sobrenadante da mistura foi centrifugado a 10000rpm por 20min, filtrado em papel filtro tipo Whatman 42. Os ácidos orgânicos foram extraídos com 10ml de acetato de etila, adicionado ao extrato e aquecido em chapa a 45 °C até o ponto de parcial secura, sendo então redissolvido em 1mL de água destilada. Os ácidos orgânicos foram identificados e quantificados por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) nas seguintes condições: coluna C-18, injeção: 20µL, UV a 230nm, fluxo: 1mL/min e fase móvel: água com 1% de ácido fosfórico. Os picos correspondentes a cada ácido foram identificados pelo tempo de retenção, utilizando-se como comparação os tempos de retenção dos padrões. A concentração obtida foi expressa em mg kg<sup>-1</sup> de ácido na rizosfera.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cromatograma (Figura 1) mostrou picos de resolução relativamente baixa na separação de ácidos orgânicos, sendo que os ácidos avaliados foram identificados num tempo total de análise de 10min. Os tempos de retenção dos ácidos são mostrados na tabela 1. A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido usada frequentemente para determinação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular coletados em solução nutritiva, ou extraídos do solo. Entretanto, acredita-se que pode haver uma interferência de compostos orgânicos e inorgânicos, quando é usada a faixa de detecção próxima de 210nm, o que prejudica a definição dos picos (Blake et al., 1987). Ácidos como o lático, propiônico, butírico, são suficientemente bem separados usando HPLC. Já outros como cítrico, málico e oxálico não tem picos tão bem definidos (Szmigielska et al.,1997). Esses autores relatam que o tempo necessário para definição dos picos, calibração do aparelho e separação dos ácidos dificulta a utilização do HPLC para análises de rotina.

TABELA 1. Tempos de retenção dos ácidos obtidos através de solução padrão em HPLC.

Ácidos					
T	Oxálico	Acético	Cítrico	Propiônico	Butírico
	3,7	4,3	6,4	7,1	8,9

T = Tempo de retenção (min)

Os resultados obtidos evidenciaram, na rizosfera das plantas estudadas, a presença dos ácidos cítrico, oxálico, acético, butírico e propiônico (Tabela 2). Os ácidos orgânicos tem sido identificados na rizosfera de muitas plantas, incluindo alfafa (*Medicago sativa*), nabo (*Brassica napus*).

O ácido oxálico foi encontrado na rizosfera das plantas estudadas em quantidades maiores em relação aos demais (Tabela 2). Smith (1976) observou que os ácidos oxálico e acético constituem a maior percentagem de exsudados no crescimento de raízes de plantas de pinus. Entre os genótipos de cafeeiro, os maiores valores foram observados no Icatu amarelo e Mundo novo, sendo as concentrações significativamente diferentes do genótipo Catuai Vermelho. Sagoe et al. (1996) utilizando 2 tipos de rochas fosfáticas tratados com 5M dos ácidos oxálico e tartárico, observou um incremento nas concentrações de P solúvel nos solos estudados. Devido à habilidade do oxalato em complexar fortemente metais como o Al, a presença de grandes quantidades dessa substancia no solo pode ter importantes implicações em química e nutrição de plantas (Gardner et al.,1983).

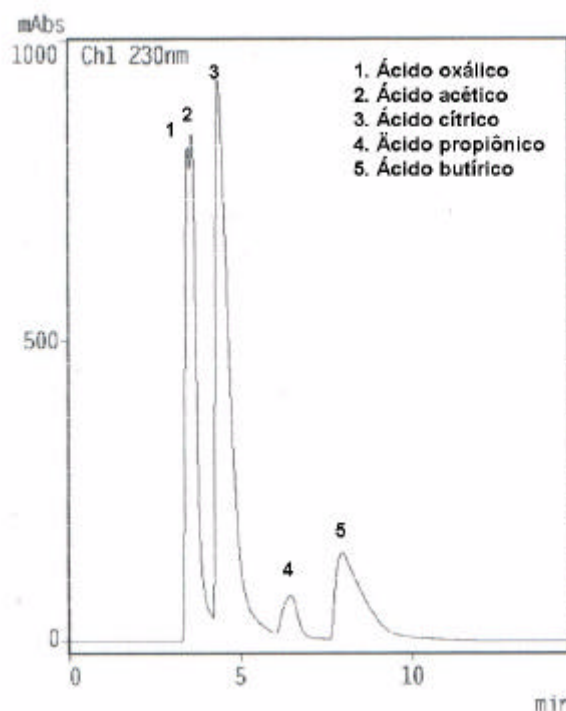


Figura1. Cromatograma da mistura padrão de ácidos orgânicos.

TABELA 2. Ácidos orgânicos na rizosfera do cafeeiro .

	Ácidos Orgânicos				
	Ac. Oxálico	Ac. Cítrico	Ac. Acético	Ac. Butírico	Ac. Propiônico
	mg kg <sup>-1</sup>				
Catuai Verm.	2,62b	1,51ab	1,41a	0,001 <sup>a</sup>	0,001 a
Icatu Amarelo	3,05 <sup>a</sup>	1,66a	1,09b	0,001 <sup>a</sup>	0,001 a
Mundo Novo	3,16a	0,17c	1,19ab	0,001 <sup>a</sup>	0,001a

Médias seguidas da mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

As concentrações de ácido cítrico (Tabela 2), considerado um dos componentes mais importantes envolvidos nos processos de liberação de P, Zn e neutralização do Al, foram maiores nos genótipos de café “catuai vermelho” e “icatu amarelo” Gardner et al., (1983) encontraram altas concentrações de ácido cítrico em solução obtida de exsudados de raízes de Lupin (*Lupinus album*) submetidas às condições de deficiência de P. Experimentos tem mostrado também que a adição de ácidos como o cítrico, causam a dissolução de P de rochas fosfatadas, além de liberar P-Al e P-Fe. Para o ácido acético, a maior concentração foi observada na cultivar de café “catuai Vermelho”. Em alguns casos, os ácidos acético e fórmico dominam o grupo dos ácidos alifáticos e representam até 75% do total de ácidos identificados. Em algumas plantas, o ácido acético é encontrado em altas concentrações. A concentração relativamente alta de ácidos como o fórmico e o acético podem ser devido á degradação de outros ácidos alifáticos (Fox e Comerford,1990), ou ácidos aromáticos ou de origem microbiana (Haider e Martin,1975). Os demais ácidos identificados (butírico e propiônico), foram encontrados em concentrações muito baixas nas cultivares de café, tal fato pode ter ocorrido devido às deficiências no método de extração ou problemas de detecção apresentados pela técnica cromatográfica utilizada.

A significância dos ácidos orgânicos em exsudados radiculares e rizosfera em geral, está relacionada ao efeito que os mesmos podem ter na disponibilidade de nutrientes para as plantas. Tem sido mostrado que ânions orgânicos aumentam a concentração de fósforo na solução do solo (Li, Shinano e Tadano,1997). A importância dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular também tem sido demonstrada na redução de MnO<sub>2</sub> (Godo e Reisenauer,1980). Também tem sido relatados, efeitos de ácidos como o cítrico e oxálico na liberação de K (Silva,1999).

## CONCLUSÕES

O método de extração utilizado foi eficiente na extração de ácidos orgânicos, com precisão para diferenciar o potencial de exsudação de ácidos orgânicos na rizosfera de cafeeiro, representando um instrumento com potencial de utilização em programas de melhoramento de plantas. Esse potencial resultaria na obtenção de genótipos com maior eficiência nutricional quando cultivados em solos distróficos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAZIMARAKENGA,B.;SIMARD,R.R. e LEUROX, G.D. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. **Soil Biology and Biochemistry**,v.27,p.349-356.1995.
- BLAKE, J.D.; CLARKE, M.L e RICHARDS, G.N. Determination of organic acids in sugar cane process juice by high performance liquid chromatography: improved resolution using dual Aminex HPX-87H cation exchange columns equilibrated at different temperatures. **Journal of Chromatography**,v.398, p.265-277.1987.
- FOX, T.R. e COMERFORD, N.B. Low molecular weight organic acids in selected forest soil of the southwestern USA. **Soil Science Society of American Journal**, v.54,p.1139-1144.1990.
- GARDNER, W.K., PARBERY,D.G. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L.I. Some characteristics of the soil /root interface. **Plant Soil**, v.68,p.19-32,1983.
- GODO,G.H. e REISENAUER, H.M. Plant effects on soil manganese availability. **Soil Science Society of American Journal**,v.44,p.993-995.1980.
- HEIDER,K. e MARTIN, J. P. Decomposition of specifically carbon-14 labeled benzoic and cinnamic derivatives in soil. **Soil Science Society of America Journal**, v.54,p.657-662.1975.
- JAYARAMA; SHANKAR, B.N; VIOLET, M.D.S. Citric acid as a potential phosphate solubiliser in coffee soils. *Indian Coffee*,p.13-15, 1998.
- LI, M.G.; SHINANO, T. e TADANO, T. Distribution of exsudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**.V.43,p.237-245,1997.
- SAGOE,C.I.; ANDO,T.; KOUNO e NAGAOKA,T. Response of italian regrass to phosphorus in organic-acid treated phosphate rocks. **Journal Fac. Applied Biology Science**. v.35, p.199-209.1996.
- SILVA, V.A. **Potássio em solos de regiões cafeeiras de Minas Gerais: Formas e cinética de liberação por ácidos orgânicos**. Lavras: UFLA, 1999.104p. (Dissertação de Mestrado).
- SMITH,W.H. Character and significance of forest tree exudates. **Ecology**, v.57,p.324-331.1976.
- SZMIGIELSKA, A. M.; VAN REES, K.C.J.; CIESLINSKI, G. e HUANG, P.M. Low molecular Weight dicarboxylic acids in rhizosphere soil of Durum Wheat. **Journal of Agricultural Food Chemistry**,v.44,p.1036-1040.1997.

## **AVISO**

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS  
SEGUINTE ENDEREÇOS:

### **FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES**

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV  
Viçosa - MG  
Cep: 36571-000  
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485  
Fax : (31) 3891-3911

### **EMBRAPA CAFÉ**

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)  
Edifício Sede da Embrapa - sala 321  
Brasília - DF  
Cep: 70770-901  
Tel: (61) 448-4378  
Fax: (61) 448-4425