

## USO DE FOSFATO NATURAL E ÁCIDO CÍTRICO E SEU EFEITO NA EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM RIZOSFERA DE CAFEEIROS

SILVA, F.A.M.<sup>1</sup>; NOGUEIRA, F.D.<sup>2</sup>; GUIMARÃES, P.T.G.<sup>3</sup>; GUIMARAES, M.J.L.<sup>4</sup>; GODINHO, A.<sup>5</sup> e MALTA, M.R.<sup>6</sup>

- Trabalho financiado pelo CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ-CBP&D-Café -

<sup>1</sup> Bolsista do CBP&D-Café/EPAMIG, Cx. Postal 176, CEP: 37200-000, Lavras-MG, <alcivania@hotmail.com.br>;

<sup>2</sup> Pesquisador EMBRAPA/EPAMIG/CTSM – Lavras-MG; <sup>3</sup> Pesquisador EPAMIG/CTSM – Lavras-MG; <sup>4</sup> Bolsista CBP&D-Café, Lavras-MG; <sup>5</sup> Mestranda em Engenharia Química/UFMG, Belo Horizonte-MG; <sup>6</sup> Pesquisador EPAMIG/CTSM-Lavras, MG.

**RESUMO:** Com o objetivo de verificar a exsudação de ácidos orgânicos (endógeno) e o efeito de sua aplicação no desenvolvimento de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L), com o uso de fosfato natural e o comportamento da planta quando um dos ácidos exsudatos pela raiz é aplicado no solo, foi instalado um experimento em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, em DIC no esquema fatorial 4 x 4, sendo quatro doses de fosfato natural ( 0, 53,58; 107,16; e 160,74 g/vaso) e quatro doses de ácido cítrico ( 0,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-2}$  M), utilizando como substrato o horizonte B de um Latossolo Roxo e mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L) da cultivar Topázio MG-1190, transplantadas com quatro pares de folhas. As amostras de rizosfera de cafeeiro foram submetidas à extração, e os ácidos orgânicos, identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os ácidos cítrico, oxálico e málico apresentaram comportamento diferenciado quando foram aplicadas diferentes doses de ácido cítrico e fosfato natural no solo. Houve tendência de redução das concentrações de ácido oxálico na presença de ácido cítrico, comportamento oposto ao dos ácidos cítrico e málico. As concentrações de ácido oxálico foram as maiores entre os ácidos estudados.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*, ácidos orgânicos, CLAE, fosfato natural.

## THE USE OF NATURAL PHOSPHATE FERTILIZERS AND CITRIC ACID AND THEIR EFFECT ON ORGANIC ACID EXUDATES ON COFFEE RHIZOSPHERE

**ABSTRACT:** Aiming to verify the exudation of organic acids ( endogenous ) and the effect of their application on the development of coffee tree seedlings ( *Coffea arabica* L.) with the use of natural phosphate and the behavior of the plant when one of the acids exuded by the root is applied into the soil,

an experiment in greenhouse of the Soil Science department of the UFLA in RCE in the 4 x 4 factorial scheme, its being 4 doses of natural phosphate ( 0, 53.58; 107.16 and 160.74g/pot) and 4 doses of citric acid ( 0,  $10^{-4}$  ;  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$ M) by utilizing as a substrate, the B horizon of a Red Dusky Latosol and coffee tree seedlings ( *Coffea arabica* L) of the cultivar Topázio MG-1190, transplanted with four pairs of leaves was set up. The samples of the coffee tree rhizosphere were submitted to the extraction and the organic acids identified and identified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The citric, oxalic and malic acids presented distinct behavior when different doses of citric acid and natural phosphate were applied into the soil. There was a tendency of reduction of the concentrations of oxalic acid in the presence of citric acid, opposed behavior to that of citric and malic acids. The concentrations of oxalic acid were the highest among the acids investigated .

**Key words:** *Coffea arabica* ; organic acids; HPLC; natural phosphate.

## INTRODUÇÃO

A eficiência da plantas na utilização a disponibilidade de nutrientes do solo constitui hoje uma porta aberta nas áreas de pesquisa de melhoramento e de nutrição mineral de plantas. O encontro dos interesses dessas duas áreas de pesquisa é uma interface comum entre os recursos naturais do solo, os fertilizantes adicionados e a capacidade de exsudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular na rizosfera, que pode também ser complementada, artificialmente, por adição desse ácidos durante o ciclo etário da cultura.

A rizosfera, um microambiente caracterizado por mudanças dinâmicas de substancias, é freqüentemente renovada ou afetada pelo crescimento das raízes e dos exsudatos radiculares. Os ácidos orgânicos de baixo peso molecular ocorrem na maioria dos solos e são intermediários no metabolismo de compostos de alto peso molecular, como carboidratos, lipídeos e peptídeos. Estes compostos (ácido cítrico, málico, oxálico, butírico, acético, láctico, etc.) são liberados pelas raízes, e sua concentração depende de fatores que vão desde o tipo de planta até as condições de estresse às quais estas são submetidas (Jones, 1998). Os ácidos orgânicos têm sido identificados na rizosfera de muitas plantas, incluindo alfafa (*Medicago sativa*) (Lipton et al., 1987) e nabo (*Brassica napus*) (Hoffland et al.,1989).

Quando as plantas crescem em ambientes com deficiência de nutrientes, as raízes secretam substancias funcionais, como os ácidos orgânicos, e essa secreção contribui então na formação de um

importante mecanismo adaptativo para absorção de elementos, como P, já que as plantas podem alterar o microambiente radicular e, subseqüentemente, afetar a disponibilidade de fósforo na rizosfera (Li et al., 1997). A importância dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular também tem sido demonstrada na redução de  $MnO_2$  (Godo e Reisenauer, 1980). Mais recentemente, dois solos utilizados na cultura do cafeeiro (Terra Bruna Estruturada e Latossolo Roxo) foram fracionados em argila, silte e areia, tendo estas frações sido tratadas em condições de laboratório com ácido cítrico e oxálico por Silva (1999). Este autor registrou mais eficiência do ácido cítrico, por liberar K na fração silte da Terra Bruna Estruturada e também na fração argila do Latossolo Roxo.

De acordo com Lopes (1999), a maioria dos fosfatos brasileiros de baixa reatividade (Araxá, Patos, Catalão, dentre outros) é formada principalmente por apatitas, em geral com 4 a 5% de  $P_2O_5$  solúvel em ácido cítrico e com teores de  $P_2O_5$  total de 28 a 30%. Esses produtos apresentam baixa eficiência agrônômica para culturas de ciclo curto e anuais, no entanto podem ser usados para formação de pastagens tolerantes à acidez ou no preparo de covas ou sulcos de plantio para a formação de culturas perenes, como o cafeeiro.

O ácido cítrico é um ácido orgânico que pode ser utilizado na ativação da solubilização de P de reservas naturais. Esse ácido, aplicado no solo, reage com a Al e o Fe ligados ao fósforo, desfazendo a complexação desses elementos até então inativos no solo. Estudos realizados na Índia com a cultura do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) têm mostrado que a disponibilidade de K, P e micronutrientes, especialmente o Zn, aumenta acentuadamente com aplicação de 1 kg de ácido cítrico/ha, misturado ao NPK na fórmula normalmente utilizada para fertilização do solo (Jayarama et al., 1998). Esses autores afirmam também que o ácido cítrico não altera de forma negativa a acidez do solo (pH). O resultado mais expressivo desse tipo de prática seria a utilização de menores quantidades de adubo e conseqüente redução dos custos de produção.

Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi identificar e quantificar a exsudação de ácidos orgânicos (cítrico, oxálico e málico) com o uso de fósforo natural e o comportamento da planta (rizosfera) quando um dos ácidos exsudados pela rizosfera é aplicado ao solo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi instalado um experimento em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, em DIC, no esquema fatorial 4 x 4, sendo quatro doses de fósforo natural (0, 53,58; 107,16; e 160,74 g/vaso) e quatro doses de ácido cítrico (0,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-2}$ M), utilizando amostras do horizonte B

de um Latossolo Roxo, com 1% de matéria orgânica e o fosfato natural Araxá com 4 –5% de P solúvel em ácido cítrico. A cultivar utilizada foi a Topázio MG-1190.

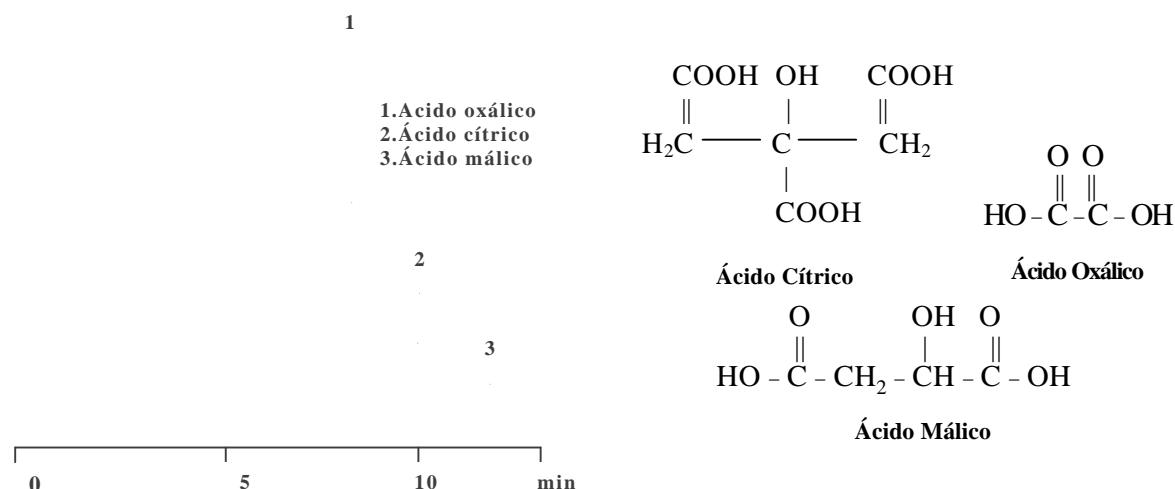
A extração dos ácidos orgânicos foi feita de acordo com a técnica proposta por Silva et al. (2000), adaptada de Bazimarakenga et al. (1995).

A primeira etapa do processo consistiu coletar amostras de rizosfera e separar a raiz do solo. Isso foi feito agitando-se levemente a raiz, de modo que restasse apenas uma pequena quantidade de solo aderida.

### ***Extração***

A combinação da mistura raiz + solo (50 g), obtida pelo procedimento descrito anteriormente, foi colocada em erlenmeyers, sendo adicionados 50 mL de água destilada; esse material foi agitado no escuro por 12 horas. Em seguida, o sobrenadante da mistura foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, e filtrado em papel-filtro tipo Whatman 42. Os ácidos orgânicos foram extraídos da solução aquosa com 10 mL de acetato de etila. Nesta fase do processo, optou-se por fazer algumas mudanças, como substituir o aquecimento da solução em chapa pelo aquecimento em banho-maria a 45 °C até redução de volume, sendo o extrato então redissolvido em 1mL de água destilada.

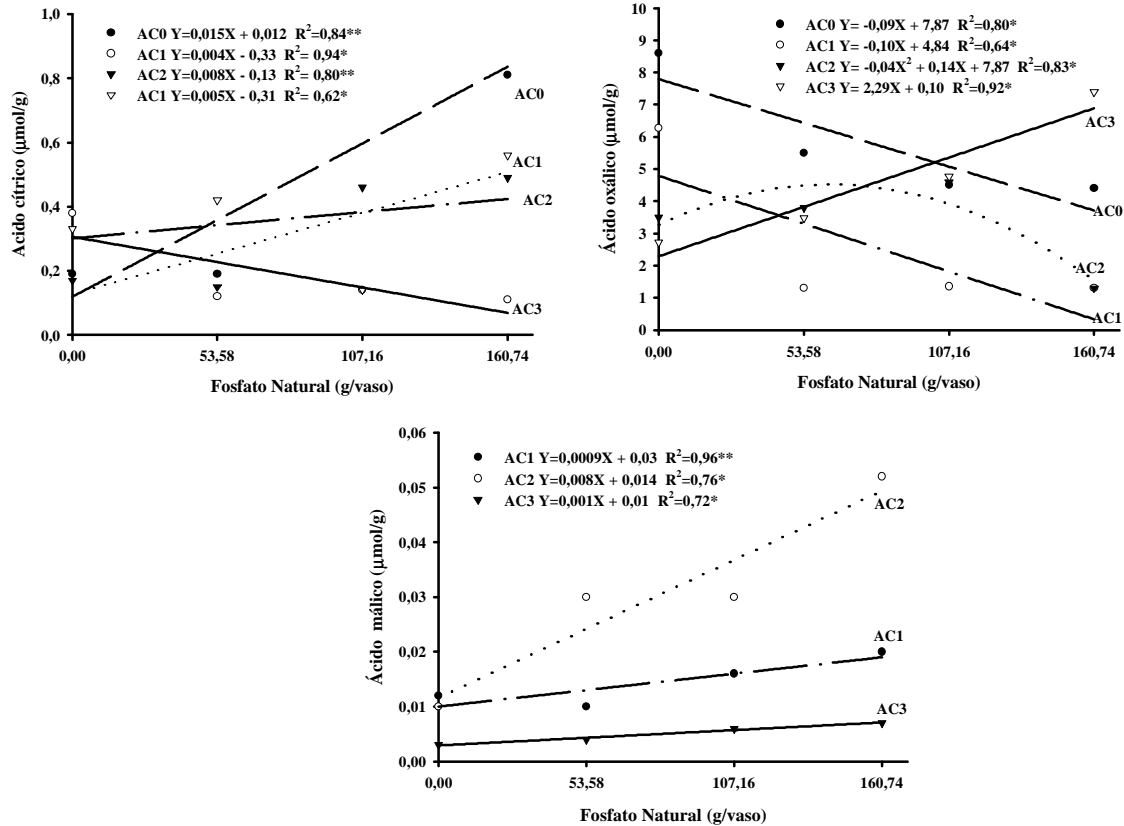
Os ácidos orgânicos foram identificados e quantificados por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), através de um cromatógrafo da marca Shimadzu, com detector UV, sendo substituídos o comprimento de onda de 230 nm pelo de 210 nm e a coluna C -18 de fase reversa pela de troca iônica C610-H da marca Supelco, objetivando melhor distinção dos picos e conseqüente melhoria da qualidade da análise. O volume injetado da amostra foi de 20 µL. Utilizou-se como fase móvel água com 0,1% de ácido fosfórico, com fluxo de 0,5mL/min. Os picos correspondentes a cada ácido (cítrico, oxálico e málico) foram identificados pelo tempo de retenção, utilizando-se como comparação os tempos de retenção dos padrões (Figura 1) e os espectros. A concentração obtida foi expressa em µmol/g de solo da rizosfera. Os dados foram submetidos a análise de variância e regressão, através de programa estatístico Sisvar.



**Figura 1** - Cromatograma dos padrões dos ácidos oxálico, cítrico e málico e estrutura dos ácidos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela Figura 2, observa-se que, nos tratamentos onde não foi aplicado ácido cítrico (AC0), as concentrações tenderam a aumentar com o incremento das doses de fosfato natural, o que evidencia a capacidade de exsudação desse ácido pela rizosfera do cafeeiro em condições de baixa disponibilidade de P. Gardner e Parbery (1983) afirmam que raízes de plantas cultivadas em ambientes deficientes em P secretam acentuadas quantidades de ácido cítrico e sugerem que ocorre com isso uma liberação de fosfatos insolúveis. Hoffland et al. (1989), usando uma técnica com placas e ágar, constataram a exsudação de ácidos orgânicos e mostraram que a exsudação de ácidos cítrico e málico é alta em zonas acidificadas da rizosfera, em locais com ausência de P. Quando foram aplicadas doses crescentes de ácido cítrico, observou-se que, na rizosfera, as concentrações desse ácido diminuíram à medida que se aumentava a dose de ácido cítrico adicionado. Junk et al. (1993) incubaram amostras de solos com 50  $\mu\text{mol}$  de ácido cítrico e mostraram que as concentrações de fosfato em solução obtidas foram aumentadas significativamente, quando comparadas com o controle. Li et al. (1997), analisando a distribuição de exsudatos na rizosfera de tremoço, verificaram que a secreção de ácidos orgânicos solubilizou parte do fosfato precipitado no solo. Experimentos têm mostrado também que a adição de ácidos como o cítrico causou a dissolução de P de rochas fosfatadas (Vassilev et al., 1995).



**Figura 2** - Ácidos cítrico, oxálico e málico em rizosfera de cafeeiro em função de doses de Fosfato Natural (apatita de araxá) e ácido cítrico – (AC0(0), AC1(  $10^{-4}$ ), AC2( $10^{-3}$ ) e AC3 (  $10^{-2}$ ) M).

Devido à habilidade do oxalato em complexar fortemente metais como o Al, a presença de grandes quantidades dessa substância no solo pode ter importantes implicações em química e nutrição de plantas (Gardner et al.,1983; Reid et al.,1985). As concentrações de ácido oxálico (Figura 2) apresentaram comportamento diferente entre as doses de ácido cítrico e fosfato natural. Na dose AC0 (ausência de ácido cítrico), foi observada redução nas concentrações desse ácido, o que não era esperado, já que em condições normais a planta deveria exsudar mais ácidos orgânicos com o aumento das doses de P natural, comportamento semelhante ao do ácido cítrico. Para Sagoe et al. (1996), a reação em solos onde foram aplicados ácidos orgânicos e fosfato natural é difícil de ser compreendida e determinada, devido à rápida degradação dos ácidos orgânicos e às pequenas quantidades encontradas na rizosfera. Na dose AC1 ( $10^{-4}$ M), houve tendência de aumento das concentrações de ácido oxálico, indicando que em pequenas doses pode haver estímulo na exsudação de outros ácidos quando o ácido cítrico é aplicado. Nas demais doses (AC2 e AC3), o ácido cítrico, ou o fosfato natural, exerceu influência significativa nas concentrações de ácido oxálico. De modo geral, as concentrações de ácido oxálico encontradas na rizosfera da cultivar

avaliada neste estudo (Topázio MG-1190) foram maiores que aquelas encontradas em estudo anterior (Silva et al., 2000), avaliando as cultivares Icatu Amarelo, Catuaí Vermelho e Mundo Novo (entre 2,3 e 2,5  $\mu\text{mol/g}$ ). Fox & Comerford (1990) identificaram através da CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) os ácidos orgânicos alifáticos de baixo peso molecular extraídos em água e presentes na solução do solo de um grupo de Ultisols, Entisols e Spodosols sob floresta. O ácido oxálico foi encontrado em todas as amostras e em concentrações mais elevadas, variando de 25 a 1.000  $\mu\text{M}$  na solução do solo. Em menores concentrações, em algumas das amostras, foram detectados os ácidos cítrico, fórmico, málico, láctico, aconítico e succínico.

A curva referente às concentrações de ácido málico na dose 0 de ácido cítrico (AC0) não foi apresentada, por não haver condição de ajuste estatístico. Observou-se aumento das concentrações de ácido málico (Figura 2) quando doses crescentes de ácido cítrico e fosfato natural foram adicionadas. Isso indica que o ácido cítrico tem efeito positivo na produção de ácido málico, bem como esse efeito pode ser devido ao aumento das doses de fosfato natural. Hoffland et al. (1989), usando uma técnica com placas e ágar, constataram a exsudação de ácidos orgânicos e mostraram que a exsudação de ácidos cítrico e málico é alta em zonas acidificadas da rizosfera, em locais com ausência de P.

## CONCLUSÕES

Os ácidos cítrico, oxálico e málico apresentaram comportamento diferenciado quando foram aplicadas diferentes doses de ácido cítrico e fosfato natural no solo.

Houve tendência de redução das concentrações de ácido oxálico na presença de ácido cítrico, comportamento oposto ao dos ácidos cítrico e málico.

As concentrações de ácido oxálico foram as maiores entre os ácidos estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAZIMARAKENGA, B.; SIMARD, R.R.; LEUROX, G.D. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.349-356.1995.
- FOX, T.R.; COMERFORD, N.B. Low-molecular-weight organic acids in selected forest soils of southeastern USA. **Soil Science Society American Journal**, Florida, 54:1139-1144, 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.; REISENAUER, H.M. Plant effects on soil manganese availability. **Soil Science Society of American Journal**, v.44, p.993-995. 1980.
- HOFFLAND, E.; FIDENEGG, G.R.; NELEMANS, J.A. Solubilization of rock phosphate by rape. **Plant and Soil**, v.113, p.161-165. 1989.
- HUANG, W.H.; KELLER, W.D. Dissolution of rock-forming silicate minerals in organic acids: Simulated first-stage weathering of fresh mineral surfaces. **Am. Mineral**. 55:2076-2094, 1970.
- JAYARAMA; SHANKAR, B.N; VIOLET, M.D.S. Citric acid as a potential phosphate solubiliser in coffee soils. **Indian Coffee**, p.13-15, 1998.
- JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere- a critical review. **Plant and Soil**, v.205, p.25-44, 1998.
- LI, M.G.; SHINANO, T.; TADANO, T. Distribution of exudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**. v.43, p.237-245, 1997.
- LIPTON, D. S.; BLANCHARD, R.W.; BLEVINS, D.G. Citrate, malate and succinate concentration in exudates from P sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. **Plant Physiology**, v.85, p.315-317. 1987.
- LOPES, A.S. Fosfatos Naturais. In: COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS: Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais-5ª Aproximação-Viçosa-MG, 1999. p.65-67.
- REID, R.K.; REID, C.P.P.; SZANISZLO, P.J. Effects of synthetic and microbially produced chelates on the diffusion of iron and phosphorus to a simulated root in soil. **Biol. Fert. Soils**, v.1 p.45-52, 1985.
- 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, F.A .; NOGUEIRA, F.D.; RIBEIRO, L.L.; GUIMARÃES, P.T.G.; GODINHO, A. Determinação de ácidos orgânicos na rizosfera de cafeeiro por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). In: **Simpósio de Pesquisas de Cafés do Brasil**. 26 a 29 de setembro de 2000, Poços de caldas-MG.
- 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).
- VASSILEV, N.; BACA, M.T.; VASSILEVA, M.; FRANCO, I.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.546-549. 1995.