



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 8 • número 2 • p 51-66

Avaliação ecotoxicológica para classificação de resíduos

A gestão apropriada dos resíduos tem um papel fundamental na preservação da saúde humana e do ambiente. Neste sentido, a avaliação das características de perigosidade em geral, e a HP 14 ("ecotóxico") em particular, é essencial para a classificação correta dos resíduos. Este artigo mostra como a legislação tem evoluído neste âmbito e apresenta as abordagens que têm sido propostas e seguidas para esta avaliação, sendo destacadas algumas vantagens e limitações. A nível da UE, foram fornecidas apenas orientações para uma avaliação baseada na composição química dos resíduos, as quais seguem o regulamento CLP (destinado a produtos químicos). Esta abordagem poderá não ser a mais apropriada para resíduos, uma vez que estes apresentam potencialmente composição variável. O recurso a baterias de testes biológicos (biotestes) pode ser uma abordagem mais adequada para complementar a classificação com critérios químicos. Contudo, ainda não existem recomendações claras a nível da UE para a avaliação experimental da HP 14, sendo fundamental definir a curto prazo os biotestes que devem ser considerados, e os correspondentes critérios de classificação. Uma abordagem que combine critérios químicos e biológicos poderá ser uma boa estratégia para superar as limitações de cada uma destas vias.

Palavras-chave

resíduos
características de perigosidade
ecotoxicidade
HP 14
avaliação química
biotestes

Beatriz Sales Bandarra¹

Joana Luísa Pereira²

Rui C Martins¹

Margarida J Quina¹•

¹ CIEPQPF - Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Portugal.

² Departamento de Biologia e CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Portugal.

• guida@eq.uc.pt

ISSN 1647-323X

INTRODUÇÃO

A proteção da saúde humana e do ambiente é a principal prioridade na escolha da metodologia mais adequada para a gestão de resíduos. Na verdade, a Diretiva 2008/98/CE (Diretiva-Quadro Resíduos europeia - DQR), alterada pela Diretiva (EU) 2018/851, obriga objetivamente a que “*Os Estados-Membros tomam as medidas necessárias para assegurar que a gestão de resíduos seja efetuada sem pôr em perigo a saúde humana nem prejudicar o ambiente*”. A DQR define “resíduos” como “quaisquer substâncias ou objetos de que o detentor se desfaz ou tem intenção ou obrigação de se desfazer”, sendo por isso a área dos resíduos de elevada complexidade e de difícil controlo, devido à heterogeneidade de materiais que podem constituir os fluxos de resíduos domésticos ou industriais.

Para executar corretamente a gestão dos resíduos é essencial distinguir os resíduos perigosos dos não perigosos. Além disso, devido à crescente produção de resíduos, a preocupação em estabelecer métodos para avaliar a sua perigosidade também tem vindo a crescer (Vaajasaari, 2005). Também em Portugal esta tendência se tem observado nos últimos anos, tendo sido produzidas aproximadamente 15 milhões de toneladas em 2016 (PORDATA, 2019). Na União Europeia (EU), a avaliação da perigosidade dos resíduos é realizada de acordo com (European Commission, 2018; BiPRO GmbH, 2015):

- A Lista Europeia de Resíduos (LER) estabelecida pela Decisão da Comissão 2000/532/CE, revista pela Decisão da Comissão 2014/955/EU;
- Anexo III da DQR, substituído pelo anexo publicado no Regulamento (UE) n.º 1357/2014 da Comissão.

A LER divide-se em 20 capítulos, de acordo com a composição e origem dos resíduos (APA, 2017) onde cada resíduo é identificado por um código de 6 dígitos, no qual os dois primeiros dígitos são referentes ao capítulo, os dois dígitos seguintes são referentes ao subcapítulo e os últimos dois dígitos são relativos ao resíduo em específico (APA, 2017). As 842 entradas da LER dividem-se em três tipos diferentes (APA, 2017):

- Entradas absolutas de resíduos perigosos: resíduos considerados perigosos sem necessidade de qualquer avaliação, estando os códigos identificados com um asterisco (*).
- Entradas absolutas de resíduos não perigosos: resíduos considerados não perigosos sem necessidade de qualquer avaliação.
- Entradas espelho: entradas relacionadas com resíduos que podem ser classificados como perigosos ou não perigosos, dependendo do resultado de uma avaliação.

De acordo com a DQR, “resíduos perigosos” são aqueles que exibem pelo menos uma das 15 características de perigosidade (HP - *Hazardous Properties*) identificadas no anexo III desta diretiva, que foi substituído pelo anexo do Regulamento (UE) n.º 1357/2014 da Comissão (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R1357&from=PT>). Desta forma, o anexo do Regulamento (UE) n.º 1357/2014 da Comissão apresenta as 15 características de perigosidade a ter em conta na classificação de resíduos, isto é, as propriedades dos resíduos que os tornam perigosos e que podem resultar em perigo físico, para a saúde humana ou para o ambiente (Tabela I).

TABELA I. Características de perigosidade dos resíduos de acordo com o anexo do Regulamento (UE) n.º 1357/2014 da Comissão.

Código	Característica de perigosidade	Descrição
HP 1	Explosivo	Resíduo suscetível de, por reação química, produzir gases a uma temperatura, uma pressão e uma velocidade tais que podem causar danos nas imediações. Incluem-se os resíduos de pirotecnia, os resíduos de peróxidos orgânicos explosivos e os resíduos autorreativos explosivos.
HP 2	Comburente	Resíduo que pode causar ou contribuir para a combustão de outras matérias, em geral por fornecimento de oxigénio.
HP 3	Inflamável	<ul style="list-style-type: none"> - Resíduo líquido inflamável:resíduo líquido cujo ponto de inflamação é inferior a 60 °C, ou resíduo de gasóleo, de combustível para motores <i>diesel</i> ou de petróleos para aquecimento doméstico cujo ponto de inflamação é superior a 55 °C mas não superior a 75 °C; - resíduo pirofórico inflamável líquido ou sólido:resíduo líquido ou sólido que, mesmo em pequenas quantidades, pode inflamar-se no prazo de cinco minutos após entrar em contacto com o ar; - resíduo sólido inflamável:resíduo sólido que entra facilmente em combustão ou que, através do atrito, pode causar ou contribuir para a combustão; - resíduo gasoso inflamável:resíduo gasoso inflamável ao ar à temperatura de 20 °C e à pressão normal de 101,3 kPa; - resíduo reativo à água:resíduo que, em contacto com água, emite gases inflamáveis em quantidades perigosas; - outros resíduos inflamáveis:aerossóis inflamáveis, resíduos inflamáveis por autoaquecimento, peróxidos orgânicos inflamáveis e resíduos autorreativos inflamáveis.
HP 4	Irritante - irritação cutânea e lesões oculares	Resíduo cuja aplicação pode causar irritação cutânea ou lesões oculares.
HP 5	Tóxico para órgãos-alvo específicos (STOT)/ tóxico por aspiração	Resíduo que pode causar toxicidade em órgãos-alvo específicos em resultado de uma exposição única ou repetida ou que causa efeitos tóxicos agudos por aspiração.
HP 6	Toxicidade aguda	Característica do resíduo que pode causar efeitos tóxicos agudos na sequência de administração oral ou cutânea ou de exposição por inalação.
HP 7	Cancerígeno	Resíduo que induz cancro ou aumenta a sua incidência.
HP 8	Corrosivo	Resíduo que, por aplicação, pode causar corrosão da pele.
HP 9	Infecioso	Resíduo que contém microrganismos viáveis ou suas toxinas, em relação aos quais se sabe ou há boas razões para crer que causam doenças nos seres humanos ou noutros organismos vivos.
HP 10	Tóxico para a reprodução	Resíduo que apresenta efeitos adversos na função sexual e na fertilidade de homens e mulheres adultos, bem como toxicidade sobre o desenvolvimento dos descendentes.
HP 11	Mutagénico	Resíduo que pode causar uma mutação, ou seja, uma alteração permanente da quantidade ou da estrutura do material genético de uma célula.
HP 12	Libertação de um gás com toxicidade aguda	Situação em que o resíduo, em contacto com água ou ácido, liberta gases caracterizados por toxicidade aguda (Tox. aguda 1, 2 ou 3).
HP 13	Sensibilizante	Resíduo que contém uma ou mais substâncias que, comprovadamente, têm efeitos sensibilizantes na pele ou no aparelho respiratório.
HP 14	Ecotóxico	Resíduo que representa ou pode representar um risco imediato ou diferido para um ou vários setores do ambiente.
HP 15	Resíduo suscetível de apresentar uma das características de perigosidade acima enumeradas não diretamente exibida pelo resíduo original.	-

Considera-se que a maioria das entradas perigosas na LER resultam da característica de perigosidade HP 14 (“ecotóxico”) (Hennebert 2018; Pandard et al., 2006), sendo por isso a avaliação desta propriedade de elevada relevância. De acordo com a Tabela I, a característica de perigosidade HP 14 é a base para determinar os potenciais impactos negativos dos resíduos no ambiente. A definição da metodologia para avaliar esta característica tem constituído um dos maiores desafios ao nível da legislação da UE. As abordagens entre Estados-Membros da EU têm diferido bastante, sendo necessárias linhas de orientação com critérios claros.

Em geral, as características de perigosidade podem ser avaliadas de acordo com a composição do resíduo em substâncias potencialmente perigosas ou de acordo com testes experimentais (Hennebert et al., 2014).

O presente trabalho tem como objetivo destacar as diferentes abordagens que têm sido estudadas e sugeridas para avaliar a ecotoxicidade de resíduos (HP 14), as suas vantagens e desvantagens e, ainda, identificar as principais variáveis que estão por definir neste âmbito.

LEGISLAÇÃO

A legislação é o principal motor para a gestão adequada de resíduos e, conseqüentemente, para salvaguardar a saúde humana e o ambiente. Na Tabela II encontra-se resumida a legislação mais importante neste contexto.

TABELA II. Principal legislação para a classificação de resíduos.

Documentos legislativos	Descrição
Decisão da Comissão 2000/532/CE (LER)	Apresenta uma lista harmonizada de resíduos a nível da UE, de acordo com a sua origem e composição, indicando as entradas absolutas perigosas e não perigosas e as entradas espelho.
Diretiva 2008/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho (DQR)	Estabelece o enquadramento legal para o tratamento dos resíduos na UE. O anexo III apresenta as características de perigosidade que tornam um resíduo perigoso.
Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho (CLP)	Relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas. Apesar de ser um documento relativo a produtos químicos, é utilizado como referência para a avaliação de HP 14, de acordo com o Regulamento (UE) 2017/997 do Conselho.
Decisão da Comissão 2014/955/EU	Altera a Decisão 2000/532/CE relativa à lista de resíduos em conformidade com a Diretiva 2008/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.
Regulamento (UE) n.º 1357/2014 da Comissão	Substitui o anexo III da Diretiva 2008/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, indicando as metodologias para avaliação das características de perigosidade (exceto HP 14).
Regulamento (UE) 2017/997 do Conselho	Altera o anexo III da Diretiva 2008/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativamente à característica de perigosidade HP 14 «Ecotóxico». Fornece uma metodologia de avaliação que se baseiam na composição química do resíduo e está alinhada com o CLP.
Diretiva (EU) 2018/851 do Parlamento Europeu e do Conselho	Altera a Diretiva 2008/98/CE relativa aos resíduos.
Comunicação da Comissão 2018/C 124/01	Fornece orientações técnicas sobre determinados aspetos da Diretiva 2008/98/CE e da Decisão 2000/532/CE da Comissão.

A revisão da legislação em matéria de resíduos em 2014, teve como objetivo a promoção de uma classificação harmonizada de resíduos perigosos entre os Estados-Membros (Stiernstrom et al., 2016), tendo por base a legislação da UE em matéria de produtos químicos, relacionada com a classificação, rotulagem e embalagem, designadamente o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho (CLP) (Hennebert et al., 2014). Quando o anexo III da DQR foi substituído pelo Regulamento (UE) n.º 1357/2014 da Comissão, foram fornecidas, neste Regulamento, as metodologias para avaliação de todas as características de perigosidade, com exceção da abordagem a adotar para HP 14.

Em 2017, o Regulamento (UE) 2017/997 do Conselho alterou o anexo III da Diretiva 2008/98/CE no que diz respeito à característica de perigosidade HP 14. De acordo com este documento, a metodologia para a avaliação da HP 14 não foi incluída no Regulamento (UE) n.º 1357/2014 da Comissão, uma vez que eram necessários estudos suplementares sobre o possível impacto de um alinhamento desta avaliação com o CLP. Contudo, o Regulamento (UE) 2017/997 estabeleceu que é adequado alinhar a avaliação da característica de perigosidade HP 14 com o CLP, indicando os valores-limite a aplicar nesta avaliação. Nesta abordagem, a ecotoxicidade é estimada utilizando fórmulas de cálculo e baseada na composição química do resíduo.

De acordo com a Decisão da Comissão 2014/955/UE, os resultados dos testes experimentais devem prevalecer sobre os resultados das fórmulas de cálculo baseadas na composição química. No entanto, não existe consenso no que diz respeito às abordagens experimentais a utilizar para avaliar a ecotoxicidade dos resíduos (Regulamento (UE) 2017/997 do Conselho). Recentemente, a Comunicação da Comissão 2018/C 124/01 evidenciou que a Comissão ainda não se encontra em condições de fornecer recomendações específicas sobre a abordagem a seguir com recurso a testes biológicos (biotestes). Deste modo, continua premente a necessidade de desenvolver e padronizar metodologias experimentais, e correspondentes critérios, para a avaliação da ecotoxicidade dos resíduos (Hennebert et al., 2014).



ABORDAGEM QUÍMICA

Atualmente, as orientações a nível da UE para avaliar a característica de perigosidade HP 14 assentam na metodologia prevista no CLP, que considera a classe/categoria de perigo e a advertência de perigo correspondente associadas à ecotoxicidade, como definido na Tabela III.

Segundo o CLP, “classe de perigo” define-se como “a natureza do perigo físico, para a saúde ou para o ambiente”, a “categoria de perigo” é definida como “a divisão de critérios no interior de cada classe de perigo, com especificação da gravidade do perigo” e a “advertência de perigo” como “uma advertência atribuída a uma classe e categoria de perigo que descreve a natureza dos perigos de uma substância ou mistura perigosa, incluindo, se necessário, o grau de perigo”. De acordo com as indicações que se seguem, a caracterização de perigosidade com base na propriedade HP14 é um processo integrado que, na prática, se desenrola conforme exemplificado na caixa 1.

TABELA III. Classe/categoria de perigo e advertência de perigo associadas à característica de perigosidade HP 14 (adaptado de Regulamento (CE) n.º 1272/2008).

Classe/categoria de perigo	Código da advertência de perigo	Advertência de perigo	Valores limite (cada substância)
Toxicidade aguda aquática	H 400	Muito tóxico para os organismos aquáticos.	0,1%
Tox. crónica aquática 1	H 410	Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.	0,1%
Tox. crónica aquática. 2	H 411	Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.	1%
Tox. crónica aquática 3	H 412	Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.	1%
Tox. crónica aquática 4	H 413	Pode provocar efeitos nocivos duradouros nos organismos aquáticos.	1%
Perigosa para a camada de ozono 1	H 420	Prejudica a saúde humana e o ambiente ao destruir a camada de ozono da estratosfera.	-

Para aplicação das fórmulas de cálculo incluídas no Regulamento (UE) 2017/997 do Conselho, deve-se ter em conta o valor-limite de cada substância e a concentração limite indicada no regulamento. De acordo com o CLP “valor-limite” é “um limiar acima do qual a presença de uma impureza, aditivo ou constituinte individual classificados numa substância ou mistura deve ser tida em conta para determinar se a substância ou mistura em causa deve ser classificada” e “limite de concentração” é “um limiar a partir do qual a presença de uma impureza, aditivo ou constituinte individual classificados numa substância ou mistura pode desencadear a classificação da substância ou mistura em causa”.

Assim, de acordo com o método de cálculo descrito no Regulamento (UE) 2017/997 do Conselho, os resíduos devem ser considerados perigosos relativamente a HP 14 ao verificar-se qualquer uma das seguintes condições (sendo c = concentração [% w/w]):

- O resíduo contém uma substância com o código H420 e a sua concentração é igual ou superior ao limite de concentração de 0,1%:

$$c \text{ (H420)} \geq 0,1\% \tag{1}$$

- O resíduo contém uma ou mais substâncias classificadas com o código H400 e a soma das suas concentrações é igual ou superior ao limite de concentração de 25%:

$$\sum c \text{ (H400)} \geq 25\% \tag{2}$$

Um valor-limite de 0,1% é aplicado a estas substâncias.

- O resíduo contém uma ou mais substâncias com os códigos H410, H411 ou H412 e a soma das concentrações de todas as substâncias com código H410 multiplicadas por 100, somadas à soma de todas as concentrações de substâncias com código H411 multiplicadas por 10, somadas à soma da concentração de todas as substâncias com código H412 é igual ou superior ao limite de concentração de 25%:

$$100 \times \sum c \text{ (H410)} + 10 \times \sum c \text{ (H411)} + \sum c \text{ (H412)} \geq 25\% \tag{3}$$

Um valor-limite de 0,1% é aplicado a substâncias com o código H410 e um valor-limite de 1% é aplicado a substâncias com os códigos H411 ou H412.

- O resíduo contém uma ou mais substâncias com os códigos H410, H411, H412 ou H413 e a soma das suas concentrações é igual ou superior ao limite de concentração de 25%:

$$\sum c \text{ (H410)} + \sum c \text{ (H411)} + \sum c \text{ (H412)} + \sum c \text{ (H413)} \geq 25\% \tag{4}$$

Um valor-limite de 0,1% é aplicado a substâncias com o código H410 e um valor-limite de 1% é aplicado a substâncias com os códigos H411, H412 ou H413.

Esta metodologia estabelece uma relação entre a ecotoxicidade dos resíduos e a dos produtos que lhes dão origem de modo a considerar todas as substâncias potencialmente perigosas que compõem o resíduo (APA, 2017). No entanto, o CLP refere-se a substâncias puras e a misturas de substâncias puras, enquanto que os resíduos são, geralmente, misturas complexas de diversas substâncias com composição variável no tempo e no espaço (Hennebert et al., 2014) e, muitas vezes, não é possível identificar nem quantificar todas estas substâncias (Wahlström et al., 2016). A composição dos resíduos é frequentemente estimada em termos de elementos (Hennebert et al., 2014) e a sua especificação química no resíduo é, geralmente, desconhecida. Por esse motivo, é presumido o “cenário do pior caso possível”, considerando que os elementos se encontram no resíduo na forma química com pior impacto ambiental (Hennebert et al., 2014), tendo em conta todas as substâncias relacionadas com ecotoxicidade de acordo com a classificação harmonizada que consta no Quadro 3.1 do anexo VI do CLP. Além disso, este método está limitado pela disponibilidade de classificações harmonizadas para as substâncias (BIO by Deloitte, 2015). Esta suposição conservadora resulta, frequentemente, na sobrestimação da ecotoxicidade dos resíduos. Outra limitação desta abordagem, é o facto de não ser realista considerar a concentração total do elemento na avaliação, uma vez que na prática não existe a dissolução total da matriz mineral sólida no ambiente (Manskinen et al., 2011; Nurmesniemi et al., 2005). Adicionalmente, existe dificuldade em identificar substâncias orgânicas em resíduos e, portanto, uma fração do resíduo pode não ser contabilizada na estimativa da ecotoxicidade, podendo resultar na sua subestimação (BIO by Deloitte, 2015).

Importa salientar que a principal vantagem deste tipo de avaliação é o seu baixo custo comparativamente a abordagens que incluem biotestes, que podem abranger baterias com diversos organismos e parâmetros.

CAIXA 1. Exemplo ilustrativo de classificação com base na composição química.

A metodologia de classificação com base na composição química pode ser exemplificada através de um resíduo hipotético com a composição indicada na Tabela IV.

TABELA IV. Caracterização da perigosidade das substâncias (Subst.) presentes num dado resíduo (exemplo ilustrativo).

Subst.	Classe/categoria de perigo	Código de advertência	Concentração no resíduo (%)
V	Tox. aquática crónica 1	H410	0,05
W	Tox. aquática crónica 1	H410	0,15
X	Tox. aquática crónica 2	H411	1,8
Y	Tox. aquática crónica 2	H411	1,7
Z	Tox. aquática crónica 3	H412	2

Uma vez que para a classe de toxicidade aquática crónica 1 é considerado um valor limite de 1%, a substância V não é considerada na avaliação de HP 14. Para as restantes substâncias aplica-se a Equação (3) indicada no Regulamento (UE) 2017/997 do Conselho:

$$100 \times \sum_c (H410) + 10 \times \sum_c (H411) + \sum_c (H412) = 52\%$$

Como o resultado é superior ao limite de concentração de 25% indicado no Regulamento, então o resíduo é ecotóxico, e, portanto, perigoso devido à propriedade HP 14.

ABORDAGEM BIOLÓGICA

Testes ecotoxicológicos

O termo “ecotoxicologia” foi definido por Truhaut (1969) como “o ramo da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos das substâncias, naturais e artificiais, sobre os organismos vivos, animais ou vegetais, aquáticos ou terrestres, que constituem a biosfera” (www.apambiente.pt/_zdata/LRA/Ecotoxicologia.pdf; acessido em março de 2019).

Os testes ecotoxicológicos baseiam-se na resposta de organismos a amostras com diferentes concentrações das substâncias em análise. Assim, estes testes descrevem uma relação concentração-resposta, de acordo com a qual um efeito biológico é medido (Hennebert, 2018; Pinheiro, 2010). Estes testes experimentais podem ser agudos (de curta duração, em relação à vida útil do organismo testado) ou crónicos (longa duração, incluindo parte ou todo o ciclo de vida do organismo).

Uma vez que cada espécie apresenta uma sensibilidade diferente a diferentes tipos de substâncias, é incorreto extrapolar a resposta de uma espécie para outra. Por este motivo, é recomendada a utilização de uma bateria de testes, incluindo testes em matriz aquosa e testes em solo com organismos de diferentes níveis tróficos/funcionais, considerando diferentes tipos de efeitos (p.ex. fisiológico e comportamental) e diferentes cenários de exposição (p.ex. curto e longo prazo), de modo a obter resultados mais fiáveis (Costa et al., 2008; Moser e Römbke, 2009).

Para realizar os testes com organismos aquáticos com resíduos sólidos, é necessário realizar lixiviação dos resíduos para obter extratos aquosos. Neste processo, existe contato entre um sólido e um líquido sob condições pré-definidas, ocorrendo a mobilização parcial ou total de certas espécies químicas para a fase aquosa (Manskinen et al., 2011; Quina, 2005). A solução produzida no ambiente é denominada lixiviado, enquanto a solução obtida em laboratório, que pretende mimetizar o lixiviado, é denominada eluato (Quina, 2005).

Os organismos selecionados para ensaios ecotoxicológicos devem ter um conjunto de características específicas, designadamente elevada e constante sensibilidade a diferentes poluentes, disponibilidade e abundância, facilidade de cultivo e adaptação a condições laboratoriais, uniformidade e estabilidade genética das populações laboratoriais, representatividade relativamente ao seu nível trófico/funcional e, idealmente, relevância considerando o compartimento ambiental focado (Costa et al., 2008; Lapa et al., 2002).

Os resultados das avaliações ecotoxicológicas são geralmente traduzidos na forma de um (ou mais) dos seguintes parâmetros:

- LID (menor diluição ineficaz) - menor valor do fator de diluição para o qual o teste indica uma redução relevante da ecotoxicidade (ISO 17616 (2008)).
- EC_x (concentração de efeito) - concentração que causa um efeito de x% num determinado parâmetro (Hennebert, 2018; Tisler e Zagorc-Koncan, 2002). Frequentemente, apresenta-se o EC₅₀, isto é, a concentração para a qual o parâmetro em análise é negativamente afetado em 50% (Lowe e Balis, 2007).

- LC₅₀ (concentração letal) - concentração que causa a morte de 50% dos organismos expostos (APA, 2017).
- NOEC (concentração de efeito não observado) - concentração máxima para a qual nenhum efeito é mensurável (APA, 2017; Wilke et al., 2008).
- LOEC (concentração com menor efeito observado) - menor concentração na qual um efeito causado pela amostra é medido (Wilke et al., 2008).

Bateria de biotestes para avaliação de HP 14

Os testes experimentais de ecotoxicidade têm em conta os efeitos de todas as substâncias, as suas potenciais interações (aditivas, sinérgicas e antagónicas), e a fração do resíduo que está disponível para os organismos internalizarem ou detetarem (biodisponível) (Wilke et al., 2008; BIO by Deloitte, 2015). Assim, os biotestes são relevantes para a avaliação de resíduos com matrizes complexas, contendo substâncias cuja determinação é muito difícil ou impossível por meio de análises químicas (BIO by Deloitte, 2015). Esta abordagem é, provavelmente, mais esclarecedora da resposta da biota aos resíduos depositados no ambiente. Apesar do reconhecimento generalizado do valor dos biotestes neste contexto e da sua exequibilidade prática, ainda não existe consenso em relação aos testes biológicos que devem ser realizados para a avaliação da característica de perigosidade HP 14, embora algumas baterias de biotestes tenham sido propostas (Pandard et al. 2006; Moser e Römbke 2009; Römbke et al. 2009; Pandard e Römbke 2013; Huguiet et al. 2015). Uma vez que não existe acordo regulamentar em relação aos biotestes a realizar, há divergências nos diferentes estudos que têm sido publicados sobre esta temática (Römbke et al., 2009). Neste contexto, na Tabela V são apresentadas algumas das propostas de baterias para a avaliação ecotoxicológica de resíduos. De facto, também sob um ponto de vista regulamentar, também não existem diretrizes a nível da UE, alguns Estados Membros (República Checa, França, Espanha e Alemanha) usam baterias diferentes para avaliar HP 14 (Tabela VI) (BIO by Deloitte, 2015). Um resíduo é considerado perigoso de acordo com valores limite específicos para cada bioteste (BIO by Deloitte, 2015). Em França e na Alemanha, apesar da característica de perigosidade HP 14 ser avaliada usando testes aquáticos e terrestres, os últimos só são realizados se nos primeiros forem obtidos resultados questionáveis. Embora na República Checa apenas sejam realizados testes aquáticos, a comunidade científica aconselha a que se realizem testes terrestres (BIO by Deloitte, 2015). Por outro lado, no Reino Unido e na em Itália a avaliação de HP 14 com biotestes é restringida uma vez que se considera que estes levantam preocupações éticas. No entanto, as espécies testadas nos Estados Membros que consideram os biotestes na avaliação de HP 14 não são abrangidas pela Diretiva 2010/63/UE, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos, com exceção do peixe *Poecilia reticulata*, utilizado na República Checa.

TABELA V. Propostas de baterias de biotestes para avaliação da ecotoxicidade em resíduos.

Referência	Tipo de resíduo	Ambiente de teste	Tipo de teste	Método	Razão L/S (Líquido/Sólido)	Expressão de resultados	Conclusões
Römbke et al., 2009	Cinzas de incineração municipal	Aquático	Teste de inibição do crescimento com <i>Desmodesmus subspicatus</i> e <i>Raphidocelis subcapitata</i>	ISO 8692 (2004)	10:1 (DIN 38414-4)	LID	<ul style="list-style-type: none"> - Os testes terrestres foram mais sensíveis que os aquáticos. - Foi observada pouca variação na sensibilidade dos testes, portanto a bateria de testes não deve ser reduzida. - Nenhuma correlação foi observada entre a concentração de substâncias e os efeitos nos seres vivos. - A avaliação de HP 14 deve ser feita combinando métodos químicos e biológicos. - Biotestes permitem uma melhor avaliação do perigo dos resíduos para o ambiente comparativamente à abordagem que considera apenas as concentrações de substâncias químicas.
			Teste de imobilização com <i>Daphnia magna</i>	ISO 6341 (1996)			
			Teste de inibição da bioluminescência com <i>Allivibrio fischeri</i>	ISO 11348-1 (2005)			
		Terrestre	Teste da diminuição da biomassa com <i>Avena sativa</i> e <i>Brassica napus</i>	ISO 11269-2 (1995)	-		
			Teste de mortalidade com <i>Eisenia fetida</i>	ISO 11268-1 (1997)			
			Teste de inibição da atividade enzimática com <i>Arthrobacter globiformis</i>	DIN 38412-L48 (2002)			
Pandard et al., 2006	Diferentes resíduos urbanos e industriais	Aquático	Teste de inibição da bioluminescência com <i>A. fischeri</i>	NF EN ISO 11348-3	10:1 (EN 14735)	EC ₅₀	<ul style="list-style-type: none"> - Uma bateria de biotestes com <i>P. subcapitata</i>, <i>L. sativa</i>, <i>D. magna</i>, <i>C. dubia</i>, <i>E. fetida</i>, e <i>A. fischeri</i> é aplicável na avaliação de HP 14. - O número de testes pode ser reduzido sem alterar a tipologia dos resíduos. Neste caso, a bateria <i>A. fischeri</i>, <i>C. dubia</i> e <i>L. sativa</i> representa o melhor compromisso entre estimar a ecotoxicidade e reduzir custos. - Para a seleção da bateria de biotestes é importante realizar análises multivariadas.
			Teste de inibição do crescimento com <i>R. subcapitata</i>	NF T 90-375		EC ₂₀	
			Teste de imobilização com <i>D. magna</i>	NF EN ISO 6341		EC ₅₀	
			Teste de inibição da reprodução com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	NF T 90-376		EC ₂₀	
		Terrestre	Teste de efeitos dos químicos na emergência e no crescimento com <i>Lactuca sativa</i>	ISO 11269-2	-	EC ₅₀	
			Teste de mortalidade com <i>E. fetida</i>	ISO 11268-1			
Wahlström et al., 2016	Lamas residuais municipais	Aquático	Teste de inibição da bioluminescência com <i>A. fischeri</i>	ISO 11348-3	10:1 (EN 12457-2)	EC ₅₀ e LID	<ul style="list-style-type: none"> - Em todas as amostras, pelo menos um teste teve um resultado desfavorável. - Deve ser considerada uma hierarquia de biotestes e recetores que devem ser protegidos. - Ainda existem muitos aspetos a serem definidos na avaliação da ecotoxicidade de resíduos.
			Teste de inibição do crescimento com <i>D. subspicatus</i> ou <i>R. subcapitata</i>	ISO 8692			
			Teste de imobilização com <i>D. magna</i>	ISO 6341			
		Terrestre	Teste de efeitos na emergência e no crescimento com <i>A. sativa</i> e <i>B. napus</i>	ISO 11296-2:2013	-		

TABELA V (Cont.). Propostas de baterias de biotestes para avaliação da ecotoxicidade em resíduos.

Referência	Tipo de resíduo	Ambiente de teste	Tipo de teste	Método	Razão L/S (Líquido/Sólido)	Expressão de resultados	Conclusões
Pandard e Römcke, 2013	(Esta proposta é baseada em resultados de diferentes estudos)	Aquático	Teste de inibição da bioluminescência com <i>A. fischeri</i>	ISO 11348-3 (2007)	10:1 (EN 12457-2)	EC ₅₀ ou LID	<ul style="list-style-type: none"> - Para avaliar HP 14, é proposta uma estratégia que combina uma abordagem química (de acordo com o CLP) e uma abordagem biológica (biotestes). - Esta proposta tem por base as recomendações e resultados de vários estudos sobre a caracterização ecotoxicológica dos resíduos. - É possível fazer uma distinção entre resíduos perigosos e não perigosos independentemente de se considerar EC₅₀ ou LID. - É proposto que se considere esta abordagem na definição dos critérios legais para avaliação de HP 14.
			Teste de inibição do crescimento com <i>D. subspicatus</i> e <i>R. subcapitata</i>	ISO 8692 (2012)			
			Teste de imobilização com <i>D. magna</i>	ISO 6341 (2012)			
		Terrestre	Teste de contacto com solo com <i>A. globiformis</i>	ISO/WD 18187 (2012)	-		
			Teste de efeitos dos químicos na emergência e crescimento de plantas superiores com <i>B. napus</i> e <i>A. sativa</i>	ISO 11269-2 (2012)	-		
		Teste de evitamento (avoidance) com <i>E. andrei</i> ou <i>E. fetida</i>	ISO 17512-1 (2007)				
Huguier et al., 2015	Diferentes resíduos orgânicos	Aquático	Teste de inibição da bioluminescência com <i>A. fischeri</i>	ISO 11348-3	10:1 (ISO/TS 21268-2)	Percentagens médias de efeito relativamente ao controlo	<ul style="list-style-type: none"> - Os organismos terrestres (principalmente plantas e minhocas) foram os mais sensíveis e relevantes para avaliar resíduos orgânicos, comparativamente aos biotestes aquáticos usados nesta abordagem. - Pode ser proposta uma estratégia experimental mínima que inclua um teste de inibição do crescimento das raízes, um teste de inibição do crescimento inicial em plantas superiores (<i>A. sativa</i> e <i>B. rapa</i>) e um teste com minhocas (teste de evitamento ou teste de reprodução).
			Teste de inibição do crescimento com <i>R. subcapitata</i>	ISO 8692			
			Teste de inibição de reprodução com <i>Brachionus calyciflorus</i>	ISO 20666			
			Teste de imobilização com <i>D. magna</i>	ISO 6341			
		Terrestre	Teste de efeitos tóxicos no crescimento, fertilidade e reprodução com <i>Caenorhabditis elegans</i>	ISO 10872			
			Teste de inibição do crescimento da raiz com <i>A. sativa</i>	ISO 11269-1			
			Teste de inibição na emergência e crescimento com <i>B. napus</i> e <i>A. sativa</i>	ISO 11269-2			
			Teste de evitamento com <i>E. fetida</i>	ISO 17512-1	-		
			Teste de efeitos na reprodução com <i>E. fetida</i>	ISO 11268-2			
		Teste de efeitos tóxicos no crescimento, fertilidade e reprodução com <i>Caenorhabditis elegans</i>	Melhoria da ISO 10872 (Huguier et al., 2013)				

TABELA VI. Baterias de biotestes utilizadas em diferentes Estados Membros para avaliar HP 14 (Adaptado de BIO by Deloitte 2015).

Estado Membro	Testes aquáticos		Testes terrestres	
	Organismo	Norma	Organismo	Norma
República Checa	<i>Daphnia magna</i> <i>Sinapsis alba</i> <i>Desmodesmus subspicatus</i> <i>Poecilia reticulata</i>	ISO 6341 Diretrizes checas ISO 8692 ISO 7346-2	Nenhum	-
França (estratégia inicial)	<i>Daphnia magna</i> (agudo) <i>Aliivibrio fischeri</i> <i>Raphidocelis subcapitata</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i> <i>Brachionus calyciflorus</i>	ISO 6341 ISO 11348-3 NF EN ISO 8692 NF ISO 20665 NF ISO 20666	<i>Eisenia fetida</i> (agudo) <i>Lactuca sativa</i>	ISO 12 268-1 ISO 11269-2
França (estratégia híbrida combinando estratégia inicial e estratégia alemã)	<i>Daphnia magna</i> (agudo) <i>Aliivibrio fischeri</i> <i>Raphidocelis subcapitata</i>	ISO 6341 ISO 11348-3 NF EN ISO 8692	<i>Eisenia fetida</i> (evitamento) <i>Avena sativa</i> / <i>Brassica rapa</i> <i>Arthrobacter globiformis</i>	ISO 17512-1 ISO 11269-2 ISO/DIS 18187
Espanha	<i>Aliivibrio fischeri</i> ou <i>Daphnia magna</i>	ISO 11348 ISO 6341	Nenhum	-
Alemanha	<i>Daphnia magna</i> (agudo) <i>Daphnia magna</i> (crónico) <i>Aliivibrio fischeri</i> <i>Raphidocelis subcapitata</i> / <i>Desmodesmus subspicatus</i> <i>Lemna minor</i>	ISO 6341 ISO 10706 ISO 11348-1/2/3 NF EN ISO 8692 ISO 20079	<u>Primeira versão</u> <i>Eisenia fetida</i> (crónico) <i>Brassica rapa</i> <i>Arthrobacter globiformis</i> <u>Segunda versão</u> <i>Eisenia fetida</i> (crónico) <i>Brassica rapa</i> <i>Arthrobacter globiformis</i> <i>Folsomia candida</i> (crónico)	ISO 12 268-1 ISO 11269-2 ISO/DIS 18187 ISO 12 268-1 ISO 11269-2 ISO/DIS 18187 ISO 11267

Entre as várias propostas e abordagens regulamentares, a microalga verde *Raphidocelis subcapitata*, a pulga-de-água *Daphnia magna* e a bactéria luminescente *Aliivibrio fischeri* são os organismos mais frequentemente sugeridos para testes representativos dos ecossistemas aquáticos, enquanto que as plantas *Avena sativa* e *Brassica napus*, a minhoca *Eisenia fetida* e a bactéria *Arthrobacter globiformis* são os organismos mais vezes sugeridos em testes de contacto com o solo. Estes organismos foram assim considerados no único exercício internacional de calibração de testes feito no sentido de validar uma proposta para uma bateria de biotestes relevante na avaliação da HP14. Este exercício (*ring test*) foi realizado por 60 laboratórios em 15 países, em conformidade com a norma europeia EN 14735 (2005), como se mostra na Tabela VII (Moser e Römbke, 2009). Três tipos de resíduos representativos foram testados: cinzas de incineração contaminadas com metais pesados, solo com alta concentração de contaminantes orgânicos (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos) e resíduo de madeira preservada contendo cobre e outros metais pesados. Os resultados dos biotestes foram expressos em termos de EC₅₀. Simultaneamente, foi também realizada uma caracterização química dos resíduos. No essencial, com este *ring test* confirmou-se que a avaliação da ecotoxicidade dos resíduos deve combinar análises químicas e biológicas, verificou-se que os organismos mais sensíveis aos resíduos testados foram *D. magna* e *R. subcapitata* e concluiu-se que a bateria básica de biotestes (Tabela VII) parece adequada para a avaliação de HP 14, substituindo o teste de mortalidade com minhocas por outro teste com invertebrados de solo que seja mais sensível (teste de evitação com minhocas ou teste de contacto com *A. globiformis*). Ainda assim, uma das recomendações a destacar foi a de que a análise detalhada dos resultados dos testes poderá

permitir uma identificação mais assertiva da bateria de testes mais adequada para cada tipo de resíduo que possa ser sujeito a avaliação.

TABELA VII. Bateria de biotestes utilizada no *ring test* internacional (Moser e Römbke, 2009). Os processos de lixiviação, nos testes realizados em ambiente aquático, seguiram a norma europeia EN 14735 (razão L/S = 10 L/kg).

Bateria de testes	Ambiente de teste	Tipo de teste	Método
Básica	Aquático	Teste de inibição da bioluminescência com <i>A. fischeri</i> Teste de inibição do crescimento com <i>R. subcapitata</i> Teste de imobilização com <i>D. magna</i>	ISO 11348-1/2 (2005) ISO 8692 (2004) ISO 6341 (1996)
	Terrestre	Teste de mortalidade com <i>E. fetida</i> e <i>E. andrei</i> Teste de inibição da emergência e crescimento com <i>A. sativa</i> e <i>B. napus</i>	ISO 11268-1 ISO 11269-2
Adicional	Aquático	Teste de inibição do crescimento com <i>L. minor</i>	ISO 20079 (2004)
		Teste de inibição do crescimento populacional com <i>Brachionus calyciflorus</i>	ISO/CD 20666 (2007)
		Teste de inibição do crescimento com <i>Pseudomonas putida</i>	ISO 10712 (1995)
		Teste de inibição da reprodução com <i>C. dubia</i>	AFNOR 90-376 (2000)
	Terrestre	Teste de indução do gene umuC (genotoxicidade) com <i>Salmonella typhimurium</i>	ISO 13829 (2000)
		Teste de inibição da reprodução com <i>Folsomia candida</i>	ISO 11267 (1999)
Terrestre	Teste de inibição da reprodução com <i>E. fetida</i> e <i>E. andrei</i>	ISO 11268-2 (1998)	
	Teste de inibição da reprodução com <i>Enchytraeus albidus</i> e <i>E. crypticus</i>	ISO 16387 (2004)	
	Teste de evitamento com <i>E. fetida</i> e <i>E. andrei</i>	ISO 17512-1 (2006)	
	Teste de inibição da atividade da desidrogenase (teste de contato) com <i>A. globiformis</i>	DIN 38412-48 (2002)	

O teste padronizado com *Daphnia magna* é o único utilizado em todos os Estados Membros acima referidos. No entanto, são considerados diferentes valores limite (BIO by Deloitte, 2015). De facto, não existem ainda limites fixos, para definir se um resíduo deve ser considerado ecotóxico, neste caso, embora alguns critérios tenham sido propostos (French Ministry of the Environment, 1998, em Lapa et al., 2002, e Barbosa et al., 2009; Pandard e Römbke 2013; BIO by Deloitte, 2015; Hennebert, 2018). A falta de valores limite legalmente fixados e normalizados é, atualmente, uma das principais barreiras na avaliação de HP 14 através de biotestes. Têm também sido realizados alguns estudos em Estados Membros com o objetivo de obter valores limite tendo em conta as entradas absolutas não perigosas da LER (BIO by Deloitte, 2015). Esta variabilidade de critérios é visível, por exemplo, no teste com *Daphnia magna* realizado em diferentes Estados Membros, como mostra a Tabela VIII.

TABELA VIII. Critérios considerados no teste com *Daphnia magna*, em diferentes Estados Membros que consideram biotestes na avaliação de HP 14 (Adaptado de BIO by Deloitte, 2015).

	Norma	Duração do teste	Expressão de resultados	Valor limite
França		24 h ou 48 h		10% (v/v)
Espanha				750 mg/L*
Alemanha	ISO 6341	48 h	EC ₅₀	10% (v/v)
República Checa				10 mL/L* (ou seja, 1% v/v)

* Os limites estabelecidos em mg/L e mL/L são indissociáveis dos protocolos de preparação dos eluatos uma vez que estão relacionados com a razão L/S usada na lixiviação do resíduo e apenas têm um significado quando expressos em termos do próprio eluato.

Para ilustrar a forma como se pode efetuar a classificação da característica de perigosidade HP14 com base em biotestes, apresenta-se um exemplo fictício na caixa 2. Este exemplo foca-se no teste de imobilização com *Daphnia magna*, sendo transponível para qualquer tipo de teste ou bateria de testes que se convençione utilizar. Também tem em conta o limite (em termos de concentração que promove um determinado nível de efeito fixado *a priori*) a partir do qual um resíduo é considerado perigoso adotado num país europeu em particular, algo que pode sofrer ajustes de acordo com a regulamentação de cada país (Tabela VIII).

Diferentes especialistas têm recomendado uma abordagem combinada, englobando análises químicas e biológicas, para compensar as limitações de ambas as abordagens e, assim, classificar os resíduos o mais adequadamente possível. Contudo, é fundamental a definição de uma bateria mínima de testes bem como de valores limites harmonizados para a avaliação de HP 14, a nível da UE (BIO by Deloitte, 2015). Apesar de as análises químicas contribuírem para a interpretação dos resultados, os biotestes devem ser priorizados quando se trata de resíduos com matrizes complexas (BIO by Deloitte, 2015).

CAIXA 2. Exemplo ilustrativo de classificação com base em biotestes.

Tendo em conta a bateria de testes realizada em França (estratégia híbrida), pretende-se avaliar a característica de perigosidade HP 14 de um determinado resíduo. Os resultados de um teste de imobilização com *Daphnia magna* são apresentados na Figura 1. Para a realização do teste em ambiente aquático considerou-se que os eluatos foram obtidos usando uma razão L/S = 10 L/kg e que, posteriormente, foram realizadas diluições, obtendo-se as seguintes concentrações do eluato nas amostras de teste: 12,5%, 25%, 50% e 100%.

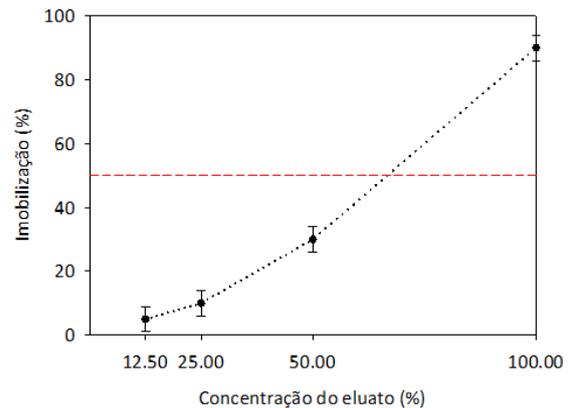


FIGURA 1. Resultados de um teste de imobilização com *Daphnia magna* (exemplo ilustrativo, considerando um resíduo fictício).

Com base nestes resultados, o EC_{50} é igual a 52%. Uma vez que é superior ao limite considerado neste Estado Membro (10%), se a classificação for feita com base no organismo mais sensível, então, de acordo com os resultados deste bioteste, o resíduo em causa é considerado ecotóxico e, logo, perigoso.

CONCLUSÕES

A avaliação da característica de perigosidade HP 14 (“ecotóxico”) é crucial para os resíduos sejam classificados, e posteriormente, geridos, de forma a evitar riscos para o ambiente.

Na UE, esta avaliação tem sido um dos principais desafios no âmbito da legislação na área dos resíduos. Atualmente existem recomendações para uma avaliação baseada na composição química dos resíduos e de acordo com o CLP (regulamento referente a produtos químicos), faltando orientações para uma avaliação experimental baseada em testes biológicos.

Os resíduos apresentam, usualmente, uma composição variável no tempo e no espaço, contrariamente aos produtos químicos. A avaliação baseada exclusivamente na abordagem química pode resultar, por um lado, na sobrestimação da ecotoxicidade, ao considerar o “cenário do pior caso possível” e, por outro, na sua subestimação, uma vez que não considera, por exemplo, as interações entre as substâncias presentes no

resíduo. A inclusão de uma abordagem biológica na avaliação de HP 14 é, desta forma, fundamental para uma melhor compreensão do comportamento dos resíduos no ambiente, sendo, provavelmente, mais representativa. Assim, é extremamente importante estabelecer uma bateria de biotestes mínima a ser utilizada bem como os critérios que deverão ser tidos em conta, para a avaliação da característica de perigosidade HP 14, a nível da UE.

Uma abordagem integrada, combinando análises químicas e biológicas, poderá ser útil para superar as limitações de ambas as abordagens. Os resultados dos biotestes deverão prevalecer sobre os resultados da análise química, uma vez que, provavelmente, serão obtidos resultados mais realistas do ponto de vista da proteção ambiental. No entanto, a inclusão de análises químicas poderá facilitar a interpretação dos resultados obtidos nos biotestes.

agradecimentos • Agradecimentos são devidos aos Projetos Estratégicos do CIEQPF e do CESAM (UID/QUE/00102/2013 e UID/AMB/50017/2019, respetivamente), financiados pela FCT/MEC através dos fundos nacionais. J.L. Pereira é financiada por fundos nacionais (OE) através da FCT (art.º 23 no DL 57/2016, alterado pela Lei 57/2017). Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto “Dry2Value - Estudo e desenvolvimento de um sistema de secagem para valorização de lamas”. Consórcio do projeto com HRV e LenaAmbiente. POCI-01-0247-FEDER-033662. Financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APA (2017). Guia de Classificação de Resíduos. Agência Portuguesa do Ambiente. Lisboa.
- Barbosa, R., Lapa, N., Boavida, D., Lopes, H., Gulyurtlu, I., Mendes, B. (2009). Co-combustion of coal and sewage sludge: chemical and ecotoxicological properties of ashes. *Journal of Hazardous Materials*, 170: 902-909.
- BIO by Deloitte (2015). Study to assess the impacts of different classification approaches for hazard property "HP 14" on selected waste streams – Final report. Prepared for the European Commission (DG ENV), in collaboration with INERIS.
- BiPRO GmbH. (2015). Study to develop a guidance document on the definition and classification of hazardous waste – Final Report. Prepared for the European Commission.
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R., Espindola, E. L. G. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p.1820-1830.
- European Commission. (2018). The European List of Waste. [acedido a 30 de maio de 2018]. Disponível em <http://ec.europa.eu/environment/waste/framework/list.htm>
- French Ministry of the Environment/Directorate for Pollution Prevention and Risk Control, CEMWE - Criteria and Evaluation Methods for Waste Ecotoxicity, Paris, France, 1998.
- Hennebert, P., Sloot, H.A., Rebuschung, F., Weltens R. and Geerts, L. (2014). Hazard property classification of waste according to the recent propositions of the EC using different methods. *Waste Management*, 34: 1739-1751.
- Hennebert, P. (2018) Proposal of concentration limits for determining the hazard property HP 14 for waste using ecotoxicological tests. *Waste Management*, 74: 74–85.
- Huguiet, P., Manier, N., Méline, C., Bauda, P., Pandard, P. (2013). Improvement of the *Caenorhabditis elegans* growth and reproduction test to assess the ecotoxicity of soils and complex matrices. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32: 2100–2108.
- Huguiet, P., Manier, N., Chabot, L., Bauda, P., Pandard. (2015). Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land: Towards a proposal of suitable test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113: 103-111.
- Lapa, N., Barbosa R., Morais, J., Mendes, B., Méhu, J., Santos Oliveira, J.F. (2002). Ecotoxicological assessment of leachates from MSWI bottom ashes. *Waste Management*, 22: 583–593.
- Lowe, E.S. and Balis, F.M. (2007). Principles of clinical pharmacology (second edition). Page 345.

- Manskinen, K., Nurmesniemi, H., Pöykiö, R. (2011). Total and extractable non-process elements in green liquor dregs from the chemical recovery circuit of a semi-chemical pulp mill. *Chemical Engineering Journal*, 166: 954–961.
- Moser, H., and Römbke, J. (Eds.) (2009). *Ecotoxicological characterization of waste - results and experiences of a European ring test*. Springer Ltd., New York. All results and raw data at: <http://ecotoxwasteringtest.uba.de/h14/index.jsp>
- Nurmesniemi, H., Pöykiö, R., Periämäki, P. Kuokkanen, T. (2005). The use of a sequential leaching procedure for heavy metal fractionation in green liquor dregs from a causticizing process at a pulp mill. *Chemosphere* 61: 1475–1484.
- PORDATA. (2019). Produção de resíduos: total e por tipo de resíduo. [acedido a 1 de março de 2019]. Disponível em <https://www.pordata.pt/DB/Europa/Ambiente+de+Consulta/Tabela>
- Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A-M., Poulsen V., Jourdain M-J., Féraud J-F., Grand C., Bispo, A. (2006). Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of the Total Environment*, 363: 114 – 125.
- Pandard, P and Römbke J. 2013. Proposal for a "Harmonized" Strategy for the Assessment of the HP 14 Property. *Integrated Environmental Assessment and Management*. DOI: 10.1002/ieam.1447.
- Quina, M. J. (2005) *Processos de Inertização e Valorização de Cinzas Volantes – Incineração de Resíduos Sólidos Urbanos*. Tese de Doutoramento em Engenharia Química. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Pinheiro, J. N. (2010). *Efeitos Ecotoxicológicos das escorrências superficiais em zonas aridas*. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Römbke, J., Moser, Th. and Moser, H. (2009). Ecotoxicological characterisation of 12 incineration ashes using 6 laboratory tests. *Waste Management*, 29: 2475-2482.
- Stiernstrom, S., Wik, O. and Bendz, D. (2016). Evaluation of frameworks for ecotoxicological hazard classification of waste. *Waste Management*. 58: 14-24.
- Tisler, T. and Zagorc-Koncan, J. (2002). Acute and Chronic Toxicity of Arsenic to Some Aquatic Organisms. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 69: 421–429.
- Vaajasaari, K. (2005). *Leaching and Ecotoxicity Tests as Methods for Classification and Assessment of Environmental Hazard of Solid Wastes*. Tese de Doutoramento. Universidade de Tecnologia de Tampere, Tampere, Finlândia.
- Wahlström, M., Laine-Ylijok, J., Wik, O., Oberender, A. and Hjelmar, O. (2016). Hazardous waste classification: Amendments to the European Waste Classification regulation – what do they mean and what are the consequences?. Financed by Nordic Council of Ministers.
- Wilke, B.-M., Riepert, F., Koch, C. and Kuhne, T. (2008). Ecotoxicological characterization of hazardous waste. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, 70: 283-293.