

PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DO RELATÓRIO DE BIOENSAIO PARA BIOFERTILIZANTE

1. INTRODUÇÃO

A Instrução Normativa nº 61, de 08 de julho de 2020, em seu artigo 14 da seção III, estabelece que para ao Registro de Produtos BIOFERTILIZANTE, entre outras exigências, a necessidade de apresentação de um RELATÓRIO DE BIOENSAIO conforme protocolo mínimo elaborado por instituição de pesquisa oficial brasileira ou credenciada (alínea “c” do inciso V). Estabelece ainda que tal relatório deverá seguir um protocolo mínimo a ser publicado pelo MAPA.

Neste sentido, este documento apresenta alguns critérios mínimos que devem ser seguidos para a confecção do referido relatório, o qual deve seguir os princípios básicos da Experimentação Agronômica.

O **RELATÓRIO DE BIENSAIO** deverá seguir minimamente este Protocolo que será composto de duas partes distintas:

- A) Apresentação dos resultados do BIOENSAIO comprovando que o produto em questão possui efeito bioativo positivo e estatisticamente quantificável.
- B) Revisão bibliográfica apontando resultados de pesquisas publicados ou apresentação de trabalhos específicos, demonstrando as situações e culturas para quais o produto será recomendado.

2. PRINCÍPIOS BÁSICOS DA EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA

Maiores informações sobre este tópico são encontradas em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/registro-estab-e-prod/registro-produtos/instrucoes-para-conducao-de-experimentos.pdf/view>

3. BIOENSAIOS:

3.1 CONCEITO:

Os **BIOFERTILIZANTES** são definidos na Legislação brasileira como: “produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante.”

A Literatura Científica Nacional e Internacional é bastante robusta sobre o assunto e permite concluir pela efetividade de vários produtos que vem sendo utilizados com sucesso no mundo todo há muitas décadas. Isto permitiu classificar alguns grupos de produtos que apresentam características e efeitos semelhantes entre si, que foram muito bem estudados e que tiveram seus efeitos bioativos benéficos comprovados.

Os **BIOFERTILIZANTES** que são produtos naturais, podem conter uma série de substâncias com atividade biológica. Desta forma se faz necessário utilizar testes eficazes e de rápida execução como os **BIOENSAIOS** para identificar e caracterizar a bioatividade, diretamente na planta nos

aspectos biométricos (crescimento das raízes, expansão das folhas, ontogenia) ou nas atividades fisiológicas e parâmetros bioquímicos da própria planta.

Conceitualmente, os **BIOENSAIOS** são definidos como um ensaio ou experimento científico com a função de investigar os efeitos de compostos biologicamente ativos, em um órgão isolado ou em um organismo vivo. É essencial para comprovação do efeito destes produtos podendo ser quantitativo ou qualitativo, dependendo do efeito que se quer demonstrar.

Deve ser comprovado que existe um efeito bioativo benéfico, que não seja diretamente devido ao nutriente contido nestes produtos, mas de sua fração orgânica, que atue de forma a proporcionar melhores condições para o aproveitamento dos recursos naturais como água e nutrientes, e/ou mitigando estresses abiótico, ou aumentando a eficiência dos fatores de produção.

O efeito destes produtos foi definido na Norma, de forma genérica, como “BIOATIVIDADE”, dando o entendimento que serão considerados BIOFERTILIZANTES aqueles produtos que apresentam algum efeito bioativo benéfico comprovado pela Ciência e que não tenham relação direta com o nutriente que eventualmente contenha, mas com sua fração orgânica, ou seja: “BIOATIVIDADE - efeito benéfico que o produto Biofertilizante apresenta sobre o todo ou partes das plantas cultivadas”. (item XXIV do artigo 2º da IN nº 61/2.020)

Em resumo, os **BIOFERTILIZANTES**, em seus diversos tipos ou grupos, necessariamente necessitam apresentar algum tipo de **BIOATIVIDADE**.

A Norma do MAPA, que é o documento legal, define o BIOENSAIO como “trabalho de pesquisa que tem por objetivo comprovar a **BIOATIVIDADE** dos BIOFERTILIZANTES”.

O objetivo dos **BIOENSAIOS** se resume em comprovar que um determinado produto, previamente classificado e que esteja enquadrado nos pré-requisitos de sua categoria, incluindo o processo de obtenção, apresenta o efeito bioativo ou fisiológico esperado já apontado pela literatura.

Assim, não se trata de desenvolver um estudo de caracterização e avaliação de produto novo, mas sim comprovar que o produto em teste, tem o efeito que a literatura já apontou e comprovou cientificamente, e que se enquadrem previamente nos parâmetros já existentes na NORMA LEGAL.

3.2 – CRITÉRIOS GERAIS PARA EXECUÇÃO DOS BIOENSAIOS:

3.2.1 - Condução em condições controladas:

A condução dos ensaios em condições controladas é fundamental, pois vai permitir medir os efeitos sem que os demais fatores de produção possam interferir nos resultados. Assim, os trabalhos devem ser conduzidos em laboratórios apropriados como câmaras de crescimento, podendo também ser realizados em casa de vegetação e/ou estufa como complemento ou em condições específicas que a metodologia adotada assim o permitir.

3.2.2 - Uso de técnica/modelos com plantas Indicadoras:

O uso de técnicas com plantas indicadoras é que vai permitir a melhor expressão dos efeitos estudados. As plantas recomendadas para serem usadas nos bioensaios são preferencialmente aquelas que apresentam ciclos curtos, metabolismo mais acelerado,

ou mesmo maior sensibilidade ao fator de resposta esperado, permitindo uma amplitude de resposta maior, ressaltando-se as especificidades ou particularidades dos bioensaios e as justificativas técnicas de cada situação. É importante que a planta indicadora seja referendada na literatura ou se utilize a cultura para a qual o produto será recomendado.

3.2.3 - Tratamentos:

Os tratamentos devem contemplar no mínimo: testemunha absoluta, dose recomendada e testemunha positiva, se houver. Mesmo não havendo testemunha positiva (definição dada pelo art. 38 da IN 53/2013. Se não houver testemunha positiva, pode ser usado produto semelhante às características do biofertilizante a ser testado.

3.2.4 - Presença de nutrientes no produto:

Tratando-se de **BIOFERTILIZANTE**, em todas as situações, deve-se atentar para a presença de qualquer nutriente que for constituinte habitual ou nutriente incorporado ao processo de obtenção do produto, de forma a planejar os tratamentos incluindo na testemunha positiva ou em produto semelhante, o fornecimento da mesma dose do nutriente presente no **BIOFERTILIZANTE**.

3.3 - AVALIAÇÕES:

Considerando a natureza particular dos diversos tipos de **BIOFERTILIZANTES** e levando em conta princípios básicos da experimentação agrônômica, conhecimentos de fertilidade do solo e de nutrição e fisiologia de plantas, as avaliações dos Bioensaios devem atender simultaneamente os seguintes objetivos:

- a) Testar na planta a capacidade do **BIOFERTILIZANTE**, independentemente do seu modo de aplicação, em alterar positivamente uma ou mais variáveis de respostas da cultura-alvo; e
- b) Demonstrar que o produto atua no crescimento, desenvolvimento(ontogenia), ou em variáveis da planta, direta ou indiretamente.

Com base no objetivo definido, a avaliação da produtividade, apesar de poder ser utilizada como parâmetro em algumas situações, não é a variável mais adequada para ser usada como fator comum a todos os tipos produtos como forma de comprovar a sua BIOATIVIDADE, uma vez que só mostrará o efeito final do **BIOFERTILIZANTE**.

No caso dos **BIOENSAIOS** deve-se avaliar outras variáveis (biométricas, bioquímicas, metabólicas, etc) para comprovar se o produto apresenta efeito específico em um ou mais dos mecanismos envolvidos na sua utilização, sendo específicos para cada grupo de produto, conforme apontados nos trabalhos de pesquisas publicados.

É fundamental que seja apresentada de forma clara a referência da literatura que ateste a recomendação da metodologia escolhida para a avaliação do efeito do produto.

3.4 - VARIÁVEIS DE RESPOSTA:

O produto deve atuar em uma ou mais variáveis que possam ser identificadas

3.4.1 - Parâmetros biométricos:

- altura;
- volume;
- área;
- número;
- biomassa;
- emergência;
- Outros parâmetros pertinentes às culturas e produto testado.

3.4.2 - Parâmetros metabólicos:

- atividade enzimática;
- síntese de enzimas;
- teores de compostos resultantes do metabolismo primário ou secundário das plantas;
- Outros parâmetros pertinentes às culturas e produto testado.

3.4.3 - Parâmetros químicos e bioquímicos:

- teores de nutrientes;
- concentração de proteínas;
- conteúdo clorofila;
- conteúdo de pigmentos;
- sólidos solúveis;
- acidez dos frutos;
- Outros parâmetros pertinentes às culturas e produto testado.

3.4.4 - Anti-estresse:

- presença de elementos tóxicos no solo que inibem o crescimento de raízes;
- déficit hídrico;
- térmico (calor e frio);
- radiação;
- salinidade;
- expressão diferencial de genes: ativação de genes responsivos a estresses e estímulos;

3.4.5 - Ontogenia:

- desenvolvimento radicular:
 - aumento das ramificações;
 - aumento da biomassa radicular;
- desenvolvimento e vigor de plântulas;
- aumento da biomassa da parte aérea;
- propagação assexuada: aumento no desenvolvimento;
- produtividade:
 - quantidade;
 - qualidade.
- aumento na absorção e translocação de nutrientes;
- germinação de sementes.

