

COLOCAÇÃO NO MERCADO DE MATÉRIAS FERTILIZANTES NÃO HARMONIZADAS

Orientações sobre os métodos de ensaio de eficácia

(conforme no n.º 11 do artigo 19.º do Decreto-Lei n.º 103/2015, de 15 de junho)

Preâmbulo

A atual legislação relativa à colocação no mercado das matérias fertilizantes não harmonizadas, Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho, impõe, no número 1 do seu artigo 19º, a demonstração da segurança e da eficácia agronómica das matérias fertilizantes a colocar no mercado, bem como da sua adequação aos solos nacionais, através da realização de ensaios de eficácia.

O presente documento pretende estabelecer orientações relativas aos procedimentos necessários à demonstração adequada daqueles requisitos, através da realização dos referidos ensaios, fornecendo informações gerais em relação ao seu delineamento, condução, análise e apresentação de resultados.

1. Eficácia da matéria fertilizante

1.1. Definição

Pode definir-se *eficácia da matéria fertilizante* como a sua capacidade, quando aplicada em determinadas condições edafoclimáticas a um sistema de produção específico, de assegurar ou melhorar a nutrição das culturas e ou de melhorar ou manter, a curto, médio ou longo prazo, o estado de fertilidade do solo garantindo, assim, condições que assegurem ou melhorem, em quantidade e qualidade, a produção vegetal, salvaguardando a qualidade dos recursos naturais e a segurança dos produtos obtidos.

1.2. Critérios de eficácia: Efeito principal e secundário da matéria fertilizante

A eficácia da matéria fertilizante deve ser demonstrada através da descrição do efeito principal resultante da sua aplicação nas condições de emprego previstas, identificando a ou as substâncias ativas responsáveis pelo efeito reivindicado. Do mesmo modo, devem ser identificados, caracterizados e explicados os seus efeitos secundários.

A demonstração e a quantificação destes efeitos serão fundamentadas, essencialmente, nos resultados dos ensaios de eficácia, obtidos a partir da aplicação de métodos de análise estatística adequados.

Podem ser considerados, entre outros, os seguintes critérios de eficácia:

- Critérios de eficácia que permitam demonstrar que a nutrição das culturas é assegurada ou melhorada através da aplicação da matéria fertilizante:

- Aumento da produtividade da cultura (p.ex. matéria seca, grão, frutos, consoante o tipo de cultura);
 - Melhoria do equilíbrio nutricional da cultura, avaliado através de indicadores apropriados (p.ex. mudança da situação de insuficiência relativa a determinado nutriente para a situação de suficiência, em culturas arbóreas ou arbustivas);
 - Melhoria da qualidade dos produtos, avaliada através de indicadores de qualidade ou do seu teor em determinados constituintes benéficos para a alimentação humana ou animal.
- Critérios de eficácia que permitam demonstrar a manutenção ou melhoria do estado de fertilidade do solo:
 - Incluem todas as propriedades físicas, químicas ou biológicas do solo avaliadas através de parâmetros físicos, químicos ou biológicos adequados consoante a matéria fertilizante em avaliação.

2. Ensaio de eficácia realizados no campo

Todo o processo de demonstração e quantificação de eficácia de uma matéria fertilizante pressupõe a execução de várias etapas a desenvolver segundo a seguinte ordem cronológica:

2.1. Fase 1 - Desenvolvimento do protocolo de ensaio

A realização de um ensaio de eficácia pressupõe, sempre, a elaboração de um protocolo do ensaio, no qual conste: o título, os responsáveis, o objetivo, a localização, as condições experimentais, a(s) cultura(s) e/ou cultivar(es), o(s) tipo(s) de solo(s), o delineamento experimental, o esquema da sua implantação no campo, o número de repetições, as modalidades experimentais em estudo, a dimensão dos talhões, os parâmetros a avaliar e os métodos de análise laboratorial.

- **Condições experimentais**

Os ensaios de eficácia relativos às matérias fertilizantes não harmonizadas, não excecionadas da exigência da sua realização, serão efetuados ao ar livre ou em estufa, consoante o tipo de culturas consideradas: culturas de ar livre ou culturas protegidas.

- **Delineamento experimental**

O delineamento experimental é o processo de planear um ensaio ou experiência, incluindo a sua implantação, de modo a que seja possível obter dados que possam ser analisados, usando as metodologias estatísticas apropriadas, que conduzam a resultados válidos e a conclusões objetivas. Deverá permitir a obtenção de efeitos significativos a um determinado nível de probabilidade da matéria fertilizante sobre a cultura ou determinada(s) característica(s) do solo e/ou da planta.

Os delineamentos experimentais mais vulgares neste tipo de ensaios são os blocos completos casualizados e o delineamento em *split-plot*. Outros delineamentos experimentais, como o completamente casualizado, podem ser considerados em situações em que as diversas unidades experimentais sejam homogêneas e as condições ambientais facilmente controláveis, como é o caso das estufas.

Os ensaios de campo deverão ser, sempre que possível, realizados em diferentes regiões e anos, por forma a testar a matéria fertilizante em condições edafoclimáticas distintas.

- **Tratamentos ou Modalidades experimentais**

Os tratamentos ou modalidades experimentais devem ser cuidadosamente estabelecidos de modo a irem ao encontro dos objetivos previamente definidos para o ensaio, demonstrando o efeito principal da matéria fertilizante, bem como os efeitos secundários referidos.

De modo a que o ensaio seja estatisticamente válido, todos os tratamentos experimentais devem ser comparados com, pelo menos, um tratamento testemunha: (a) uma testemunha sem aplicação da matéria fertilizante e, se necessário, (b) uma modalidade que receba uma matéria fertilizante do mesmo tipo já legalmente comercializada em Portugal e que atue como referência (controlo positivo). Esta referência deverá estar bem identificada, recomendando-se a inclusão do rótulo comercial do produto no relatório. O(s) tratamento(s) testemunha deve(m) ser sujeitos a todas as ações que forem uniformemente aplicadas em todo o ensaio, com exceção da adição da matéria fertilizante em teste.

De um modo geral, será desejável a existência de modalidades experimentais com doses de aplicação da matéria fertilizante em quantidades crescentes, de preferência em série geométrica (ex. 1, 2, 4, 8, 16).

A fim de evitar erros e troca de dados experimentais, todas as modalidades experimentais, o modo de aplicação da matéria fertilizante a ensaiar e as doses de aplicação devem ser bem identificados.

- **Número de repetições**

Repetição é a atribuição da mesma modalidade experimental a várias unidades experimentais. O objetivo da sua realização é estimar o valor do erro experimental que, por sua vez, é essencial para avaliar a significância estatística ou estimar intervalos de confiança, a determinado nível de probabilidade, para o efeito em estudo.

Para que se possa realizar uma correta análise estatística dos dados experimentais obtidos, o número de graus de liberdade (g.l.) do erro experimental deve ser suficientemente elevado, geralmente nunca inferior a 12. Os g.l. do erro podem ser aumentados com o número de repetições, com o número de modalidades experimentais, ou com ensaios realizados em diferentes locais, embora com a mesma cultura ou sucessão de culturas.

Na tabela seguinte apresenta-se o número de graus de liberdade do erro experimental, consoante o número de repetições e modalidades experimentais consideradas.

Modalidades experimentais	Repetições					
	3	4	5	6	7	8
3	4	6	8	10	12	14
4	6	9	12	15	18	21
5	8	12	16	20	24	28
6	10	15	20	25	30	35
7	12	18	24	30	36	42
8	14	21	28	35	42	49

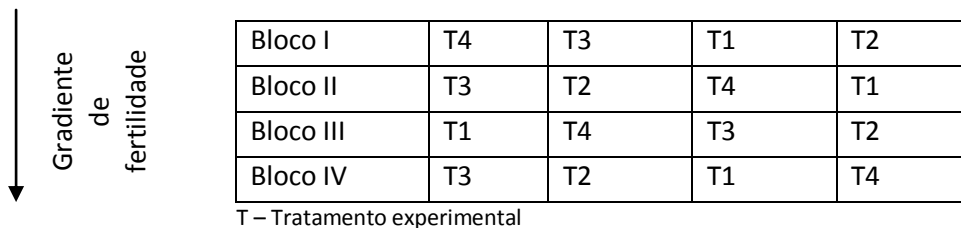
- **Unidade experimental: tamanho, forma e bordaduras**

Unidade experimental é a unidade física que recebe cada uma das modalidades experimentais e na qual se vai avaliar o efeito da mesma. Nos ensaios de campo coincide com o talhão experimental.

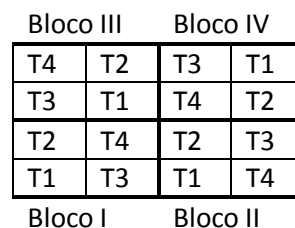
No caso das culturas arvenses ou hortícolas, cada talhão experimental deve ter no mínimo uma área útil (aquela em que são feitas as observações) entre 10 e 25 m². Em culturas arbóreas, cada talhão experimental deve ser constituído, pelo menos, por 4 árvores úteis. No caso da vinha, cada talhão experimental deve compreender 20 videiras úteis distribuídas em duas linhas contíguas.

De modo a evitar interferências entre modalidades experimentais atribuídas a talhões contíguos (o chamado efeito de bordadura), as observações devem ser realizadas na sua zona central (área útil). Deverá, assim, existir sempre uma área de bordadura entre os talhões experimentais, nunca inferior a 0,5 m de largura e, no caso das culturas arbóreas e arbustivas, deve ser constituída, pelo menos, por uma linha de plantas.

Os talhões experimentais têm normalmente forma retangular a fim de facilitar as operações culturais a desenvolver. Quando o gradiente de fertilidade da área é conhecido, a orientação dos blocos deve ser escolhida de modo a que as diferenças entre blocos sejam maximizadas e dentro de cada bloco sejam mínimas. Por exemplo, numa área em que há um gradiente de fertilidade unidirecional, o comprimento dos blocos deve estar orientado perpendicularmente à direção do gradiente de fertilidade do solo:



Quando não se conhece o gradiente de fertilidade do solo ou quando a sua existência não é nítida, os blocos devem ser compactos, com forma aproximada de um quadrado:



2.2. Fase 2 - Instalação e acompanhamento do ensaio.

- **Instalação**

Os ensaios de eficácia devem ser preferencialmente realizados em Portugal, para que os seus resultados possam evidenciar a adequação da matéria fertilizante aos solos nacionais.

Deverão ser instalados em solos cujas características se adaptem ao efeito que se pretende demonstrar (exs. (a) para testar o efeito de um corretivo alcalinizante os ensaios deverão ser

instalados em solos ácidos; (b) tratando-se de um corretivo orgânico deverão ser instalados em solos pobres em matéria orgânica e em nutrientes e com fraco poder tampão).

Salvo raras exceções, a matéria fertilizante constitui um complemento dos nutrientes e ou constituintes já presentes no solo. A sua eficácia é, pois, altamente dependente das características iniciais do solo que a recebe, pelo que é essencial a apresentação das mesmas, através de relatórios de análise laboratorial.

Os ensaios devem abranger os grupos de culturas para as quais a matéria fertilizante é indicada.

As modalidades experimentais devem ser instaladas dentro de cada bloco, através de um processo de casualização, passando ao bloco seguinte apenas quando o anterior estiver completo.

- **Acompanhamento do ensaio**

Deve ser elaborado um esquema do ensaio, com os blocos e a disposição das modalidades experimentais devidamente assinaladas, onde serão registadas eventuais anomalias ou acidentes observados durante a realização do ensaio (ex. presença de uma praga ou doença em parte do ensaio).

O acompanhamento do ensaio, incluindo as operações culturais e a realização e registo de observações, devem ser efetuados de forma a manter o erro experimental tão baixo quanto possível. Assim, as operações culturais necessárias à condução da cultura devem ser efetuadas dentro de cada bloco, passando ao seguinte apenas quando o anterior estiver completo.

2.3. Fase 3 - Colheita de amostras no dispositivo experimental.

- **Que amostras devem ser colhidas?**

- Amostras de matérias fertilizantes: A matéria fertilizante em estudo deve ser sujeita a análise laboratorial antes da instalação do ensaio, o mesmo se verificando, caso exista, com a matéria fertilizante do mesmo tipo, legalmente comercializada em Portugal, que atue como referência.

- Amostras de terra: Após a demarcação, no campo, dos blocos e dos talhões experimentais mas antes da aplicação dos tratamentos, deverão ser colhidas amostras compósitas de terra, talhão a talhão, que permitirão caracterizar o estado de fertilidade do solo e realizar a conveniente fertilização de base da cultura a ensaiar, bem como avaliar a variabilidade da fertilidade do solo entre talhões. Em situações de homogeneidade do solo, estas amostras podem ser colhidas por bloco. A profundidade de colheita da amostra depende do tipo de cultura a instalar.

No caso dos ensaios de eficácia com corretivos (orgânicos e minerais) devem ser colhidas novas amostras de terra, talhão a talhão, no final da cultura ou do seu ciclo cultural ou, caso se trate de um ensaio para avaliar o efeito residual da matéria fertilizante no solo, no final do ensaio.

- Amostras de material vegetal: no caso das culturas arbóreas e arbustivas, a colheita de amostras foliares, para avaliação do estado de nutrição da cultura, ou de frutos, para avaliação do efeito da aplicação da matéria fertilizante sobre a qualidade dos mesmos, serão feitas talhão a talhão, caso se pretenda demonstrar os efeitos referidos. Em culturas anuais, deverão ser colhidas amostras da produção final, talhão a talhão, caso se deseje, igualmente, demonstrar o efeito da matéria fertilizante sobre a qualidade da mesma. O mesmo procedimento deve ser seguido nos casos em que seja necessário demonstrar segurança dos produtos obtidos, destinados à alimentação humana ou animal, com a aplicação da matéria fertilizante em estudo.

- Amostras de água de rega: No caso de o ensaio ser conduzido em regadio, deve ser controlada a qualidade da água de rega, através da sua análise, a fim de conhecer eventuais interferências na avaliação do efeito que se pretende demonstrar.

- **Como colher as amostras?**

As normas de colheita de amostras dos vários tipos são apresentadas no sítio da Internet do INIAV, I.P. (<http://www.iniaiv.pt/menu-de-topo/servicos-produtos/analises-laboratoriais>).

2.4. Fase 4 - Quantificação dos efeitos imputados ao produto

A quantificação de alguns dos efeitos imputados à matéria fertilizante em estudo pode ser feita diretamente no campo, quando o mesmo se refira, por exemplo, ao aumento da produtividade da cultura, caso em que a produção expressa em peso, número de frutos, ou frutos com determinada característica, é avaliada talhão a talhão.

No entanto, a demonstração dos efeitos imputados ao produto só ficará completa com o conhecimento das alterações provocadas em determinadas características do solo, da planta ou do produto final apenas possível com a análise e comparação dos resultados analíticos obtidos em laboratório.

A análise das amostras deverá ser realizada em laboratórios que cumpram o disposto no Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho.

A análise da produção e da sua qualidade deverá ser sempre feita de modo quantitativo e não apenas por observação visual. No caso de se tratar de uma variável não quantificável (ex. diferentes colorações nos frutos) deverá ser previamente estabelecida uma escala que permita a sua classificação.

- **Que análises realizar?**

A resposta a esta questão está intimamente relacionada com a natureza da matéria fertilizante e com os efeitos que se pretendem demonstrar.

Assim, consoante o tipo de matéria fertilizante, os efeitos a demonstrar e as exigências a que cada uma está sujeita, de acordo com o Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho, deverão ser consideradas as determinações analíticas constantes dos quadros seguintes:

- **No solo:**

Parâmetros		
• pH	•Complexo de troca (SBT, CTC, GSB)	• Análise granulométrica
• Condutividade elétrica	•Al de troca	• Estabilidade estrutural
• Matéria orgânica	•Necessidade de cal	• Capacidade de retenção para a água
• P, K e Mg extraíveis	•Fe, Mn, Zn, Cu, B extraíveis	• Densidade aparente
• Carbonatos	•Cu, Zn, Cd, Pb, Cr, Ni e Hg totais	

- **No material vegetal** (folhas, pecíolos e/ou frutos):

A fim de demonstrar o efeito da matéria fertilizante sobre o estado de nutrição da cultura, sobre a qualidade e ou segurança da produção:

Parâmetros

Folhas e pecíolos		Frutos	
• azoto	• ferro	• cádmio	• % sólidos solúveis
• fósforo	• manganês	• chumbo	• acidez total
• potássio	• zinco	• crómio	• firmeza (dureza)
• cálcio	• cobre	• mercúrio	• índice refratométrico
• magnésio	• boro	• níquel	• acidez total titulável e pH
• enxofre			• teor em amido

O exemplo apresentado na tabela anterior reporta-se ao caso dos frutos. Neste caso particular, também deve ser analisada a sua composição mineral, em particular se o efeito a demonstrar se relacionar com o poder de conservação dos mesmos. Caso se trate de avaliar a qualidade de outro produto deverão ser consideradas as determinações analíticas adequadas.

○ **Na água de rega:**

Parâmetros

• Bicarbonatos	• Magnésio	• Ferro *
• Boro	• Nitratos	• Manganês *
• Cálcio	• pH	• Sólidos em suspensão *
• Cloretos	• Sódio	• Índice de saturação *
• Condutividade elétrica	• Razão de adsorção de sódio	• Sulfatos *
• Carbonatos	ajustada	

* Para rega gota a gota

As determinações analíticas presentes nos quadros anteriores não são exaustivas e devem ser adequadas, como referido, ao objetivo pretendido.

Note-se que, no caso de se pretender demonstrar o efeito da matéria fertilizante sobre um parâmetro específico, quer no solo quer nas plantas, este terá de ser obrigatoriamente contemplado.

Embora desejável, não se considera obrigatória a análise de alguns dos metais pesados (Cd, Pb, Cr, Hg e Ni) no material vegetal, caso a matéria fertilizante seja um corretivo orgânico de classe I, incluído no grupo 5 Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho.

2.5. Fase 5 – Análise estatística dos dados obtidos no ensaio de eficácia

Os dados obtidos no ensaio, a partir dos quais se deseje demonstrar a eficácia da matéria fertilizante em causa (cf. Ponto 1, do presente documento) terão de ser submetidos a uma análise estatística que, embora de simples aplicação, permita a comparação entre modalidades experimentais e a conclusão se existe ou não diferenças significativas, a um determinado nível de probabilidade, entre elas.

Deverá ser utilizado um nível de significância estatística mínimo de 5%, embora se possa considerar um nível de 10% de significância, caso o(s) efeito(s) a demonstrar seja(m) apoiado(s) em resultados obtidos em ensaios de campo realizados ao longo de vários anos e em diferentes locais.

O método estatístico a utilizar depende em primeiro lugar do delineamento experimental considerado e do tipo de variável a analisar. Se a variável for quantitativa, deve ser usado um teste paramétrico (ex. análise de variância e análise de regressão).

2.6. Fase 6 – Relatório do ensaio de eficácia

O relatório a apresentar deve ser completo e organizado, devendo incluir toda a informação considerada relevante para o fim em vista e apresentar as seguintes características:

- Ter um título descritivo com identificação clara e precisa do ensaio a que diz respeito;
- Identificar a entidade e o técnico responsável pela realização do ensaio e pela elaboração do relatório;
- Apresentar uma nota introdutória onde conste:
 - A identificação da matéria fertilizante que está a ser testada, incluindo a apresentação das matérias primas constituintes e a respetiva percentagem em massa;
 - A identificação clara dos efeitos principal e secundário(s) que se pretendem demonstrar;
 - Os critérios de eficácia considerados para o efeito;
 - O local onde foi realizado o ensaio e as condições sob as quais ele decorreu;
 - As variáveis experimentais avaliadas quer no solo quer no material vegetal;
- Descrever o protocolo de ensaio, onde conste:
 - O delineamento experimental estabelecido;
 - As modalidades experimentais consideradas;
 - O número de repetições;
 - A área dos talhões experimentais;
 - A(s) cultura(s) utilizada(s) identificada(s) pela(s) espécie(s) e, se possível, a(s) cultivar(es);
 - As características do(s) solo(s) em decorreu o ensaio;
 - O modo de aplicação da matéria fertilizante;
 - Outras informações relativas às restantes operações culturais, designadamente fertilização efetuada, regas e tratamentos fitossanitários efetuados, entre outros.
- Indicar os métodos utilizados na colheita de amostras, na sua análise laboratorial e na análise estatística;
- Incluir os resultados obtidos, nomeadamente:
 - Os dados experimentais obtidos sem qualquer tratamento estatístico (em anexo);

- Os resultados da análise estatística relevantes para a demonstração da eficácia da matéria fertilizante, apresentados da forma que se considerar mais adequada;
 - As conclusões do ensaio realizado, fundamentadas nos resultados previstos no ponto anterior;
 - Se o ensaio não foi conduzido em Portugal, as conclusões devem, ainda, demonstrar a sua validade em termos de adequação aos solos e sistemas de condições climáticas nacionais.
- Anexar o(s) relatório(s) de análise laboratorial da matéria fertilizante em causa que incluam os parâmetros de análise obrigatória previstos no Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho no seu Anexo V, consoante o grupo em que se insira.

3. Ensaio de eficácia realizados em vasos

Em determinadas circunstâncias, designadamente quando se trata de efetuar o registo de uma matéria fertilizante pertencente a um dos tipos previstos no grupo 5 do Anexo I do Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho, a demonstração da sua segurança e eficácia, bem como a adequação aos solos nacionais, poderão ser demonstradas através da realização de ensaios em vasos.

À semelhança do que se verifica com os ensaios de campo, a realização dos ensaios em vasos, com os objetivos supracitados, pressupõe a execução de várias etapas a desenvolver segundo a seguinte ordem cronológica:

3.1. Fase 1 - Desenvolvimento do protocolo de ensaio

A realização de um ensaio de eficácia em vaso pressupõe, sempre, a elaboração de um protocolo do ensaio, no qual conste: o título, os responsáveis, o objetivo, as condições experimentais, a planta teste considerar, o tipo de solo a utilizar nos vasos, o delineamento experimental, o número de repetições, as modalidades experimentais em estudo, o volume e o diâmetro dos vasos, os parâmetros a avaliar e os métodos de análise laboratorial.

- ***Condições experimentais***

Os ensaios de eficácia em vaso, relativos às matérias fertilizantes não harmonizadas não excecionadas da exigência da sua realização, serão efetuados em infraestruturas adequadas para o efeito, em ambiente condicionado, de modo a garantir condições ambientais idênticas para todos os vasos durante o período em que decorrer o ensaio.

- ***Delineamento experimental***

O delineamento experimental é o processo de planear um ensaio ou experiência, incluindo a sua instalação, de modo a que seja possível obter dados que possam ser analisados, usando as metodologias estatísticas apropriadas, que conduzam a resultados válidos e a conclusões objetivas. Deverá permitir a obtenção de efeitos significativos da matéria fertilizante sobre determinada(s) característica(s) do solo e/ou da planta teste considerada.

Os delineamentos experimentais mais vulgares nos ensaios em vaso são os blocos completos casualizados e a casualização completa das modalidades experimentais, dado que são realizados em condições controladas, tanto no que se refere à homogeneidade das unidades experimentais (vasos), como das condições ambientais.

- **Tratamentos ou Modalidades experimentais**

Os tratamentos ou modalidades experimentais devem ser cuidadosamente estabelecidos de modo a irem ao encontro dos objetivos previamente definidos para o ensaio, demonstrando o efeito principal da matéria fertilizante, bem como os efeitos secundários referidos.

De modo a que o ensaio seja estatisticamente válido, todos os tratamentos experimentais devem ser comparados com, pelo menos, um tratamento testemunha: (a) uma testemunha sem aplicação da matéria fertilizante e, se necessário, (b) uma modalidade que receba uma matéria fertilizante do mesmo tipo já legalmente comercializada em Portugal e que atue como referência (controlo positivo). Esta referência deverá estar bem identificada, recomendando-se a inclusão do rótulo comercial do produto no relatório. O(s) tratamento(s) testemunha deve(m) ser sujeitos a todas as ações que forem uniformemente aplicadas em todo o ensaio, com exceção da adição da matéria fertilizante em teste.

De um modo geral, será desejável a existência de modalidades experimentais com doses de aplicação da matéria fertilizante em quantidades crescentes, calculadas em função das quantidades máximas de aplicação permitidas pelo Anexo II do Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho.

A fim de evitar erros e troca de dados experimentais, todas as modalidades experimentais, o modo de aplicação da matéria fertilizante a ensaiar e as doses de aplicação devem ser bem identificados.

- **Número de repetições**

Repetição é a atribuição da mesma modalidade experimental a várias unidades experimentais (vasos). O objetivo da sua realização é estimar o valor do erro experimental que, por sua vez, é essencial para avaliar a significância estatística ou estimar intervalos de confiança, a determinado nível de probabilidade, para o efeito em estudo.

Para que se possa realizar uma correta análise estatística dos dados experimentais obtidos, o número de graus de liberdade (g.l.) do erro experimental deve ser suficientemente elevado, geralmente nunca inferior a 12. Os g.l. do erro podem ser aumentados com o número de repetições e com o número de modalidades experimentais.

Na tabela seguinte apresenta-se o número de graus de liberdade do erro experimental, consoante o número de repetições e modalidades experimentais consideradas.

Modalidades experimentais	Repetições					
	3	4	5	6	7	8
3	4	6	8	10	12	14
4	6	9	12	15	18	21
5	8	12	16	20	24	28
6	10	15	20	25	30	35
7	12	18	24	30	36	42
8	14	21	28	35	42	49

De um modo geral, nos ensaios em vaso, são consideradas quatro repetições desde que o número de modalidades ou tratamentos experimentais seja suficiente para garantir o número desejado de graus de liberdade.

- **Unidade experimental**

Unidade experimental é a unidade física que recebe cada uma das modalidades experimentais e na qual se avalia o efeito da mesma. Nos ensaios em vasos coincide com o próprio vaso.

Consoante a planta teste, a necessidade de efetuar uma rotação de culturas, as características do produto a ensaiar, ou a quantidade de terra disponível, assim se deverá adaptar o volume dos vasos a utilizar no ensaio. A título meramente indicativo, poder-se-ão considerar os seguintes volumes: 1,5 litros, 3 litros e 7 litros, cuja utilização depende das condições do ensaio.

De referir que os vasos devem ser de material quimicamente inerte, a fim de evitar contaminações suscetíveis de aumentar o erro experimental.

3.2. Fase 2 - Instalação e acompanhamento do ensaio.

- **Instalação**

As macroamostras de terra a utilizar nos ensaios em vasos devem ser representativas de solos nacionais e possuir as características adequadas ao efeito que se pretende demonstrar.

Assim, para testar o efeito de um corretivo alcalinizante, deverão ser utilizadas macroamostras de solos ácidos e, no caso de um corretivo orgânico, de solos pobres em matéria orgânica e em nutrientes, com fraco poder tampão.

Salvo raras exceções, a matéria fertilizante constitui um complemento dos nutrientes e ou constituintes já presentes no solo. A sua eficácia é, pois, altamente dependente das características iniciais do solo que a recebe, pelo que é essencial a apresentação das características da macroamostra de solo utilizada no ensaio, através de relatórios de análise laboratorial.

O período de incubação, ou seja, o tempo que medeia entre a mistura com a terra e a sementeira ou plantação da planta teste, depende do estado de maturação da matéria fertilizante a ensaiar. Tratando-se, por exemplo, de um composto maturado, a sua mistura com a terra pode ser efetuada num período inferior a 3 semanas, antes da sementeira ou plantação da planta teste. No caso de o composto ser fresco ou semimaturado, esse período deve ser alargado a pelo menos de 4 e 3 semanas, respetivamente.

Consoante a época em que decorrer o ensaio, assim deve ser escolhida a planta teste, de modo a que o seu ciclo cultural esteja adaptado às condições de luz e temperatura prevaletentes durante o período experimental.

O número de plantas a utilizar por vaso depende do volume deste, que deve ser adaptado à cultura a ensaiar, e da planta considerada. Geralmente, semeia-se ou planta-se mais do que uma planta em cada vaso, realizando posteriormente um desbaste, escolhendo-se a(s) que se apresentar(em) em melhores condições.

A instalação das modalidades experimentais deve ser sujeita a um processo de casualização, à semelhança do que seria de considerar caso o ensaio se realizasse no campo.

- **Acompanhamento do ensaio**

Deve ser elaborado um esquema do ensaio, com a disposição das modalidades experimentais nos vasos devidamente assinaladas, onde serão registadas eventuais anomalias ou acidentes observados durante a realização do ensaio.

O acompanhamento do ensaio, incluindo as operações culturais e a realização e registo de observações, devem ser efetuados de forma a manter o erro experimental tão baixo quanto possível.

Dado tratar-se de um dispositivo experimental conduzido em ambiente controlado, convém proceder à rotação periódica dos vasos, de modo a que todos fiquem, tanto quanto possível, sujeitos às mesmas condições de radiação.

Durante o período de tempo em que decorrer o ensaio, devem ser efetuadas regas com água desionizada de forma a manter os vasos a 70% da capacidade de campo.

3.3. Fase 3 - Colheita de amostras no dispositivo experimental.

- **Que amostras devem ser colhidas?**

- Amostras de matérias fertilizantes: A matéria fertilizante a estudar deve ser sujeita a análise laboratorial antes da instalação do ensaio, o mesmo se verificando, caso exista, com a matéria fertilizante do mesmo tipo, legalmente comercializada em Portugal, que atue como referência.

- Amostras de terra: Antes do enchimento dos vasos, deverá ser colhida uma amostra representativa da macroamostra de terra, a ser utilizada no ensaio, que deverá ser sujeita a uma análise inicial, a fim de a caracterizar e definir a fertilização de base a efetuar aos vasos, para que a planta teste não fique sujeita a qualquer limitação de carácter nutricional que possa mascarar os efeitos que se pretende demonstrar.

No final do ensaio, deverá ser colhida, em cada vaso, uma amostra de terra representativa. Para tal torna-se necessário retirar a totalidade da terra do vaso, separar as raízes e, após mistura cuidadosa de todo o material terroso, colher a amostra de terra para análise.

- Amostras de material vegetal: Dependendo da planta teste utilizada, as amostras de material vegetal colhidas em cada vaso correspondem, geralmente, à totalidade da biomassa produzida.

3.4. Fase 4 - Quantificação dos efeitos imputados ao produto

A análise da produção e da qualidade da cultura deverá ser sempre feita de modo quantitativo e não apenas por observação visual. No caso de se tratar de uma variável não quantificável deverá ser previamente estabelecida uma escala que permita a sua classificação.

A demonstração dos efeitos imputados ao produto só ficará completa com o conhecimento das alterações provocadas em determinadas características do solo e da planta, apenas possível com a análise e comparação dos resultados analíticos obtidos em laboratório.

A análise das amostras deverá ser realizada em laboratórios que cumpram o disposto no Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho.

- **Que análises realizar?**

A resposta a esta questão está intimamente relacionada com a natureza da matéria fertilizante e com os efeitos que se pretendem demonstrar.

Assim, consoante o tipo de matéria fertilizante, os efeitos a demonstrar e as exigências a que cada uma está sujeita, de acordo com o Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho, deverão ser consideradas as determinações analíticas constantes dos quadros seguintes:

- **Na macroamostra de terra antes do enchimento dos vasos:**

Parâmetros físico-químicos

• pH	• Carbonatos
• Condutividade elétrica	• Fe, Mn, Zn, Cu, B extraíveis
• Matéria orgânica	• Cu, Zn, Cd, Pb, Cr, Ni e Hg totais
• P, K e Mg extraíveis	• Necessidade de cal (se necessário)
• Complexo de troca (SBT, CTC, GSB)	• Análise granulométrica
• Al de troca	• Massa volúmica aparente

- **Nas amostras de terra colhidas em cada vaso no final do ensaio:**

Parâmetros físico-químicos

• pH	• Complexo de troca (SBT, CTC, GSB)
• Condutividade elétrica	• Al de troca
• Matéria orgânica	• Fe, Mn, Zn, Cu, B extraíveis
• P, K e Mg extraíveis	• Cu, Zn, Cd, Pb, Cr, Ni e Hg totais

- **No material vegetal:**

A fim de demonstrar o efeito da matéria fertilizante sobre o estado de nutrição da cultura, sobre a qualidade e ou segurança da produção:

Parâmetros

• azoto;	• ferro;	• cádmio
• fósforo;	• manganês;	• chumbo
• potássio;	• zinco;	• crómio
• cálcio;	• cobre;	• mercúrio
• magnésio;	• boro.	• níquel
• enxofre		

As determinações analíticas presentes nos quadros anteriores não são exaustivas e devem ser adequadas ao objetivo pretendido.

Note-se que, no caso de se pretender demonstrar o efeito da matéria fertilizante sobre um parâmetro específico, quer no solo quer nas plantas, este terá de ser obrigatoriamente contemplado.

Embora desejável, não se considera obrigatória a análise dos metais pesados no material vegetal, caso a matéria fertilizante seja um corretivo orgânico de classe I, incluído no grupo 5 Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho.

3.5. Fase 5 – Análise estatística dos dados obtidos no ensaio de eficácia

Os dados obtidos no ensaio, a partir dos quais se deseje demonstrar a eficácia da matéria fertilizante em causa (cf. Ponto 1, do presente documento) terão de ser submetidos a uma análise estatística

que, embora de simples aplicação, permita a comparação entre modalidades experimentais e a conclusão se existe ou não diferenças significativas, a um determinado nível de probabilidade, entre elas.

Deverá ser utilizado um nível de significância estatística mínimo de 5%. O método estatístico a utilizar depende em primeiro lugar do delineamento experimental considerado e do tipo de variável a analisar. Se a variável for quantitativa, deve ser usado um teste paramétrico (ex. análise de variância e análise de regressão).

3.6. Fase 6 – Relatório do ensaio de eficácia

O relatório a apresentar deve ser completo e organizado, devendo incluir toda a informação considerada relevante para o fim em vista e apresentar as seguintes características:

- Ter um título descritivo com identificação clara e precisa do ensaio a que diz respeito;
- Identificar a entidade e o técnico responsável pela realização do ensaio e pela elaboração do relatório;
- Apresentar uma nota introdutória onde conste:
 - A identificação da matéria fertilizante que está a ser testada, incluindo a apresentação das matérias primas constituintes;
 - A identificação clara dos efeitos principal e secundário(s) que se pretendem demonstrar;
 - Os critérios de eficácia considerados para o efeito;
 - O local onde foi realizado o ensaio e uma breve descrição da infraestrutura utilizada;
 - As variáveis experimentais avaliadas quer nas amostras de terra, quer no material vegetal;
- Descrever o protocolo de ensaio, onde conste:
 - O delineamento experimental estabelecido;
 - As modalidades experimentais consideradas;
 - O número de repetições;
 - O volume dos vasos utilizados;
 - A planta teste utilizada identificada pela espécie e, se possível, a cultivar;
 - As características da macroamostra de terra utilizada;
 - Os procedimentos para preparação dos vasos, incluindo o número de plantas por vaso, o tempo de incubação e a fertilização de base efetuada;
 - Outras informações relativas às restantes operações realizadas, designadamente regas e tratamentos fitossanitários efetuados, bem como referência a qualquer acidente ocorrido e o seu efeito sobre as modalidades experimentais.
- Indicar os métodos utilizados na colheita de amostras, na sua análise laboratorial e na análise estatística;
- Incluir os resultados obtidos, nomeadamente:
 - Os dados experimentais obtidos sem qualquer tratamento estatístico (em anexo);

- Os resultados da análise estatística relevantes para a demonstração da eficácia da matéria fertilizante, apresentados da forma que se considerar mais adequada;
 - As conclusões do ensaio realizado, fundamentadas nos resultados previstos no ponto anterior;
 - Se o teste não foi conduzido em Portugal, as conclusões devem, ainda, demonstrar a sua validade em termos de adequação aos solos nacionais.
- Anexar o(s) relatório(s) de análise laboratorial da matéria fertilizante em causa que incluam os parâmetros de análise obrigatória previstos no Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho, no seu Anexo V, consoante o grupo em que se insira.

Bibliografia

- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, 2009. *Guidelines for efficacy evaluation of herbicides. Weeds in Australian Forests* [em linha]. Kingston, Australia: Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, 19 pp. Disponível em: http://www.apvma.gov.au/publications/guidelines/docs/forestry_herbicides_guidelines.pdf
- Canadian Food Inspection Agency, 2008 . T-4-108 – *Efficacy data requirements for fertilizers and supplements regulated under the Fertilizer Act*.
- Commission des matières fertilisantes et des supports de culture, 2005. *Note technique relative aux critères d'efficacité des matières fertilisantes et des supports de cultures ainsi qu'à leur démonstration* [em linha]. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) , 24 pp. Disponível em: <http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/DIVE-ft-Efficacite2005.pdf>
- Gomez, K.A. & Gomez A.A., 1984. *Statistical procedures for agricultural research*. 2nd ed., NY : Wiley, 680 pp.
- Leilah, A.A. & Al-Barrak, K.M., 2005. *Estimation of optimum field plot size and shape and number of replicates in sorghum yield trials*. J.King Saud Univ. Agricultural Sciences, vol. 17, n.º2, p. 101-116
- Martin, T.N. *et al.*, 2005 Tamanho ótimo de parcela e número de repetições em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Ciência Rural* [online], vol.35, n.º 2 [citado 2013-10-23], pp. 271-276. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000200004>.
- Organização europeia e mediterrânica para a proteção das plantas, 2012. Efficacy evaluation of plant protection products. Design and analysis of efficacy evaluation trials. EPPO Standard PP1/152(4). *EPPO Bulletin*, vol. 42, n.º 3, p. 367–381.
- Organização europeia e mediterrânica para a proteção das plantas, 2012. Efficacy evaluation of plant protection products. Conduct and reporting of efficacy evaluation trials, including good experimental practice. EPPO Standard PP1/181(4). *EPPO Bulletin*, vol. 42, n.º 3, p. 382-393.
- Wisconsin Department of Agriculture, Trade and Consumer Protection, 2009 Wisconsin Legislative Documents, *Chapter ATCP 40 - Fertilizer and related products* [em linha]. Disponível em: http://docs.legis.wisconsin.gov/code/admin_code/atcp/020/40