



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para
análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem**

Nome do Mestrando | Bruna Alexandra Oliveira Ramos

Orientação | Jorge Manuel Ginja Teixeira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

Nome do Mestrando | Bruna Alexandra Oliveira Ramos

Orientação | Jorge Manuel Ginja Teixeira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2018

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos
em tintas de tatuagem

“The scientist needs an artistically creative imagination.”

Max Planck

Aos meus pais e irmãos

Agradecimentos

Quero prestar o meu agradecimento a todas as pessoas/instituições que me apoiaram no decorrer do meu trabalho. Em primeiro lugar quero prestar o meu agradecimento à instituição onde tenho realizado todo o meu percurso académico, a Universidade de Évora.

Quero agradecer ao meu orientador Professor Jorge Teixeira, por ter abraçado esta ideia desde o momento em que eu surgi com estes planos mirabolantes, por todo o apoio incansável, toda a ajuda, disponibilidade, orientação e companheirismo ao longo deste ano.

Quero agradecer também ao Nuno Carromeu, Ezequiel Lobo e à empresa de fornecimento de material para tatuagens, FloatingBubble, que contribuíram de uma maneira enorme, quando se prontificaram a mandar amostras das suas tintas de modo a que eu conseguisse realizar o meu estudo.

Gostaria ainda de agradecer à D. Esperança e à D. Anabela Cabeça, por todo o apoio necessário, pelo carinho e pela amizade.

Agradeço à Maria Inês Rouxinol por todo aquele carinho que as palavras não conseguem explicar, por todos os momentos de partilha e de entreajuda, por todo aquele apoio, e por ter sempre uma palavra de positivismo mesmo quando as coisas parecem quase impossíveis de alcançar. Que continuemos sempre assim, partilhando as nossas conquistas, todos os dias.

Agradeço também à Maria Micaela Esteves, pela amizade, pela paciência para me ouvir, pelas nossas conversas e desabafos, por estar sempre ao meu lado neste trajeto.

Quero agradecer ao André por tudo, por todo apoio incondicional, todo o carinho, pela enorme paciência e por estar sempre ali quando eu preciso. O amor é tudo isso e ainda mais, e cresce com cada experiência e a cada dia.

Um agradecimento a todos os meus amigos, que de qualquer maneira contribuíram para que houvessem sorrisos mais doces, manhãs mais alegres e tardes

mais bem passadas. Aqueles que contribuíram para que o caminho fosse mais leve.

Por último quero agradecer à minha família. Aos meus pais por todo o apoio em todos estes anos, por estarem presentes sempre que precisei e por estarem sempre disponíveis para uma palavra amiga ou um conselho sempre que precisei. Agradeço também à mana Rafaela pelo carinho e pela amizade, pela companhia e por ouvir os meus desabafos ao longo de todo o percurso, e ao mano António, porque mesmo que ele não perceba ainda muito bem o que é isto de universidade, todas as manhãs do fim de semana faz um teste à minha paciência, com toda aquela energia, mas que depois me aquece o coração com beijinhos e um “Mana, quero ser cientista como tu, quando for grande”.

Um muito obrigado a todos vós por fazerem parte da minha vida em todos os momentos, pois sem a vossa companhia, este caminho não era tão saboroso.

Abreviaturas

AAP – Amina Aromática Policíclica

ACN – Acetonitrilo

AEC – Antes da era cristã

AIPC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro

BaP – Benzo[a]pireno

BDDE – Eléctrodo de diamante dopado com boro (*Boron-doped Diamond electrode*)

Bi – Bismuto

Bi₂O₃ – Óxido de Bismuto (III)

BiFE – Eléctrodo de filme de bismuto (*Bismuth film electrode*)

DPASV – Voltametria de redissolução anódica de impulso diferencial (*Differential Pulse Anodic Stripping Voltametry*)

DPV – Voltametria de impulso deferencial (*Differential Pulse Voltametry*)

Ep – Potencial do pico

FET – Fator de Equivalência de Toxicidade

GC-MS – Espetrometria de Massa por Cromatografia Gasosa (*Gas chromatography mass spectrometry*)

HNO₃ – Ácido nítrico

HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático

ICP-MS – Espetrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*)

LC-MS – Espetrometria de Massa por Cromatografia Líquida (*Liquid chromatography mass spectrometry*)

Pb – Chumbo

PbB – Concentração de Chumbo no Sangue (*Pb on Blood*)

SPCE – Eléctrodo de tinta impressa de carbono (*Screen printed carbon electrode*)

UV – Ultra-violeta

XRF – Fluorescência de Raio X (*X-ray fluorescence spectrometry*)

Convenções

% – Percentagem

µg – micrograma

µL – microlitro

cm – centímetro

g – grama

kg – quiloquilo

mg – miligrama

ms – milissegundo

mV – milivolt

nm – nanómetro

ppb – parte por bilhão

ppm – parte por milhão

s – segundo

V – volt

Resumo

Com a crescente utilização de tintas de tatuagem e semi-permanentes torna-se necessário desenvolver metodologias analíticas que permitam conhecer os constituintes das tintas com rigor, de um modo simples, rápido e económico. Nesse contexto, desenvolveram-se no presente trabalho métodos eletroquímicos voltamétricos inovadores com capacidade para detetar e quantificar substâncias inorgânicas e orgânicas nocivas para a saúde humana, presentes nessas tintas. Para o efeito, procedeu-se à digestão das amostras e selecionaram-se como substâncias modelo para análise, o chumbo (Pb) e o benzo[a]pireno (BaP). A análise voltamétrica destas substâncias baseou-se no seu comportamento anódico, utilizando a voltametria de impulso diferencial, sendo que no caso do chumbo a análise foi precedida da sua pré-concentração catódica.

Os resultados alcançados demonstram que é possível detetar com sucesso quantidades vestigiais das duas substâncias nas tintas. Relativamente à sua quantificação, apenas para o Pb foi possível desenvolver um método eficaz, ficando em aberto essa possibilidade para o BaP.

Abstract

“Development of electrochemical methods for analysis of toxic agents in tattoo inks”

With the increasing use of tattoo and semi-permanent inks it is important to develop analytical methods that allow the inks to be known by a simple, fast and economical way. Through this, new electrochemical methods have been developed in the present study that are capable of detecting and quantifying inorganic and organic substances present in these inks and harmful to human health. For this, samples of ink were digested and lead (Pb) and benzo[a]pyrene (BaP) were selected as test substances. The voltammetric analysis of these substances was based on their anodic behavior, using differential pulse voltammetry, and in the case of lead the analysis was preceded by its cathodic preconcentration.

The results show that trace amounts of both substances can be successfully detected in the samples of tattoo inks. Regarding its quantification, only for the Pb it was possible to develop an efficient method, leaving for future studies this possibility to BaP.

Índice geral

AGRADECIMENTOS	I
ABREVIATURAS	III
CONVENÇÕES	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE GERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
1. PROBLEMÁTICA E OBJETIVOS	1
2. INTRODUÇÃO	4
2.1 A TATUAGEM	4
2.1.1 ORIGEM E CONTEXTO SOCIAL	4
2.1.2. O PROCESSO	11
2.2. TINTA DE TATUAGEM	17
2.2.1. <i>Constituição</i>	17
2.2.2. <i>Toxicidade</i>	21
2.2.3. <i>Reações adversas</i>	24
2.3. LEGISLAÇÃO	27
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS	33
3.1. ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X	33
3.2. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS	36
3.2.1. <i>Voltametria de Impulso Diferencial (DPV)</i>	36
4. PARTE EXPERIMENTAL	39
4.1. EQUIPAMENTO, MATERIAL E SOLUÇÕES	39
4.1.1. <i>Espectrômetro de fluorescência de raio X portátil</i>	39
4.1.2. <i>Potenciostato</i>	40
4.1.3 <i>Elétrodos utilizados na análise eletroquímica</i>	41

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

4.2. EQUIPAMENTO AUXILIAR.....	43
4.3. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PARA A ANÁLISE VOLTAMÉTRICA	43
4.3.1. Soluções de eletrólitos de suporte.....	43
4.3.2. Solução de trabalho de chumbo (II) 1000 ppb	44
4.3.3. Soluções de trabalho de benzo[a]pireno 1000 ppb e 100 ppb	44
4.3.4. Preparação das soluções amostra para análise do BaP.....	44
4.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
4.4.1 Análise elementar das tintas por XRF	45
4.4.2. Análise voltamétrica do chumbo.....	46
4.4.3. Detecção voltamétrica de benzo[a]pireno.....	48
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	50
5.1. ANÁLISE ELEMENTAR DAS TINTAS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X PORTÁTIL (PXRF).....	50
5.2. ESTUDO PRÉVIO PARA A DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE CHUMBO NAS TINTAS DE TATUAGEM.....	54
5.3. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CHUMBO NAS TINTAS DE TATUAGEM	59
5.4. VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA DE IMPULSO DIFERENCIAL (DPASV) VS. FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (XRF) 64	
.....	65
5.5. DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DO B[A]P.....	66
6. CONCLUSÕES	70
7. PERSPETIVAS FUTURAS.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	81
ANEXO 1 – PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES STOCK E DE TRABALHO	81
ANEXO 2 – ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X DE 22 DAS TINTAS DE TATUAGEM ANALISADAS.....	83
ANEXO 3 – TABELA RESUMO DOS METAIS ENCONTRADOS COM MAIS ABUNDÂNCIA EM TINTAS DE TATUAGEM.	94
ANEXO 4 – VOLTAMOGRAMAS DAS TINTAS DE TATUAGEM SELECIONADAS PARA A ANÁLISE DE PRESENÇA DE CHUMBO	98
ANEXO 5 – POSTER APRESENTADO NO 18º ENCONTRO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE ELETROQUÍMICA.....	104
ANEXO 6 – APRESENTAÇÃO DE COMUNICAÇÃO ORAL NAS JORNADAS DO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA 2017	105

Índice de Figuras

Figura 1 – Mapa ilustrativo de todas as tatuagens presentes no corpo da múmia. Adaptado de Samadelli <i>et al.</i> 2015 ⁴	8
Figura 2 – Tatuagens presentes no corpo de Ötzi, o homem do gelo. Investigadores acreditam que essas tatuagens podem ter sido uma forma primitiva de tratamento médico, pois foram colocadas principalmente em áreas do seu corpo que provavelmente lhe causassem dor ou desconforto. Adaptado de Samadelli <i>et al.</i> 2015 ⁴	8
Figura 3 - Tatuagens e maquiagens permanentes através do depósito de pigmentos insolúveis na camada dérmica da pele (Engel et al. 2010) ⁶⁰	12
Figura 4 – Esquema de uma seção típica de pele humana, onde se mostra a sua construção laminar e algumas das glândulas e células imigrantes que são mais importantes para a sua função. (Jennifer Kane, 2005) ³	16
Figura 5 – Epiderme humana, com as suas quatro camadas constituintes e um único melanócito, em forma de aranha, próximo da interface com a derme. A produção contínua de novos queratinócitos no estrato basal ajuda a manter a epiderme em boas condições. Filamentos de queratina que fornecem suporte estrutural e resistência à abrasão são produzidos enquanto estão no estrato espinhoso. No estrato granuloso, as células – com grânulos internos visíveis – morrem e movem-se para o estrato córneo. (Jennifer Kane, 2005) ³	16
Figura 6 - Clivagem e redução do pigmento vermelho 5. Adaptado de Ferraglio 2016	19
Figura 7 – Desafios relacionados com a avaliação toxicológica da tatuagem..	23
Figura 8 - Estrutura molecular do Benzo[a]pireno. Fonte: PubChem	31
Figura 9 - Processo de fluorescência de raios X: (A) Um elétron da camada K é ejetado do átomo, por intermédio de um feixe externo de raios X ionizante, deixando uma lacuna nessa camada; (B) Esta lacuna é preenchida à custa das transições de elétrons de camadas superiores L, M, ou N, com respectiva emissão	

de fótons com energia característica dos raios X (raios X secundários) (Adaptado de ⁴⁹).	34
Figura 10 - (A) Sinal de excitação para voltametria de pulso diferencial. Adaptado de Analytical Electrochemis-try by Joseph Wang ⁵² . (B) Voltamograma correspondente, considerando a presença de dois analitos eletroativos (X e Y).	37
Figura 11 - Espetrómetro de fluorescência de raio X portátil	39
Figura 12 - Potencióstato/Galvanóstato AUTOLAB PGSTAT302N.....	40
Figura 13 – Sistema de três elétrodos de tinta impressa, com elétrodo de trabalho de carbono modificado com óxido de bismuto (III). Este sistema permite a utilização de microvolumes de solução eletrolítica.....	41
Figura 14 - Montagem do sistema de três elétrodos utilizado na análise voltamétrica do benzo[a]pireno. Na imagem pode observar-se o elétrodo de trabalho (A), o elétrodo de referência (B) e o elétrodo auxiliar (C).	42
Figura 15 – Tinta de tatuagem previamente seca para colocação no nariz do analisador XRF.....	46
Figura 16 - Espectros de fluorescência de raios x (a vermelho) das tintas (A) TBCH (tinta com cor preta), (B) PTCH (tinta com cor branca), e (C) LVCH (tinta com cor lavanda), onde se evidencia o principal sinal do chumbo (ca. 10.55 keV), em conjunto com o espectro XRF (a azul) do parafilme + papel branco.	52
Figura 17 - Comparação dos espectros de fluorescência de raios x da tinta TBCH (espectro azul claro), PTCH (espectro amarelo), e LVCH (espectro vermelho), relativamente ao principal sinal do chumbo (Pb), em conjunto com o espectro XRF (a azul) do parafilme + papel branco.....	53
Figura 18 - Análise comparativa dos voltamogramas obtidos com elétrodos de filme de bismuto, formados em soluções de eletrólitos de suporte, 0.1 M NaOH e tampão acetato 0.1 M pH 4.7. Os dois voltamogramas foram obtidos em tampão acetato e na ausência de chumbo.....	54
Figura 19 - Voltamograma de um extrato de tinta de tatuagem, obtido num elétrodo de filme de bismuto formado em meio hidróxido de sódio.....	55

Figura 20 - Voltamograma obtido na sequência de uma DPASV num elétrodo de filme de bismuto formado em meio hidróxido e em tampão acetato com adição de chumbo (II).	56
Figura 21 - Voltamogramas obtidos numa série de adições padrão de chumbo (II), caso o extrato da tinta manifestasse sinais da presença de chumbo.	57
Figura 22 - Reta de adição padrão que evidencia a impossibilidade de determinar o chumbo (II) presente no extrato de tinta em análise.	57
Figura 23 - Resumo esquemático dos procedimentos experimentais levados a cabo no estudo prévio.	58
Figura 24 - No gráfico 1A podem ser observados os voltamogramas obtidos através da adição sucessiva de 5 μ L de chumbo, até se atingir uma concentração de 20 ng. No gráfico 1B, através da intensidade do pico (I_p) retirada do gráfico 1A, obteve-se uma reta de adição padrão.	60
Figura 25- Voltamogramas obtidos em cada um dos ensaios em que se utilizou um volume específico de uma solução amostra com Pb (solução amostra TBCH).	61
Figura 26 - Voltamogramas de cada uma das soluções amostra das tintas de tatuagem analisadas voltametricamente (volume de amostra colocado sobre o elétrodo, 7 μ L)	62
Figura 27 - Voltamogramas da solução amostra da tinta de tatuagem TBCH sem e com diluição de $\frac{1}{4}$	63
Figura 28 – Espectro XRF de um BiFE antes da utilização (azul) e depois da utilização (vermelho). No espectro são visíveis os picos do bismuto, devido à constituição do próprio elétrodo.	65
Figura 29 - Voltamogramas de impulso diferencial de 10, 20 and 30 ng BaP in 0.1 M LiClO ₄ /ACN (200 μ L), sem (linhas a tracejado) e com (linhas contínuas) 20 μ L de água.	66
Figura 30 - (A) Voltamogramas de impulso diferencial de 2.5 a 60 ng BaP em 0.1 M LiClO ₄ /ACN (200 μ L) com 20 μ L de água; (B) Curva de calibração correspondente.	67

Figura 31 - Voltamogramas de impulso diferencial das amostras A e B dopadas com 40 ng BaP em 0.1 M LiClO ₄ /ACN (20 ng BaP em 200 µL), com e sem adição de 20 µL de água. Na Figura interna apresentam-se os voltamogramas das amostras A e B não dopadas com BaP.....	68
Figura 32 - NC08 + parafilme+papel branco	83
Figura 33 - NC12 + parafilme+papel branco	83
Figura 34 - SWCH + parafilme+papel branco.....	84
Figura 35 - NC07 + parafilme+papel branco	84
Figura 36 - NC05 + parafilme+papel branco	85
Figura 37 - NC04 + parafilme+papel branco	85
Figura 38 - NC03 + parafilme+papel branco	86
Figura 39 - NC01 + parafilme+papel branco	86
Figura 40 - NC02 + parafilme+papel branco	87
Figura 41 - NC06 + parafilme+papel branco	87
Figura 42 - NC09 + parafilme+papel branco	88
Figura 43 - NC10 + parafilme+papel branco	88
Figura 44 - NC11 + parafilme+papel branco	89
Figura 45 - TCH + parafilme+papel branco	90
Figura 46 - TGCH + parafilme+papel branco	90
Figura 47 - VBR + parafilme+papel branco	91
Figura 48 - BSCH + parafilme+papel branco.....	91
Figura 49 - LPPCH + parafilme+papel branco.....	92
Figura 50 - SCH + parafilme+papel branco	92
Figura 51 - EL13 + parafilme+papel branco	93
Figura 52 - MWCH + parafilme+papel branco	93
Figura 53 - Comparação da resposta da amostra NC03 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	98
Figura 54 - Comparação da resposta da amostra NC04 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	98
Figura 55 - Comparação da resposta da amostra NC05 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	99

Figura 56 - Comparação da resposta da amostra NC07 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	99
Figura 57 - Comparação da resposta da amostra NC08 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	100
Figura 58 - Comparação da resposta da amostra NC12 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	100
Figura 59 - Comparação da resposta da amostra SWCH sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.....	101
Figura 60 - Comparação da resposta da amostra EL01 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	101
Figura 61 - Comparação da resposta da amostra EL07 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	102
Figura 62 - Comparação da resposta da amostra EL08 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	102
Figura 63 - Comparação da resposta da amostra EL10 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	103
Figura 64 - Comparação da resposta da amostra EL13 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.	103

Índice de tabelas

Tabela 1 - Concentrações máximas de elementos metálicos permitidas de acordo com a ResAP (2008) 1 do Concelho Europeu.....	28
Tabela 2 - Efeito dos níveis de chumbo em crianças e adultos. Adaptado de Hanna-Attisha et al. 2016.....	30
Tabela 3 - Características físicas e químicas do benzo[a]pireno. Adaptado de Williams et al ⁴⁶	32
Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas na formação eletroquímica do filme de bismuto e na voltametria de redissolução anódica de impulso diferencial para a análise de chumbo (II).....	48
Tabela 5 - Quantidades de chumbo presentes nas tintas de tatuagem analisadas.	63

1. Problemática e objetivos

A prática de tatuagens tem sido adotada ao longo de vários séculos em todo o mundo, assumindo diferentes significados que variam de cultura para cultura. Atualmente as tatuagens são utilizadas não só como um simples ornamento corporal, e fator de embelezamento, mas também estão associadas à identidade de grupos socioculturais particulares. Além disso, os resultados epidemiológicos mostraram que esta prática de expressão corporal é cada vez mais adotada pela população.

Em tatuagens e maquiagem permanentes, os pigmentos, entre outros constituintes das tintas, são dispostos na derme com recurso a uma agulha. Este processo garante à partida a imobilização dos pigmentos e a relativa estabilidade das áreas tatuadas. No entanto, através do processo de tatuagem o organismo é exposto aos vários componentes das tintas de um modo muito direto e por um tempo prolongado, da qual resulta, em regra, uma mobilização dos pigmentos e sua acumulação nos gânglios linfáticos. Deste modo, a tatuagem da pele é indiretamente uma tatuagem do nódulo linfático, o qual drena a área da pele tatuada e passa a ser um local capaz de criar reações adversas no corpo tatuado.

Entre os componentes das tintas, os principais compostos com cor são compostos metálicos, que incluem alguns elementos químicos com propriedades adversas bem conhecidas para os seres vivos.

Todos estes elementos metálicos, bem como outros elementos que coexistem nos compostos normalmente usados como pigmentos (por exemplo, antimónio, arsénio e níquel), podem potenciar alergias, vários tipos de inflamações cutâneas, bem como doenças da pele e anomalias em outros tecidos, em órgãos, ossos e vias metabólicas.

Para além dos elementos metálicos supracitados, nas tintas de tatuagem também se encontram compostos orgânicos com uma ação igualmente nociva para os seres vivos. Entre estes sobressaem os Hidrocarbonetos Aromáticos

Policíclicos (HAP) e as Aminas Aromáticas Primárias (AAP), dos quais se destacam o HAP benzo[a]pireno e as AAP anilina e o-anisidina, que possuem propriedades carcinogêneas consideráveis.

Apesar das quantidades ou concentrações de todos estes constituintes poderem ser baixas nas tintas, o seu efeito nos indivíduos tatuados, ou a tatuar, pode mesmo assim ser muito negativo. Neste sentido, reconhece-se que a monitorização e controlo deste tipo de contaminantes, em produtos com ação direta no ser humano, envolve impreterivelmente o uso de métodos químicos analíticos modernos, muito potentes, versáteis, económicos e, se possível, simples.

Entre os principais métodos de monitorização e quantificação de elementos metálicos (e semi-metálicos) e compostos orgânicos em tintas de tatuagem destacam-se normalmente técnicas como a ICP-MS e as LC-MS ou GC-MS, respetivamente. Estas técnicas são muito exatas, sensíveis, seletivas e possuem limites de deteção muito baixos, mas ao mesmo tempo são relativamente trabalhosas e demoradas e requerem equipamento consideravelmente dispendioso. Por outro lado, existem técnicas eletroanalíticas que rivalizam com as anteriores relativamente aos limites de deteção, simplicidade, rapidez e baixo custo dos procedimentos analíticos envolvidos e que, quanto se sabe, não foram ainda utilizadas na deteção e quantificação dos analitos supracitados em tintas de tatuagem. Entre estas técnicas destacam-se as voltametrias que, para além das vantagens analíticas que se lhes reconhecem, podem ser facilmente implementadas em qualquer lugar, devido à elevada portabilidade dos equipamentos eletroquímicos disponíveis no mercado. Deste modo, neste trabalho considera-se que o potencial analítico que as voltametrias oferecem na análise de constituintes de tintas de tatuagem constitui um tema que merece ser explorado e desenvolvido.

Objetivos

1. Objetivo geral

Desenvolver novas metodologias eletroquímicas para quantificação de constituintes das tintas de tatuagem, nomeadamente elementos metálicos (tais como o chumbo ou o níquel) e compostos orgânicos, que podem apresentar um risco excecional para a saúde (em particular o benzo[a]pireno). Para o efeito são seleccionadas para estudo várias tintas de diferentes marcas existentes no mercado, e são utilizadas técnicas voltamétricas analíticas mais pertinentes (e.g., a voltametria de impulso diferencial), bem como diferentes tipos de eléctrodos (convencionais e modificados).

2. Objetivos específicos

- Desenvolver métodos de extração de chumbo e benzo[a]pireno das tintas de tatuagem;
- Desenvolver metodologia voltamétrica para detetar e quantificar chumbo em micro volumes de extratos aquosos das tintas de tatuagem, com eléctrodo de tinta de carbono impressa modificada com filme de bismuto;
- Desenvolver metodologia voltamétrica para detetar benzo[a]pireno em micro volumes de extratos não-aquosos de tintas de tatuagem negras, com eléctrodo de diamante dopado com boro;
- Aplicar a várias amostras de tinta de tatuagem a metodologia voltamétrica desenvolvida para detetar e quantificar chumbo.

2. Introdução

2.1 A tatuagem

2.1.1 Origem e contexto social

Tatuar tem sido prática desde a era pré-histórica, por todas as civilizações e cada uma dela com os seus propósitos e razões. Tatuar é definido como o ato deliberado ou acidental de depositar pigmento na pele ¹. Contudo, a palavra “tattoo”, derivada da palavra polinésia *tatau* surgiu devido a James Cook, após a sua viagem à Polinésia no Séc. XVIII ². A palavra rapidamente se transformou em “tattoo” em Inglês, e depressa alcançou outras linguagens europeias ².

Além disso, dados arqueológicos fornecem evidências abundantes de que o ser humano modifica a sua pele de várias maneiras desde o Paleolítico posterior, e evidências diretas de peles preservadas e mumificadas atestam que desde o período do Neolítico se encontram seres humanos com pele decorada através de pigmentos, desde aproximadamente dez mil anos atrás até ao presente ³.

As primeiras modificações foram provavelmente marcas feitas na superfície da pele, que constituem as mais antigas formas de pintura artística corporal e cosmética ³.

Para os gregos, a palavra “tatuagem” provém do nome *stigma(ta)*. Tatuar, no seu aspeto social, poderia ser tanto distintivo de um alto estatuto como apenas por pura decoração. No entanto, para os Gregos, esta prática era associada aos “bárbaros” incivilizados, sendo que nunca foi adotada. ² O modo que os gregos encontraram para a utilização desta prática, foi como ação de punição ou de propriedade ². Em outras palavras, devido ao facto dos Gregos associarem *stigmata* aos seus vizinhos rivais, a sua importância social degradou-se e, subsequentemente, *stigmata* veio a ser utilizada para marcar os “Outros” dentro da cultura Grega, tais como criminosos e escravos ².

Marcando indelevelmente e sem consentimento os corpos de criminosos e escravos, o estado Romano poderia controlar mais facilmente os seus

movimentos devido à marca que lhes fora infligida. Este estigma social era carregado por estes indivíduos, de modo a fazer transparecer um sinal visível e o seu estado social ².

Estabelecido como punição ou símbolo de propriedade na Grécia, tatuar continuou durante a Idade Média na Europa, como um meio de marcar os corpos de criminosos, sendo que a tatuagem como prática social na civilização ocidental se entrelaçou com a criminalidade ².

Uma das primeiras referências explícitas em que tatuagem revelava alguma aplicação prática no século XVIII foi durante a Guerra Civil Americana ². Até 1880, criminosos, marinheiros e a classe trabalhadora eram os grupos majoritários que possuíam tatuagens. Subitamente, no final dos anos 80, as tatuagens ficaram na “moda” e disseminaram-se pelas classes mais elevadas de Inglaterra e dos Estados Unidos ².

Estudos etnográficos de arte corporal de todos os continentes e Oceânia apresentam um uso generalizado do vermelho ocre (à base de hematite) como tinta corporal. Cores adicionais vieram do amarelo ocre (à base de limonite); preto de pirolusite (óxido de manganês); cinzas brancas, carvão ou lima; e outros pigmentos minerais ². O vermelho ocre é comumente encontrado em locais de Paleolítico, sendo que arqueólogos descobriram que ocres cores vivas parecem ter sido utilizados na decoração de corpos datados da Idade da Pedra no meio da Caverna de Blombos, na África do Sul ³.

Embora vários ocres e argilas fossem provavelmente utilizados como as primeiras fontes de pigmentos para a pintura corporal, minerais pulverizados e pigmentos à base plantas, tais como: *Kohl*, índigo (*Isatis tinctoria*) e urucu, eram utilizadas há mais de cinco mil anos atrás. *Kohl*, é um pigmento à base de um sulfureto de antimônio (a estibidina), e remonta do Antigo Egito, à cerca de 3000 AEC ³.

Índigo, o corante azul que os antigos Bretões utilizavam para colorir a sua pele, era preparado através das folhas em pó e fermentadas de *Isatis tinctoria*. Muitos indígenas equatoriais da América dos Sul adotaram o urucu, uma coloração vermelha obtida a partir da polpa e das sementes do urucu (*Bixa orellana*). Os

cosméticos “eco compatíveis” vendidos em países industrializados nos dias de hoje, tem muito frequentemente na sua composição urucu ³.

A primeira utilização generalizada de produtos de cosmética – tinta para o corpo feita especialmente para a pele facial – teve os primeiros indícios no antigo Egito, onde paletas de pó de minerais coloridos, e outros compostos, ajudavam a decorar as caras de vivos e falecidos de ambos os sexos. Os cosméticos incluíam compostos naturais à base de chumbo, assim como outros que foram fabricados deliberadamente através de técnicas de síntese química em solução, desenvolvidas em laboratórios relativamente rudimentares. Ficou assim assinalado o início da indústria dos cosméticos ³.

As primeiras paletas de cosméticos egípcios continham *kohl* para escurecer as margens dos olhos, pó de malaquite para adicionar uma cor verde às pálpebras e ocre vermelho ou carmim para os lábios. Para enfatizar essas zonas, a maior parte do rosto estava coberta por uma espessa camada de branco de chumbo. O branco de chumbo, um hidroxocarbonato de chumbo, serviu inicialmente como base para o fabrico de tintas domésticas, mas o seu uso é agora proibido ³.

A prática de cobrir o rosto com chumbo branco era comum não só no Egito, mas também na Grécia clássica e na Europa até ao princípio do século XIX. Os rostos surpreendentemente brancos das geishas Japonesas era obtidos através da aplicação generosa de pó de arroz ou pó de branco de chumbo, que seria misturado com água e transformado em pastas finas que seriam posteriormente utilizadas para pintar as suas faces ³.

A história da pintura corporal e cosméticos nos países industrializados é complexa e fascinante. Nos últimos 150 anos, uma verdadeira indústria foi-se desenvolvendo em volta da propensão humana para a decoração temporária do ser. Esta indústria foi alimentada por vários fatores, entre os quais, pela capacidade de o ser humano observar a imagem do outro (através de pinturas, desenhos, fotografia, televisão, filmes e internet), e de querer imitar os visuais considerados apelativos, e pelo desenvolvimento de tecnologias que permitem a produção de produtos cada vez mais sofisticados e vão ao encontro das ideias e ambições dessas pessoas. Nas décadas recentes, os cosméticos têm sido

associados à moda, como resultado disto resultam mudanças de estilo de estação para estação que podem envolver revisões completas da aparência da pele e todas as suas marcas culturais ³.

Tatuagem é outra forma ancestral de arte corporal e parece ter sido uma prática humana quase universal. Remontando pelo menos aos tempos do Neolítico, tatuagem pode representar a forma mais antiga de decoração corporal irreversível. As tatuagens mais antigas conhecidas nos dias de hoje pertencem a Ötzi, “The Iceman” datado do período do Neolítico tardio, cujo corpo congelado foi encontrado por alpinistas na fronteira entre a Itália e a Áustria em 1991, tendo sido vítima de uma avalanche. A sua pele preservada, datada de aproximadamente 5000 anos, apresentava quinze conjuntos de marcas permanentes que se acredita serem tatuagens ⁴ (Figura 1 e Figura 2) – apresentam-se na sua maioria linhas negras, curtas e paralelas, encontradas nos tornozelos e nas costas, que parecem ter sido produzidas esfregando carvão na pele e, em seguida, perfurando a pele e empurrando os resíduos de carvão de modo a que estes permanecessem na derme. Tatuagens luxuosas com figuras de animais reais e míticos decoram corpos com quase 4.500 anos de idade que foram recuperados dos túmulos congelados do povo Pazyryk do Altai na Rússia Siberiana ³.

A tatuagem foi disseminada entre três e quatro mil anos atrás na Escandinávia, nas regiões circumpolares, nas Américas e na Oceânia; algumas das tatuagens mais elaboradas - as da Austronésia - também parecem ter origens antigas.

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

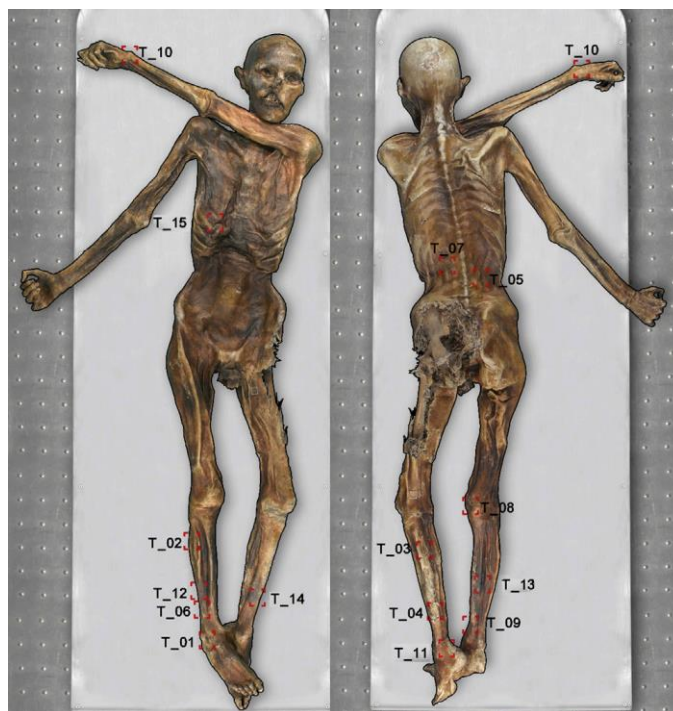


Figura 1 – Mapa ilustrativo de todas as tatuagens presentes no corpo da múmia. Adaptado de Samadelli *et al.* 2015 ⁴.

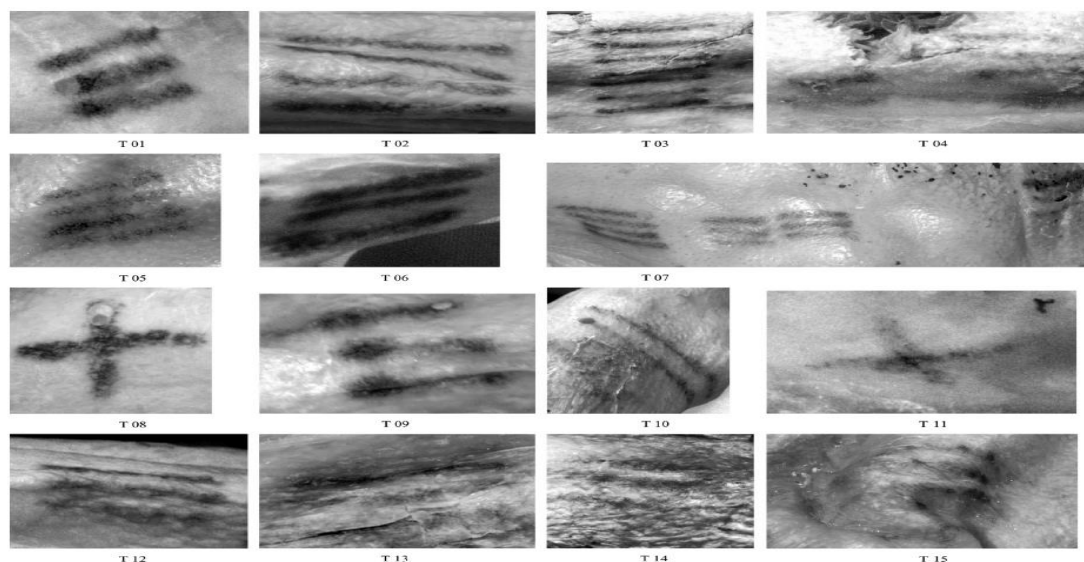


Figura 2 – Tatuagens presentes no corpo de Ötzi, o homem do gelo. Investigadores acreditam que essas tatuagens podem ter sido uma forma primitiva de tratamento médico, pois foram colocadas principalmente em áreas do seu corpo que provavelmente lhe causassem dor ou desconforto. Adaptado de Samadelli *et al.* 2015 ⁴.

Arqueólogos recuperaram instrumentos de tatuagem (agulhas e pentes) de locais no antigo complexo cultural de Lapita nas ilhas do Pacífico, datando estes

de 1200-1100 AEC, sendo que evidências consideráveis deste local ligam os desenhos e motivos da tatuagem com aqueles usados na produção de tapa (tecido vegetal decorado) e cerâmica Lapita ³.

Tatuar foi parte integral da maior parte das culturas por milhares de anos, mas claramente a sua fama foi abalada na maior parte da Europa no início da era cristã, provavelmente por razões relacionadas à injunção bíblica contra ela. Nos séculos seguintes, o mundo ocidental passou a associar a tatuagem a elementos pouco respeitáveis e marginais da sociedade, como prisioneiros e prostitutas, ou ao primitivo e ao exótico, dada a persistência de tatuagens em outras culturas do mundo ³.

Hoje, o ser humano não é apenas orientado visualmente; é visualmente obcecado. As pessoas usam a sua pele como uma tela, para anunciar a sua identidade, o seu status social e sua conveniência social e sexual. Os humanos têm deliberadamente alterado a aparência da sua pele por dezenas de milhares de anos, ou possivelmente por mais tempo ³.

Nos dias que correm, os países industrializados exibem meios para mudar a tela básica da própria pele, ajustando a sua cor e textura. Bronzeamento e clareamento da pele, entre uma ampla variedade de métodos para tornar a pele mais jovem, estão disponíveis para aqueles com tempo e dinheiro suficientes ³. Atualmente, as tatuagens são a forma mais popular de arte permanente no corpo, havendo cerca de oitenta milhões de pessoas em países industrializados que possuem alguma forma de “tinta”. A “grande tela” da pele permite imagens de tamanhos, cores e complexidade muito variadas. Para surpresa dos que não possuem tatuagens, as pessoas que optam conscientemente por fazer tatuagens, geralmente não se arrependem de sua decisão ³.

A maioria das tatuagens é realizada após muita deliberação e premeditação, e a sua permanência é o seu ponto forte. Num mundo cada vez mais globalizado de roupas, cosméticos e estilos de cabelo semelhantes, as tatuagens são reflexos permanentes da personalidade, representações cuidadosamente calculadas de crenças e sentimentos centrais que podem fazer uma afirmação singularmente poderosa da individualidade ³.

Apesar de todas essas marcas, tatuagens de gangues ou prisioneiros serem alusivas de associação a grupos, as tatuagens também são frequentemente declarações de afiliação romântica, incorporando um símbolo significativo ou o nome de um amante. Indivíduos cujas circunstâncias de vida mudam e que não se apresentam com as mesmas crenças – desvinculação de um gangue, por exemplo, ou término de relacionamento – por vezes tentam remover as suas tatuagens. A remoção de tatuagem usando vários tipos de cirurgia a laser agora é possível, no entanto o procedimento é caro e demorado ³.

O uso de tatuagens temporárias ou a pintura de pigmentos semipermanentes na pele podem alcançar efeitos estéticos semelhantes aos das tatuagens. A arte tradicional da pintura de hena na pele, ou *mehndi*, pertence à última categoria. *Mehndi* começou como um meio tradicional de decorar as mãos e os pés de uma mulher com desenhos complexos pintados com tinta de hena. A tradição originou-se no norte da África e nos países do Oriente Médio e foi levada para a Índia no século XII pelos mongóis ³.

As tatuagens podem ser classificadas em três categorias: traumática, cosmética e decorativa ¹. As tatuagens traumáticas são aquelas em que um material específico penetra acidentalmente na pele (por exemplo, abrasões na pele após um acidente de bicicleta ou motocicleta). Tatuagens cosméticas ou as tatuagens micropigmentadas são utilizadas com o objetivo de realizar uma maquiagem definitiva do contorno dos olhos, lábios e sobrancelhas ou para a reconstrução da mama para delimitar a aréola mamária. As tatuagens cosméticas também são usadas para fins terapêuticos, para corrigir doenças de pele desfigurantes, como vitiligo, alopecia areata ou algumas malformações vasculares ¹.

As tatuagens decorativas distinguem as pessoas através da introdução de uma orientação cultural, religiosa ou social específica na pele. As razões que podem levar uma pessoa a tatuar-se são múltiplas e intrincadas variando consoante o motivo, a cultura e a moda. A tatuagem representa não apenas um investimento psicológico (valor pessoal e motivação da tatuagem), mas também de tempo (elaboração da razão, procura da pessoa que irá realizar a tatuagem, tempo de espera para se encontrar com ela, bem como o tempo das sessões e tempo de

cicatrização), investimento financeiro e até sacrifício físico (dor durante as sessões) ¹.

2.1.2. O processo

A elaboração de tatuagem consiste na introdução de pigmento na derme utilizando uma agulha ¹. As tatuagens podem ser feitas por artistas amadores ou profissionais ¹. Artistas amadores usam tinta da Índia, carvão ou cinza em pó, fazendo utilização de uma agulha comum ou uma unha em vez de uma agulha especial usada para tatuar. Estas tatuagens têm uma qualidade artística pobre, existindo também o elevado risco de infecção. Em contraste, artistas profissionais utilizam pigmentos contendo vários sais e óxidos de metais tais como: mercúrio (pigmento vermelho), crómio e cobre (pigmentos verdes), manganês (pigmentos azul-roxo), cobalto (pigmento azul), cádmio (pigmentos amarelos), ferro (ocres vermelhos ou amarelos), ou compostos orgânicos como sândalo (vermelho) ou *Caesalpinia echinata* (vermelho) ¹.

Com a tatuagem, uma quantidade elevada de pigmento é injetada na pele. Os pigmentos são produtos industriais que consistem numa ampla variedade de substâncias químicas, incluindo subprodutos e impurezas. Os principais constituintes são partículas coloridas, que podem ser divididas em 2 classes: partículas de carbono inorgânicas, negro de carbono, que são encontradas exclusivamente em tatuagens negras, e pigmentos orgânicos, por exemplo, pigmentos azóicos e policíclicos, usados para produzir um amplo espectro de cores ⁵.

Tecnicamente, as tintas de tatuagem são injetadas na pele através de agulhas rapidamente oscilantes montadas em máquinas de tatuagem (Figura 3). A epiderme é perfurada com posterior deposição das tintas na derme. Na literatura, estima-se aproximadamente um valor médio de 2,5 mg/cm² de pigmento seja depositado na derme. Isso implica que vários gramas de pigmento seja injetado na pele, sendo a exposição relativamente grande em pessoas extensivamente tatuadas ^{5,6}.

Após a tatuagem, as partículas de pigmento são encapsuladas na derme. Estas são finalmente observadas como depósitos em estruturas ligadas a membranas, identificadas como lisossomas secundários ⁷. Os macrófagos também podem conter partículas de pigmento fagocitadas. A absorção sistêmica de pigmentos de tatuagem da derme envolve a distribuição para o resto do corpo humano, bem como qualquer órgão interno em princípio exposto. É bem conhecido que o transporte através dos vasos linfáticos leva à deposição nos linfonodos regionais, que parecem eficientes em conter as partículas. Absorção, distribuição, metabolismo e excreção de pigmentos e ingredientes de tintas de tatuagem ainda não estão amplamente exploradas ⁵.

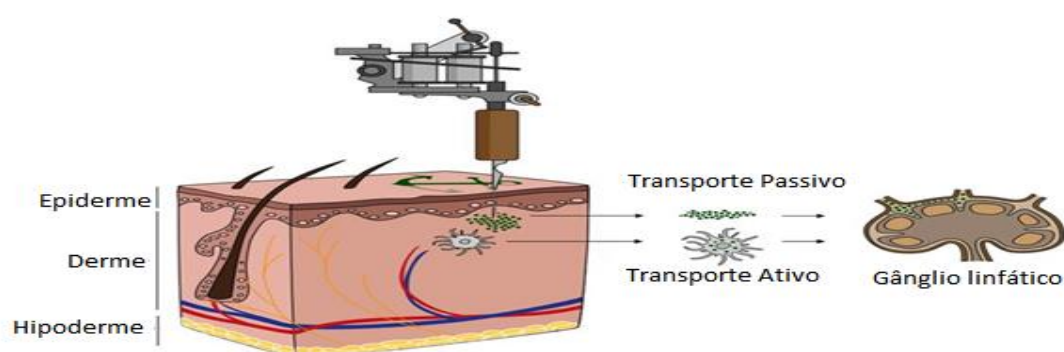


Figura 3 - Tatuagens e maquiagens permanentes através do depósito de pigmentos insolúveis na camada dérmica da pele (Engel et al. 2010)⁶¹.

2.1.2.1. A pele

Quando observamos a nossa imagem nua diante de um espelho, a nossa pele conta histórias sobre nós: quantos anos temos, que tipo de vida levamos, a nossa saúde geral, o ambiente que os nossos ancestrais vivenciaram. Mas a nossa pele transmite muito mais do que apenas os factos biológicos das nossas vidas. Devido à nossa capacidade humana única de alterar deliberadamente a aparência, a nossa pele proclama a nossa identidade e individualidade da maneira que desejamos que sejam conhecidas. Durante milénios, a pele serviu como uma afirmação, declarando uma afinidade com um grupo ou uma crença,

como uma mensagem resumida de como vemos o mundo e como desejamos ser vistos, mesmo após a morte ³.

A nossa pele contém registos de algumas das transformações mais importantes das nossas vidas. A pele é fundamental para a nossa biologia, as nossas experiências sensoriais, a nossa colheita de informações e para os nossos relacionamentos com os outros. Embora os muitos papéis que desempenha raramente sejam apreciados, é uma das partes mais notáveis e altamente versáteis do corpo humano ³.

Simplificando, a pele é a cobertura flexível e contínua do corpo que protege os nossos órgãos internos do ambiente externo. Ela protege-nos do ataque de agentes físicos, químicos e microbianos e protege-nos da maioria dos raios nocivos do sol, enquanto trabalha arduamente para regular a temperatura do nosso corpo. Longe de ser uma barreira impermeável, no entanto, a pele é uma bainha seletivamente permeável. Esta está trabalha incessantemente como uma sentinela vigilante. A pele também é lar de centenas de milhões de microrganismos, que se alimentam dos seus resíduos e secreções ³.

Ao longo da jornada de aproximadamente seis milhões de anos da linhagem humana, a nossa pele viajou e evoluiu connosco, através de uma miríade de mudanças de clima e estilo de vida ³. A nossa pele reflete a nossa idade, a nossa ancestralidade, o nosso estado de saúde, a nossa identidade cultural e muito do que queremos que o mundo saiba sobre nós. Pessoas de todas as culturas conhecidas modificam a sua pele de alguma forma, muitas vezes usando marcação e manipulação deliberadas para transmitir informações altamente pessoais sobre si mesmas para os outros ³.

A pele humana é única em três aspetos. Primeiro, é nua e suada. Exceto pelo couro cabeludo, a virilha, as axilas e a face masculina, os nossos corpos são efetivamente sem pêlo. Esta é uma característica que nos separa obviamente da maior parte dos outros mamíferos. O segundo atributo distintivo da pele humana é que ela surge naturalmente em uma ampla gama de cores, desde o castanho mais escuro, quase preto, até o marfim mais pálido, quase branco. A terceira maior distinção da pele humana é que ela pode ser utilizada como uma superfície

para decoração. A nossa pele não é apenas uma cobertura passiva que trai a nossa idade ou estado fisiológico. É uma tapeçaria pessoal potencialmente mutável que diz ao mundo quem somos ou quem queremos ser. E, ao contrário da publicidade involuntária proporcionada pela nossa própria cor da pele, as decorações que colocamos na nossa pele são formas deliberadas e voluntárias de propaganda - a pele torna-se um cartaz social, servindo como nosso “cartaz publicitário e a embalagem”³.

Mais do que qualquer outra parte do corpo, a nossa pele impregna-nos de humanidade e individualidade e constitui a peça central do vocabulário da personalidade³. Algumas das propriedades mais importantes da pele estão relacionadas com a luz solar. A nossa pele tem a incrível capacidade de não apenas servir como um escudo protetor contra os efeitos nocivos da luz solar, mas também utilizar parte da mesma luz solar em benefício do corpo, iniciando o processo de produção de vitamina D ali mesmo na pele³.

A pele é composta por camadas com diferentes propriedades físicas e químicas. Esta construção laminar, ou em camadas, confere à pele a sua resistência a abrasões e perfurações e permite evitar a absorção da maioria das substâncias. As duas principais camadas da pele, a epiderme e a derme, diferem notavelmente na composição e função (Figura 4)³.

A camada mais externa da pele, a epiderme, protege-nos dos oxidantes ambientais e do calor, ao mesmo tempo que oferece alguma resistência à água, à abrasão, ao desenvolvimento de manchas, aos micróbios e a muitos produtos químicos. A epiderme é composta principalmente por um tipo especializado de epitélio que consiste em camadas múltiplas, ou estratos, de células achatadas³. A própria superfície da epiderme é sua camada mais notável, o estrato córneo (Figura 5). A eficácia da pele como uma barreira contra agressões ambientais de todos os tipos, especialmente stresse oxidativo, como radiação ultravioleta (UVR), ozono, poluição do ar, microorganismos patológicos, oxidantes químicos e drogas aplicadas topicamente, depende principalmente da integridade do estrato córneo³.

A introdução de várias substâncias na pele pode causar respostas irritativas ou imunológicas, sendo descrita uma série de efeitos colaterais aos pigmentos de tatuagens ⁸. Essas manifestações incluem reações inflamatórias agudas, dermatite de contato ⁹, reações fotoinduzidas, reações liquenóides ⁸, reações granulomatosas, reações pseudolinfomatosas ¹⁰ e lúpus eritematoso discóide ¹. Reações inflamatórias agudas aparecem imediatamente após a tatuagem devido a lesão física dos tecidos e injeção do pigmento na pele desaparecendo após 2 a 3 semanas. O tratamento consiste em aplicação tópica de corticosteróides. Reações tardias ocorrem semanas ou até anos após a tatuagem. A dermatite alérgica de contato é clinicamente caracterizada pela presença de lesões eczematosas limitadas à área da tatuagem. Os aspectos histopatológicos são caracterizados por acantose, espongirose e infiltrado linfocitário perivascular ¹¹.

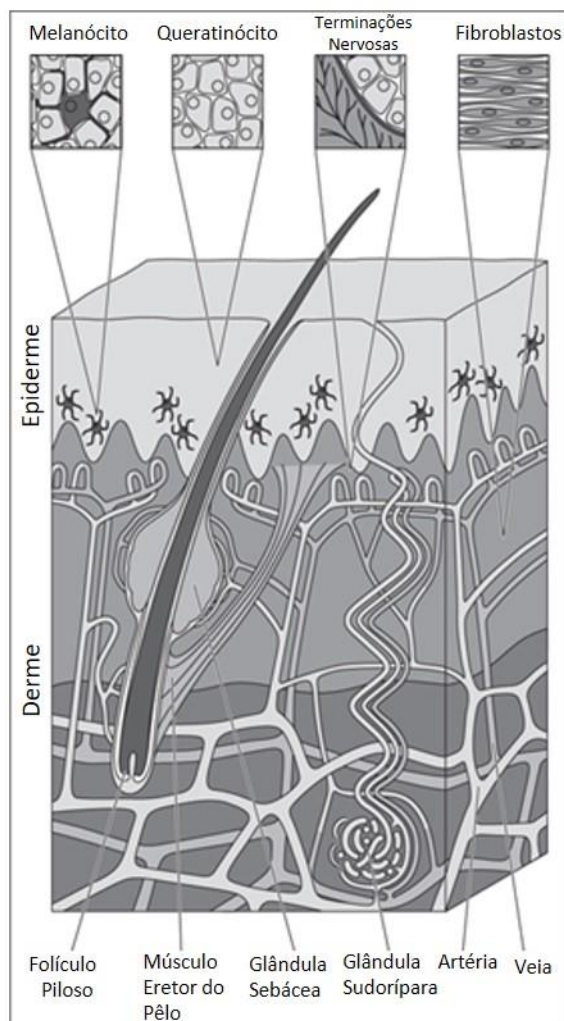


Figura 4 – Esquema de uma seção típica de pele humana, onde se mostra a sua construção laminar e algumas das glândulas e células imigrantes que são mais importantes para a sua função. (Jennifer Kane, 2005)³

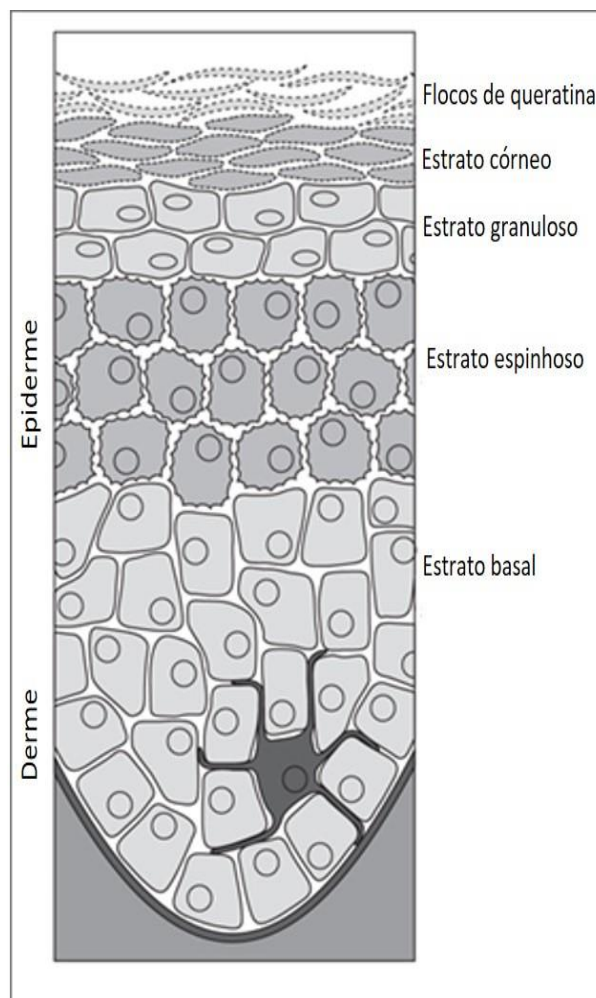


Figura 5 – Epiderme humana, com as suas quatro camadas constituintes e um único melanócito, em forma de aranha, próximo da interface com a derme. A produção contínua de novos queratinócitos no estrato basal ajuda a manter a epiderme em boas condições. Filamentos de queratina que fornecem suporte estrutural e resistência à abrasão são produzidos enquanto estão no estrato espinhoso. No estrato granuloso, as células – com grânulos internos visíveis – morrem e movem-se para o estrato córneo. (Jennifer Kane, 2005)³.

2.2. Tinta de tatuagem

2.2.1. Constituição

A tinta de tatuagem é apresentada sobre a forma de suspensão de partículas, de um ou mais pigmentos insolúveis, cujo tamanho varia de 10^{-6} m (micropartículas) a 10^{-9} m (nanopartículas). Estes pigmentos são dispersos no seio de um solvente adequado, que distribui os pigmentos uniformemente na matriz fluida resultante, de modo a evitar a sua aglomeração e facilitar a sua injeção na pele ⁶.

Os pigmentos são geralmente resistentes à decomposição por agentes físicos, químicos e biológicos, e como tal, uma vez injetados na pele, estes tendem a manter-se permanentemente ⁶.

A quantidade e as proporções de pigmento total no produto variam muito, encontrando-se geralmente dentro de um intervalo de 10 a 30%; de acordo com alguns estudos científicos, há no entanto a possibilidade de haver tintas que contenham até 50% de pigmento total ⁶.

Com base na sua origem, os pigmentos podem ser divididos em três grupos principais:

- Pigmentos vegetais:

Os pigmentos vegetais não são numerosos, destacando-se de entre eles o negro de carvão, que é utilizado nas tintas negras e que tem origem na combustão incompleta de produtos petrolíferos pesados, como alcatrão de carvão fóssil ou de pirólise de gordura ou óleo vegetal ⁶.

- Pigmentos inorgânicos:

Os pigmentos inorgânicos são produzidos principalmente a partir de minerais, em que se incluem os óxidos e sais de elementos metálicos e semi-metals. Os pigmentos mais utilizados são a grafite (associada a cinza-prata e cinza-chumbo), os óxidos de ferro (castanho-cinza e vermelho-escuro), e o dióxido de titânio e o sulfato de bário, que são usados para cores brancas ou para aclarar tons mais escuros ^{6,12}.

- Pigmentos orgânicos

Os pigmentos classificados como orgânicos são aqueles que são produzidos sinteticamente, sendo estes responsáveis por 80% de todos os pigmentos usados na indústria de tatuagem, tendo como principais razões o forte poder de coloração, resistência à luz, resistência enzimática, baixa dispersão e custos de produção relativamente baixos ⁶.

São principalmente moléculas orgânicas sintéticas, pigmentos azóicos, e pigmentos policíclicos, e que na sua generalidade apresentam uma ampla gama de cores. Baseado em grupos funcionais e grupos cromóforos na sua estrutura química, existem diferentes classes de pigmentos orgânicos sintéticos ⁶.

Os pigmentos mais utilizados pertencem ao grupo dos corantes mono-azo e di azo (vulgarmente conhecidos como corantes azo); estes são compostos sintéticos com o grupo azo típico e dois átomos de azoto central na estrutura molecular; são geralmente sintetizados a partir de amins aromáticas primárias que são diazotizadas e acopladas com fenóis ou amins aromáticas secundárias. De fato, o principal grupo cromóforo dos compostos azo é o grupo diarilazo ($Ar-N = N-Ar$), que é derivado de moléculas mais simples (compostos orgânicos de nitrogénio, onde o átomo de N está ligado a um ou mais orgânicos, alquilo ou radicais arílicos) ^{6, 3}

Se um dos radicais é um anel aromático, pode ser chamado de amina aromática. De acordo com alguns estudos, a partir da clivagem na derme por enzimas humanas dos corantes azo, em tempos diferentes, as amins aromáticas podem ser libertadas. A figura 6 mostra como o pigmento vermelho 5 pode ser dividido

em três aminas aromáticas, duas das quais, p-creasidina e o-toluidina, são carcinogénicas ⁶.

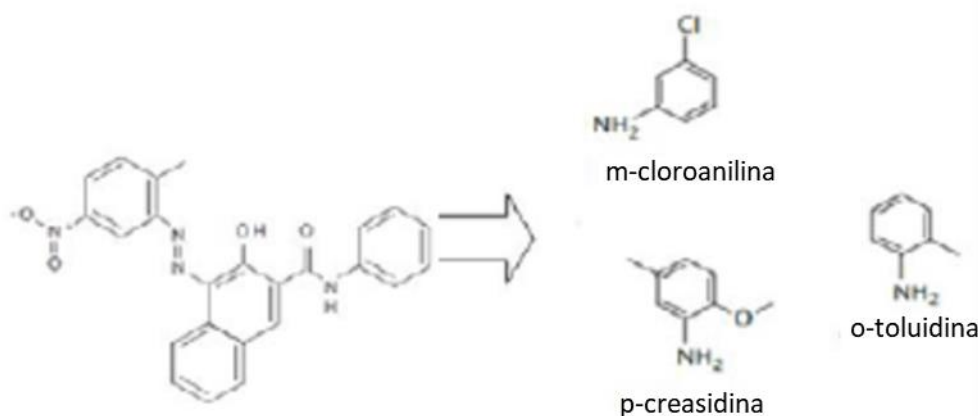


Figura 6 - Clivagem e redução do pigmento vermelho 5. Adaptado de Ferraglio 2016

Assim, pode esperar encontrar-se uma ampla gama de elementos no tecido humano tatuado - entre eles os sensibilizadores à base de níquel (Ni), crómio (Cr), manganês (Mn) e cobalto (Co) - como partes de pigmentos que dão cor ou contaminação de elementos ^{13,14}.

As tintas de tatuagem podem conter hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) numa gama de concentrações, que são relatadas como carcinogénicas, mutagénicas e podem representar outros riscos para a saúde da pele. ^{15,16}.

Embora as tintas de tatuagem modernas contenham principalmente pigmentos orgânicos, os metais pesados ainda apresentam destaque, seja como cromóforos, aditivos de sombreamento ou como contaminantes. ¹⁶

O papel dos sais metálicos nas reações alérgicas das tatuagens tem sido suspeito durante muitos anos. O crómio, níquel e cobalto apresentam os limites aceites pela alergologia ($>1\mu\text{g/g}$) em 62,5%, 16,1% e 1,8% dos casos, respetivamente ¹⁷. No entanto, o papel destes sais é difícil de provar na prática, principalmente por duas razões: 1. os testes reproduzem imperfeitamente a fisiopatologia da tatuagem, sendo que a negatividade ou a positividade dos testes de tinta ou sais metálicos se tornam difíceis de interpreta; Será “os testes reproduzem imperfeitamente a fisiopatologia da tatuagem, e um resultado

negativo ou positivo dos testes de tinta aos sais metálicos é difícil de interpretar”, e 2. o facto de na composição da tinta estarem presentes aditivos além de sais metálicos que podem ser a causa de reações alérgicas ¹.

As tintas de tatuagem podem conter impurezas químicas, que podem ser provenientes de matérias-primas ou da fabricação de cores de tatuagens. ⁶. A análise de tintas comerciais mostra que o titânio, bário, alumínio e cobre são utilizados predominantemente como constituintes de corantes, enquanto o antimónio, arsénio, cádmio, crómio, cobalto, chumbo e níquel tendem a ser contaminantes, ou terem origem no uso indevido de algum pigmento. Os respetivos tamanhos de partículas estão dentro da faixa submicrométrica ou podem ser nanopartículas verdadeiras (partículas menores que 100 nm). Alguns óxidos metálicos (por exemplo, óxido de alumínio, óxido de titânio) são intencionalmente adicionados como nanopartículas para criar efeitos especiais, sendo que o seu destino e efeitos no corpo humano permanecem desconhecidos ¹⁶.

O número de pessoas com uma ou mais tatuagens tem aumentado constantemente, e corantes e pigmentos tradicionalmente usados estão a ser substituídos por corantes que nunca foram usados antes ¹⁶.

As impurezas químicas mais frequentes são os HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e as AAPs (aminas aromáticas primárias) ^{6,18}.

HPA é um termo genérico para combinações poliaromáticas, com origem da combustão de material orgânico, por exemplo, óleo fóssil, alcatrão e madeira; também é encontrado no fumo de escape dos carros e no fumo dos cigarros ⁶.

O negro de carbono, pigmento utilizado com mais frequência na tatuagem, deriva da combustão incompleta do alcatrão de carvão fóssil ou da clivagem de gordura e óleo vegetal podendo, portanto, incluir o HPA como uma impureza química ⁶.

Existem mais de 100 PAHs diferentes e a AIPC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro) classificou-os como os mais perigosos e prejudiciais à saúde⁶.

Está provado que uma exposição repetida a certos tipos de HPAs pode aumentar consideravelmente a ocorrência de cancro ⁶.

Impurezas como os AAPs também podem estar presentes em tintas de tatuagem já em fase de fabricação, ou libertadas por corantes azoicos por decomposição química ou enzimática ⁶.

Outras impurezas podem incluir metais pesados, como chumbo, mercúrio, cádmio e cromo, cuja toxicidade é amplamente conhecida. ⁶.

A contribuição das tintas de tatuagem para a carga corporal total sobre os elementos tóxicos, e as identidades e gamas de tamanho das partículas de pigmento que migram das camadas subepidérmicas da pele para os linfonodos nunca foram investigadas analiticamente em humanos antes. ¹²

Assim, sem que o mecanismo e a natureza dos agentes causais sejam conhecidos, a proibição de certos ingredientes terá pouco efeito. Por isso, torna-se urgentemente necessário o estabelecimento de um marco legal que considere a tatuagem como um cenário único de aplicação. ¹⁶.

2.2.2. Toxicidade

Os cromóforos em tintas de tatuagem consistem em corantes orgânicos e uma ampla gama de sais metálicos. ¹⁹⁻²¹. Um grande problema para a avaliação toxicológica das tintas de tatuagem é a ausência de dados apropriados para composição de tinta e toxicologia ¹⁶.

Os sais de metal foram preferencialmente utilizados em formulações e misturas anteriores. Como tendência geral, o alumínio, o bário, o cobre, o ferro e o estrôncio são frequentemente os principais componentes metálicos ^{22,23}. No entanto, metais tóxicos como manganês, chumbo e vanádio também foram relatados em altas concentrações por $\mu\text{g/g}$ de tinta. ¹⁶

As análises mostraram uma tendência na redução e substituição destes elementos (por exemplo, sais de mercúrio e cádmio ou óxidos de cromo e cobalto), embora essas substâncias ainda sejam detetáveis em concentrações que variam de $\mu\text{g/kg}$ a mg/kg de tinta ²². Entretanto metais como titânio, cobre e alumínio são encontrados na tinta em concentrações tão altas tais como 180,9 g/kg, 31,3 g/kg e 5,9 g/kg, respectivamente, e uma pesquisa realizada na

Dinamarca reportou concentrações muito elevadas de metais tóxicos, como crómio (31 mg/kg), níquel (18 mg/kg) e chumbo (10 mg/kg).²³ Por causa das suas elevadas concentrações em tintas de tatuagem, estes elementos dominam o foco analítico, enquanto conservantes e impurezas parecem ser considerados um problema menor (Figura 7)¹⁶.

Os pigmentos podem ser suscetíveis à clivagem, como é o caso da dissociação catalisada por ácido do pigmento vermelho 57: 1²⁴. Além disso, muitos corantes contêm substâncias inerentemente problemáticas, como AAPs, nitrosaminas, pigmentos metálicos ou vários HPAs (incluindo o benzo[a]pireno), e as formulações usadas para a tatuagem também podem conter fenóis, formaldeído ou ftalatos¹⁶.

Os cromóforos aromáticos em tatuagens estão sujeitos a foto-decomposição²⁵⁻²⁷. Além do efeito puramente cosmético da diminuição da cor, alguns dos produtos de decomposição são suspeitos ou conhecidos como carcinogénicos para o homem.¹⁶

Geralmente, os corantes azo ou bisazo têm tendência a decompor-se no grupo azo, e quaisquer processos metabólicos são lentos. No entanto, a baixa solubilidade não é uma característica de todos os corantes e componentes da tinta e, estando depositados na pele ao longo da vida, até o metabolismo lento pode tornar-se relevante. Além disso, alguns pigmentos contêm nanopartículas, que possuem diferentes características biocinéticas (isto é, diferentes propriedades de distribuição, metabolismo e excreção)¹⁶.

Além disso, as tatuagens fazem parte da depuração natural da pele. Laux et al.²⁸, 2015 alegam que um murganho SKH -1 tatuado, com até 32% de pigmento vermelho 22 injetado é eliminado após sua aplicação, e um estudo inicial em pessoas estimava que a depuração de pigmento era de 87% a 99%^{29,30}. Devido à baixa solubilidade e à ausência de depuração, os respetivos pigmentos permanecem potencialmente disponíveis sistemicamente. Consideradas em conjunto, as evidências indicam que os corantes da tatuagem estão sujeitos ao metabolismo da fase um (acontece principalmente no fígado e envolve reações

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

tais como oxidação, redução e hidrólise). Até que ponto e quais os órgãos além da pele podem ser afetados é desconhecido ¹⁶.

Da mesma forma, os potenciais efeitos carcinogénicos locais e sistémicos de tatuagens e tintas de tatuagem não são claros (Figura 7). A descoberta de que tintas comerciais podem conter HPAs potencialmente carcinogénicos em concentrações de 0,14-201 µg/g já levou a repetidos apelos de cautela ³¹. Embora os respetivos HPAs permaneçam parcialmente no local da injeção, foram relatadas concentrações de até 11,8 µg/g de tecido nos gânglios linfáticos locais.¹⁶

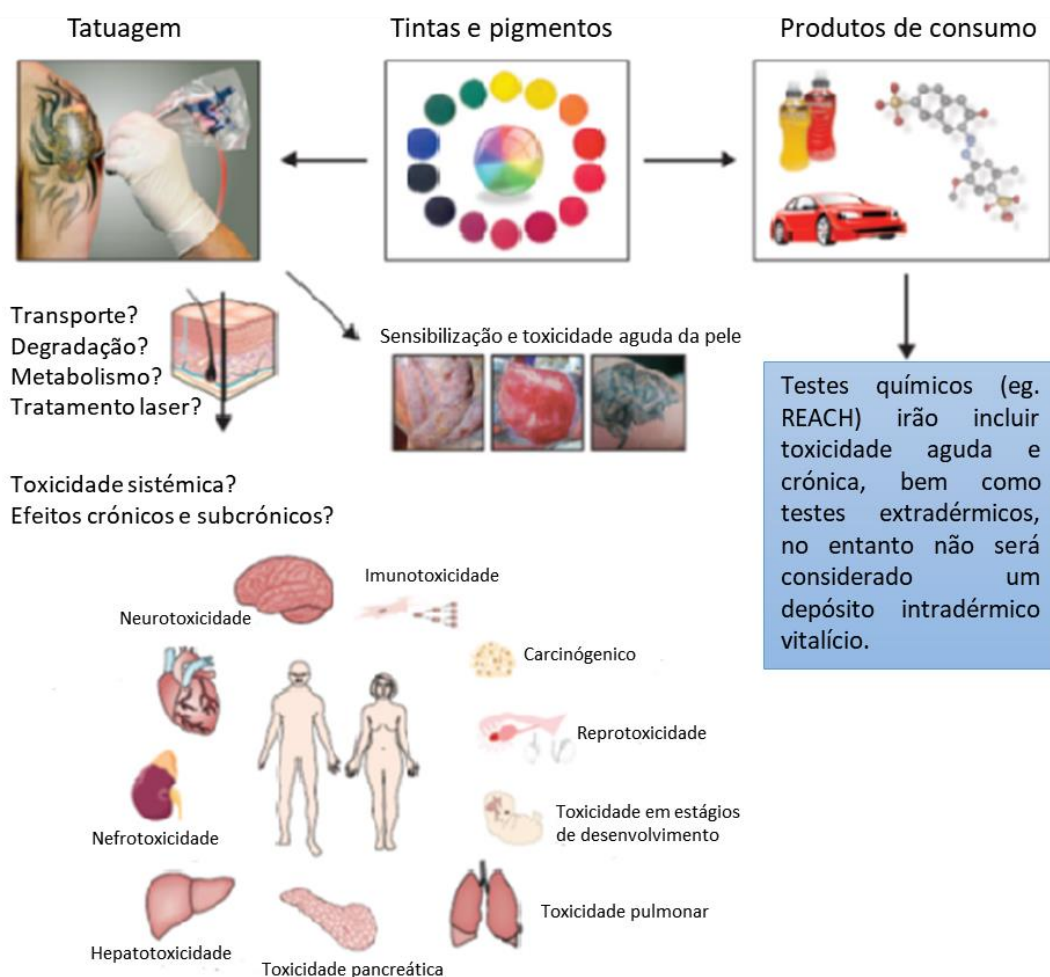


Figura 7 – Desafios relacionados com a avaliação toxicológica da tatuagem.

A maioria dos pigmentos e corantes de tatuagem tem origem em substâncias usadas para dar cor a alimentos e produtos de consumo. Enquanto os testes toxicológicos com este último tipo de produtos abordam rotineiramente o problema da potencial toxicidade por via oral, bem como questões de toxicidade dérmica extra e sensibilização, muito pouco é tido em conta relativamente às consequências futuras de um depósito intradérmico vitalício. Legislação REACH = Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (na Europa). Adaptado de Laux *et al.* 2015 ¹⁶

Uma extensa revisão da literatura científica relatou um número aparentemente baixo de cerca de 50 casos de cancro de pele, possivelmente relacionados com tatuagens. ³². Portanto, até agora, qualquer associação deve ser considerada como coincidência ¹⁶.

2.2.3. Reações adversas

O indivíduo tatuado tem em média 100-300 cm² de superfície de pele tatuada com uma concentração de pigmento variando de 0,60 a 9,42 mg/cm² (valor médio de 2,53 mg/cm²) ^{5,6}.

As nanopartículas de pigmentos podem alcançar o sistema linfático e, portanto, acumular-se nos gânglios linfáticos loco-regionais; tais partículas ou produtos provenientes da transformação metabólica de alguns pigmentos podem atingir a corrente sanguínea e ser transportados para os órgãos vitais ³³.

Até aos dias de hoje, nenhum sistema de classificação diagnóstica, que categorize e especifique complicações relacionadas à tatuagem, foi desenvolvido, devido à falta das ferramentas epidemiológicas necessárias a uma recolha sistemática e de dados e a sua análise ⁶.

Do ponto de vista médico, a tatuagem envolve transpor a barreira da pele e, portanto, traz algum risco de infeção, pois a superfície da pele não é estéril. Cerca de 1 a 5% das pessoas tatuadas têm infeções bacterianas relacionadas com tatuagem, logo depois de a receber. Estas infeções podem ser infeções cutâneas locais superficiais ou casos sistémicos mais graves, com agentes patológicos abrangendo estirpes bacterianas específicas, bem como

comunidades multibacterianas, fungos ou vírus transmitidos pelo sangue, como hepatite C ou B ou HIV. ¹⁶.

Embora difíceis de tratar, infecções por fungos e vírus são raras ^{17, 19,34}.

Além disso, as tintas têm sido subestimadas como fonte de contaminação bacteriana ³⁵. Investigadores relataram que até 20% das tintas amostradas estão contaminadas, com contagens bacterianas de até 10^8 unidades formadoras de colônias por mL, incluindo tintas rotuladas como estéreis. As contaminações podem ter origem em práticas de fabricação precárias, ou então o resultado do uso da água da torneira como um diluente não estéril ¹⁶.

Experiências realizadas na Dinamarca mostram que alguns eventos adversos crônicos são dominados por reações de natureza alérgica, com o vermelho revelando-se como a cor mais problemática ²³. As reações podem aparecer meses ou anos após a realização da tatuagem ¹⁶. Este estudo concluiu que as reações alérgicas produzidas pelas tatuagens se desenvolvem lentamente e é improvável que sejam causadas por um alérgeno diretamente presente na tinta da tatuagem. Além do níquel como contaminante, as tintas de cor vermelha estão entre as poucas tintas que frequentemente testaram. ^{19,36,37} Na produção de tintas modernas o uso de sulfureto de mercúrio (o cinábrio ou vermelhão, pigmento de cor vermelha viva), é banido, mas no passado, o seu uso veio a demonstrar que este pigmento é um alérgeno importante ^{38,39}.

O vermelho continua a ser das cores mais utilizadas nas tatuagens e, portanto, o potencial alergénico registrado é altamente relevante. Apesar disso, a razão pela qual permanece como um problema não é conhecida. ^{17,40}. Para alguns pigmentos mais antigos à base de cádmio, o potencial fotossensibilizador deste metal tem sido sugerido como um dos motivos. Outra possibilidade seria uma reação contra aminas aromáticas primárias específicas (AAPs), sendo que estas se apresentam como produtos de clivagem de pigmentos azo orgânicos. ¹⁶

Até ao momento, não foram encontrados casos de cancro nos gânglios linfáticos relacionados com áreas de pele tatuada, embora os linfonodos de cor escura, que contenham pigmento de tatuagem, sejam rotineiramente removidos e

avaliados microscopicamente em conexão com a cirurgia de sentinela dos nodos malignos na pele ⁶.

Não há relatos na literatura médica sobre cancro linfomatoso, ou seja, linfoma maligno e leucemia causada por tatuagens. Isso é considerado notável, porque o linfonodo é o órgão de primeira passagem mais importante para pigmentos de tatuagem, ou seja, o órgão ao qual as substâncias nos pigmentos da tatuagem chegam primeiro e na forma mais concentrada. Este órgão, em contraste com a derme, contém muitas células em proliferação, que podem potencialmente ser expostas a um carcinogéneo, isto é, uma substância cancerígena da tinta de tatuagem ⁶.

No entanto, a questão do metabolismo é contestada, pois alguns investigadores argumentam que a baixa solubilidade torna os respetivos pigmentos biologicamente indisponíveis ³³, tornando-os basicamente inertes. De fato, a persistência da coloração da tatuagem indica que os processos metabólicos são lentos ⁶.

No entanto, nos dias de hoje não existem regulamentações específicas sobre nanopartículas na indústria de tatuagem. Até agora, no entanto, qualquer associação entre tintas de tatuagem e indução de neoformações malignas não é comprovada pela literatura médica ⁶.

A ocorrência de cancro em tatuagens pode ocorrer tanto na pele diretamente tatuada, quanto nas áreas da tatuagem que não são tatuadas e não possuem pigmento de tatuagem ⁶.

Não há evidências científicas de associação entre tatuagens e tumores. A grande maioria dos casos de cancro de pele é induzida principalmente pela radiação UV e não pelo hipotético potencial carcinogénico dos constituintes químicos das tintas de tatuagem ⁶.

Quanto aos tumores em outros locais onde possam surgir partículas de pigmento, ou derivados de clivagem enzimática e de fotólise, não há relatos de ocorrências de cancro nos linfonodos regionais, embora, como órgãos de primeira passagem, eles sejam frequentemente expostos a pigmentos de tatuagem (têm sido relatados valores até 11,8 µg/g) ⁴¹. Também não há relatos

de cancro nos órgãos internos relacionados com tatuagens. Finalmente, não há relatos de pessoas tatuadas, que possuem grandes áreas de pele tatuada, que tenham contraído doenças de pele ou órgãos internos, incluindo cancro, o que poderia estar relacionado às referidas tatuagens ⁶.

2.3. Legislação

Juntamente com a regulamentação, a padronização é um elemento importante para a implementação de requisitos de alta qualidade para tatuagens. A normalização das abordagens à padronização nacional e internacional poderia, portanto, ajudar a implementar a qualidade e a segurança pública mais rapidamente do que a regulação pessoal. Por último, a conscientização deve ser levantada em tatuadores e pessoas tatuadas de que uma tatuagem, além de ser um aspeto da arte, envolve uma exposição interna vitalícia a uma mistura de ingredientes que não foram caracterizados com relação a possíveis efeitos adversos à saúde. ¹⁶.

Na Resolução ResAP (2003) 2, o Conselho Europeu declarou especificações para tintas para tatuagem, a sua composição aceitável, rotulagem, marcação, esterilidade, etc., com uma lista negativa de aminas aromáticas que poderiam ser cancerígenas ou mutagénicas ²³.

A Resolução proibia conservantes e introduzia embalagens fechadas estéreis de uso único. A Resolução introduzia informações ao consumidor, mas não considerava qual o nível de educação, ou quais as qualificações que um tatuador deveria ter. No entanto, a Resolução atualizada ResAP (2008) 1 permite o uso limitado de conservantes, e que tatuagens subsequentes possam ser feitas de tinta de tatuagem retirada de recipientes multiuso maiores que já foram abertos. O requisito de embalagem estéril de uso único foi omitido ²³.

Existe disponível *online* uma base de dados de tintas de tatuagem e produtos de maquilhagem permanentes, que foram testados de acordo com ResAP (2008) 1 do Conselho Europeu, onde são declarados os valores das concentrações máximas permitidas de alguns elementos em tintas de tatuagem (Tabela 1).

As resoluções do Conselho Europeu são recomendações de intervenção baseadas em considerações teóricas. Estas necessitam de validação epidemiológica clínica concreta ou recomendações específicas mais apropriadas, sobre como as tatuagens são implementadas na prática ²³.

Tabela 1 - Concentrações máximas de elementos metálicos permitidas de acordo com a ResAP (2008) 1 do Concelho Europeu.

Elemento	µg/g (ppm)	ng/g (ppb)
Arsénico (As)	2	-
Bário (Ba)	50	-
Cádmio (Cd)	0,2	-
Cobalto (Co)	25	-
Crómio (Cr) (VI)	0,2	-
Cobre (Cu), solúvel	25	-
Mercúrio (Hg)	0,2	-
Níquel (Ni)	O mais baixo possível	-
Chumbo (Pb)	2	-
Selénio (Se)	2	-
Antimónio (Sb)	2	-
Estanho (Sn)	50	-
Zinco (Zn)	50	-
Hidrocarbonetos policíclicos aromatos (HPA)	0,5	-
Benzo[a]pireno	-	5

2.4. Analitos modelo selecionados: Chumbo e Benzo[a] Pireno

No presente trabalho, como representantes de substâncias nocivas constituintes das tintas de tatuagem, foram selecionados como analitos o metal pesado chumbo (Pb) e o composto orgânico benzo[a] pireno (BaP).

2.4.1. Chumbo

O chumbo é um metal pesado, cinzento-azulado que advém naturalmente na crosta terrestre, no entanto não é um elemento particularmente abundante. Raramente é encontrado naturalmente como um metal, mas sim no seu estado oxidativo divalente (+2), ou tetravalente (+4), em depósitos de minério amplamente distribuídos em todo o mundo. Este metal está presente em vários compostos, como acetato de chumbo (II), cloreto de chumbo (II), cromato de chumbo (II), nitrato de chumbo e óxido de chumbo (II, IV). O chumbo puro é insolúvel em água; no entanto, os compostos principais variam em solubilidade de insolúvel a solúvel em água ⁴².

O chumbo pode ser considerado uma toxina ambiental omnipresente que induz uma ampla gama de disfunções fisiológicas, bioquímicas e comportamentais ⁴³. Os efeitos tóxicos do chumbo são os mesmos, independentemente da via de entrada no organismo. Os dados de dose para seres humanos são geralmente expressos em termos de dose absorvida e não em termos de níveis de exposição externa, ou miligramas por quilograma por dia (mg/kg/dia). A métrica mais comum de dose absorvida para chumbo é a concentração de chumbo no sangue (PbB), embora outros índices, como chumbo no osso, cabelo ou dentes, também estejam disponíveis ⁴⁴.

Relativamente à presença do chumbo em tintas de tatuagem e aos estudos realizados em torno desta problemática, destacam-se três estudos. Um foi conduzido na Alemanha em 2009 ²⁸ e consistiu num estudo de avaliação de compostos metálicos presentes nas tintas, englobando 148 tintas de tatuagem comerciais. Neste estudo, as amostras apresentaram uma grande quantidade de teor em cobre, ferro, crómio e zinco, e uma pequena quantidade de estanho, magnésio, selénio, arsénio, tálio, mercúrio, urânio e também de chumbo ²⁸. Em outro estudo, Jacobsen *et al.* (2012)²³ avaliaram 61 tintas comerciais, observando que 4 delas excediam o limite de chumbo permitido, sendo que para o chumbo não foi possível estabelecer um DNEL (nível derivado de exposição sem efeitos) para o designado efeito crítico (efeitos provocados no sistema nervoso em desenvolvimento) ²³. Mais recentemente, nos Estado Unidos da

América, M.E. Tighe *et al.* (2017)⁴⁵ conduziram um estudo sobre 226 tintas de tatuagem à disposição no mercado e através de técnicas de raios x identificaram 15 elementos metálicos: titânio, ferro, crômio, cobre, zircônio, manganês, níquel, nióbio, estrôncio, zinco, bário, molibdênio, chumbo, vanádio e tungstênio.

Tabela 2 - Efeito dos níveis de chumbo em crianças e adultos. Adaptado de Hanna-Attisha et al. 2016

Nível de Chumbo no Sangue	Efeitos na Saúde
Nível de chumbo abaixo de 5µg/dL	<u>Crianças:</u> Diminuição do desempenho acadêmico, QI e medidas cognitivas específicas; aumento da incidência de problemas e comportamentos relacionados com a concentração. <u>Adultos:</u> Diminuição da função renal e chumbo no sangue materno é associado à redução do crescimento fetal.
Nível de chumbo abaixo de 10µg/dL	<u>Crianças:</u> Atraso na puberdade, redução do crescimento pós-natal, diminuição do QI e audição. <u>Adultos:</u> Aumento da pressão arterial, risco de hipertensão e incidência de tremor essencial.

2.4.2. Benzo[a]pireno

O benzo[a]pireno (CAS No. 50-32-8) é um de entre os inúmeros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) que são formados durante a combustão incompleta da matéria orgânica. Embora estruturalmente relacionados, os compostos apresentam considerável heterogeneidade no número e disposição espacial dos seus anéis aromáticos fundidos (figura 8) ⁴⁶.

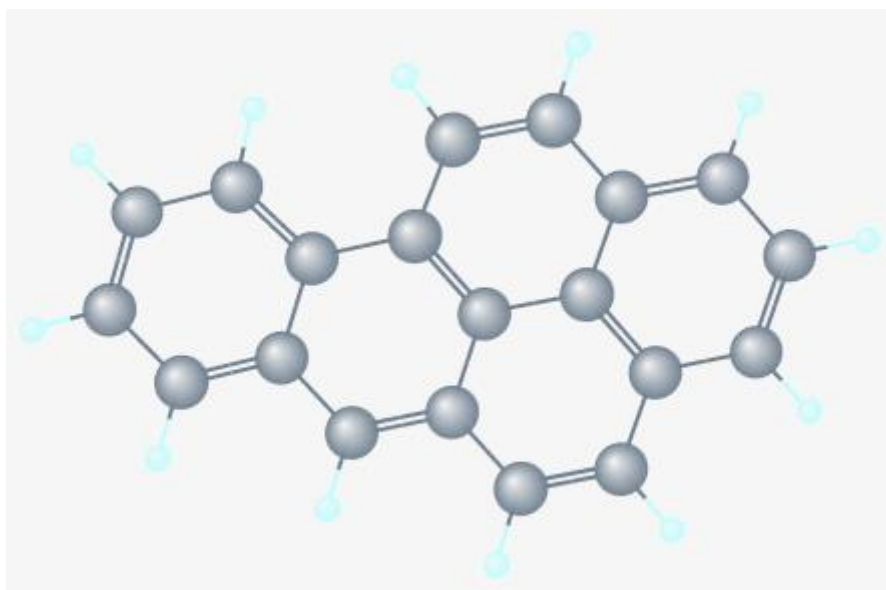


Figura 8 - Estrutura molecular do Benzo[a]pireno. Fonte: PubChem

Relativamente aos efeitos adversos que produz nos seres vivos, o benzo[a]pireno é o HPA estudado de modo mais completo. É uma substância indutora de cancro para a qual os dados toxicológicos servem como referências quantitativas para todo o subgrupo carcinogénico. Assim, embora os dados toxicológicos sobre a carcinogenicidade de outros HPAs sejam pouco complexos, estimativas quantitativas de sua potência carcinogénica podem ser expressas em relação à de B[a]P usando fatores de equivalência de toxicidade (FETs). A potência carcinogénica de B[a]P (definida como risco aumentado por mg/kg/dia) foi primeiramente estimada usando dados de vários sistemas de teste em animais ⁴⁶.

Essas substâncias são encontradas no ar, água, solos e nos sedimentos, geralmente em níveis vestigiais, excetuando naturalmente nas proximidades das suas fontes. Os HPAs estão presentes em alguns alimentos e em alguns produtos farmacêuticos à base de alcatrão de carvão que são aplicados na pele. O fumo do tabaco contém altas concentrações de HPAs ⁴⁷.

A Tabela 3 apresenta as principais características físicas e químicas do BaP.

Tabela 3 - Características físicas e químicas do benzo[a]pireno. Adaptado de Williams et al⁴⁸.

CAS No.	50-32-8
Peso molecular	252,32 g/mol
Cor	Amarelo pálido
Estado físico	Cristais monocíclicos/placas
Ponto de fusão	179 °C
Ponto de ebulição	310–312 °C (a 10 mm Hg)
Odor	Fraco
Solubilidade em água	1,6–2,3 mg/L a 25 °C: miscível com solventes hidrocarbonados
Coeficientes de partição:	
• Log Kow	5,97–6,06
• Log Koc	6,74
Pressão a 25 °C	5,5 – 5,6x10 ⁻⁹ mm Hg
Constante de Henry Law a 25 °C	4,9x10 ⁻⁷ atm.m ³ /mole
Fatores de conversão (considerando concentrações atmosféricas e que o volume molar a 25° C e 1 atm é 24,45 L/mol.)	1 ppm = 10,32 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0,097 ppm

A exposição ocupacional aos HPA ocorre principalmente por inalação e via contato com a pele⁴⁷.

A concentração máxima para os HPA é de 0,5 ppm e sendo que para o benzo[a]pireno é de 5 ppb. A concentração máxima recomendada para a HAP refere-se a uma concentração total e ainda não foi especificado qual HAP está incluída na concentração total²³.

3. Técnicas Analíticas

Entre os principais métodos de monitorização e quantificação de elementos metálicos (e semi-metálicos) e compostos orgânicos em tintas de tatuagem destacam-se normalmente técnicas como a ICP-MS e XRF e as LC-MS ou GC-MS, respetivamente. Estas técnicas são muito exatas, sensíveis, seletivas e possuem limites de deteção muito baixos, mas ao mesmo tempo são relativamente trabalhosas e demoradas e requerem equipamento consideravelmente dispendioso. Nas últimas duas décadas tem existido um interesse crescente na utilização de técnicas eletroanalíticas neste tipo de quantificação. Estas técnicas têm sido utilizadas com sucesso na análise de substâncias existentes em pequenas quantidades, e têm-se mostrado uma boa alternativa a técnicas mais complexas, devido sobretudo à simplicidade e rapidez dos procedimentos analíticos envolvidos, e ao baixo custo e portabilidade (requisito importante para análise *on-site* ou *in-situ*) do equipamento eletroquímico que é utilizado.

Deste modo, para analisar o chumbo e o benzo[a]pireno nas tintas de tatuagem procedeu-se neste trabalho ao desenvolvimento inovador de metodologias voltamétricas, utilizando em particular a voltametria de impulso diferencial. Complementarmente, de modo a obter alguma informação prévia sobre a composição química elementar das várias tintas de tatuagem, em especial sobre a presença do chumbo, utilizou-se também a espectrometria de fluorescência de raios X.

3.1. Espectrometria de Fluorescência de Raios X

A espectrometria de fluorescência de raios X (XRF - *X-ray fluorescence spectrometry*) é uma técnica analítica que permite analisar a composição química multielementar de uma amostra, de um modo relativamente simples e extremamente rápido⁴⁹. Resumidamente, a técnica baseia-se na medição da radiação fluorescente emitida na região dos raios X pelos átomos dos elementos

constituintes da amostra, quando esta é irradiada por um feixe primário de raios X com energia e intensidade elevadas⁵⁰. Quando a superfície de uma amostra é irradiada com um feixe de raios X, com energia suficiente para produzir o efeito fotoelétrico nos elétrons do cerne dos átomos, estes elétrons são removidos deixando os átomos momentaneamente ionizados e energeticamente instáveis, com lacunas nas camadas mais internas (Figura 9A). Face a esta instabilidade, os átomos irão relaxar imediatamente para o estado fundamental ($< 10^{-7}$ s) sofrendo uma série de processos energéticos que envolvem, entre vários fenómenos, transições dos elétrons dos níveis superiores ocupados para os níveis inferiores com lacunas (Figura 9B).

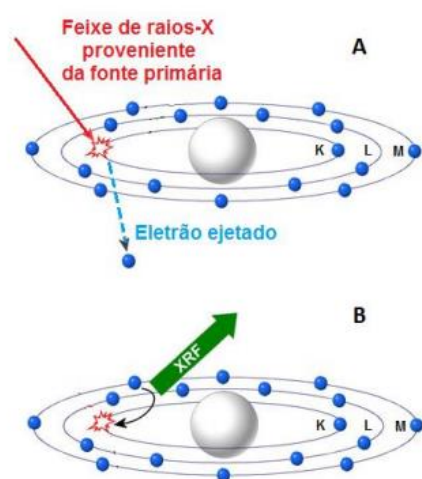


Figura 9 - Processo de fluorescência de raios X: (A) Um elétron da camada K é ejetado do átomo, por intermédio de um feixe externo de raios X ionizante, deixando uma lacuna nessa camada; (B) Esta lacuna é preenchida à custa das transições de elétrons de camadas superiores L, M, ou N, com respetiva emissão de fótons com energia característica dos raios X (raios X secundários) (Adaptado de ⁵⁰).

Nestas transições são emitidos fótons com energias na gama dos raios X (raios X secundários), cujo valor é igual à diferença de energia dos níveis envolvidos. Como cada elemento químico possui átomos com uma estrutura eletrónica particular, as diferentes transições energéticas que podem ocorrer nos átomos e as respetivas radiações fluorescentes emitidas serão características

de cada elemento. Deste modo, ao medir-se a energia e a intensidade dos raios X secundários emitidos por uma amostra irradiada e ao registrar-se essa informação, sob a forma de um espectro “Nº fotões contados” vs. Energia / keV, poder-se-á identificar, de entre os valores de energia com máximas intensidades (linhas/picos), quais os elementos químicos presentes e predominantes na amostra.

Na literatura da especialidade é possível consultar os diferentes valores de energia dos raios X secundários, que um átomo de um dado elemento pode emitir. Uma das principais fontes bibliográficas é o *X-ray Data Booklet* ⁵¹. Contudo, para identificar a presença de um dado elemento químico na amostra em análise, os espectrómetros de XRF atuais estão acoplados a um computador com um programa, que permite (salvo raras exceções) o rápido reconhecimento dos vários elementos químicos presentes. Normalmente, a espectrometria XRF pode ser implementada eficazmente numa análise multielementar, que se estende desde o sódio ($Z = 11$) até ao urânio ($Z = 92$). Em condições muito específicas ⁵² é possível proceder à quantificação destes elementos, dado que à partida a intensidade de uma dada linha de raios X de um átomo será maior, quanto maior for a concentração do elemento correspondente.

Quanto à interpretação correta dos espectros XRF, é necessário ter em conta uma série de efeitos que acompanham complementarmente o processo de fluorescência dos átomos da amostra, ou que podem ter origem nos instrumentos utilizados. Em conjunto, estes efeitos podem determinar fortemente o perfil do próprio espectro. Num espectro XRF podem aparecer picos ou uma radiação de fundo elevada devido: i) a interações na amostra, porque para além da fluorescência dos analitos, os raios X são sujeitos a fenómenos de dispersão de Rayleigh, Compton e Bragg, bem como a efeitos de matriz (por exemplo, absorção e excitação secundárias e atenuação de intensidade); ii) a interações no detetor, nomeadamente, picos sobrepostos (devido a limites na sua resolução), picos de soma e picos de escape; e, iii) à contribuição de qualquer fonte de raios X no sistema (e.g., da própria fonte, ou de qualquer material no trajeto do feixe primário, como o colimador ou invólucro de metal do detetor).

Atualmente, os espectrómetros de XRF oferecem algumas soluções e orientações para contornar ou minimizar alguns destes efeitos (e.g., uso de filtros entre o tubo de raios X e a amostra, para minimizar alguma da radiação de fundo)⁵⁰.

A instrumentação e as montagens utilizadas nos espectrómetros de fluorescência de raios X podem variar muito⁵², mas em todos os equipamentos XRF os componentes mais importantes são: i) as fontes de excitação, que podem ser um pequeno tubo de raios X ou uma pequena cápsula selada com um radioisótopo no seu interior; e ii) os detetores, que se distinguem quanto ao modo como são constituídos e como operam. Entre os detetores, os mais vulgares são os sistemas de espectrometria de energia dispersiva (EDS/EDX – *energy dispersive spectrometry of X-rays*), nos quais se mede diretamente a energia e intensidade dos vários raios X secundários, que os atingem.

3.2. Técnicas voltamétricas

3.2.1. Voltametria de Impulso Diferencial (DPV)

A voltametria de impulso diferencial (*DPV – Differential Pulse Voltametry*) é uma técnica de grande utilidade para medir níveis vestigiais de espécies orgânicas e inorgânicas⁵³. Através desta técnica é possível determinar compostos eletroativos até 10^{-7} – 10^{-8} mol/L⁵¹. Nesta voltametria é aplicado ao elétrodo de trabalho um potencial variável, relativamente a um elétrodo de referência, de acordo com o programa de potencial esquematizado na Figura 10. Este programa de potencial consiste na aplicação de uma série de impulsos de potencial sobre uma variação de potencial em forma de escada e é estabelecido e aplicado com muita exatidão, usando-se para o efeito um potencióstato. Face à variação de potencial, que vai sendo aplicada ao elétrodo de trabalho, são criadas condições para as substâncias em análise sofrerem redução ou oxidação eletroquímica na superfície deste elétrodo. Em consequência desta perturbação, transitará na su-

perfície do elétrodo de trabalho (e no circuito elétrico de que faz parte) uma corrente elétrica, cuja intensidade dependerá da magnitude e características dos fenômenos que aí decorrem. No caso de processos faradáicos (processos com transferência de elétrões e correspondentes a redução ou oxidação de espécies eletroativas) a intensidade de corrente elétrica será, dentro de certos limites, proporcional à concentração/massa/número de moles do analito em causa; Se este é oxidado electroquimicamente numa dada região de potencial, o número de elétrões transferidos para o elétrodo de trabalho será tanto maior, quanto maior for a quantidade do analito; Como a quantidade de elétrões transferidos por unidade de tempo pode ser traduzida e medida em termos de carga elétrica (C) por unidade de tempo (s), isto é amperes (A), a medição da intensidade de corrente elétrica constituirá uma medida indireta da quantidade de analito presente. Conforme é representado na Figura 10A, na DPV a cada impulso de potencial a corrente é medida em dois momentos; pouco antes da aplicação do pulso (em 1) e novamente no final da vida útil do pulso (após ~ 40ms, em 2). Para cada impulso, a diferença entre os dois valores de corrente [$\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$] é representada graficamente versus potencial aplicado, gerando-se o voltamograma (Figura 10B). O voltamograma resultante consiste em picos de corrente, ou área é, dentro de certos limites, proporcional à concentração dos analitos correspondentes ⁵³:

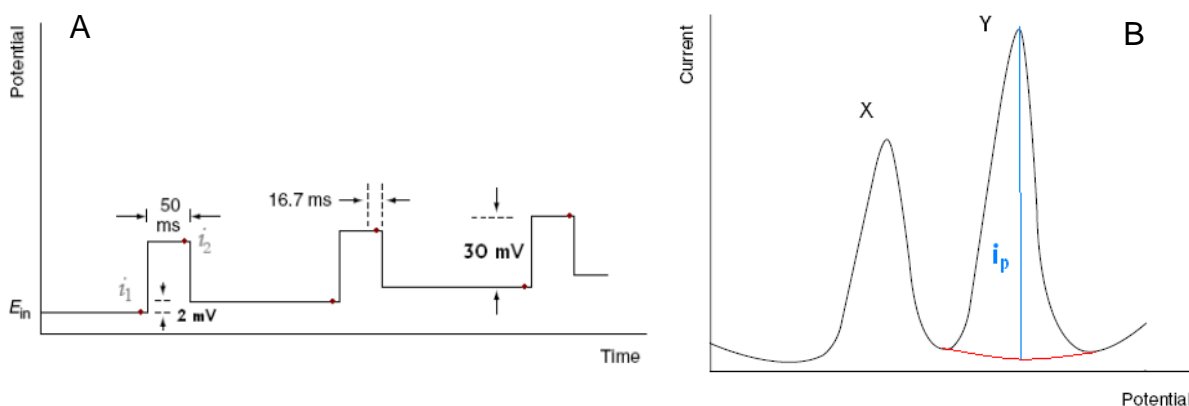


Figura 10 - (A) Sinal de excitação para voltametria de pulso diferencial. Adaptado de Analytical Electrochemistry by Joseph Wang ⁵³. (B) Voltamograma correspondente, considerando a presença de dois analitos eletroativos (X e Y).

O potencial de pico (E_p), outra característica fundamental do sistema eletroquímico em análise, é função das propriedades redox do analito, num dado meio e num dado elétrodo de trabalho. Por isso, e em condições ótimas, pode ser usado para identificar o analito, ou até diferenciá-lo de outros analitos.⁵³

Para aumentar ainda mais os limites de detecção desta técnica voltamétrica, a etapa de medição pode ser precedida de uma etapa de pré-concentração do analito. Nesta etapa adicional o analito é acumulado sob condições específicas e sob uma dada forma química no elétrodo de trabalho, durante um determinado tempo, antes de se fazer a medição voltamétrica propriamente dita. No caso de analitos metálicos que se encontram dissolvidos (na forma de catiões) numa solução em quantidades traço, é comum proceder-se à sua acumulação prévia no elétrodo de trabalho através da redução eletroquímica. Durante um certo período de tempo, o elétrodo de trabalho é polarizado de tal maneira (polarização catódica constante), que obriga os catiões do analito a sofrerem redução (por exemplo, $Pb(II) + 2e^- \rightarrow Pb$). No final desta etapa, o analito encontra-se na forma elementar depositado sobre a superfície do elétrodo de trabalho. De seguida, o elétrodo de trabalho é polarizado no sentido de potenciais mais positivos (polarização anódica variável), até que a um dado valor de potencial, o analito é reoxidado ($Pb \rightarrow Pb(II) + 2e^-$), redissolvendo-se na solução inicial. Por mais pequena que seja a quantidade de analito depositado no elétrodo, durante a sua reoxidação é possível medir valores de corrente proporcionalmente reduzidos, que permitem fazer a quantificação do analito. A esta voltametria mais completa dá-se o nome de voltametria de redissolução anódica de impulso diferencial (DPASV)⁵³.

4. Parte Experimental

4.1. Equipamento, Material e Soluções

4.1.1. Espectrômetro de fluorescência de raio X portátil

Para analisar a composição elementar das várias amostras de tinta de tatuagem, em especial, para identificar a presença de chumbo, usou-se preliminarmente a fluorescência de raios X portátil (pXRF). Para o efeito usou-se um equipamento portátil Bruker, o S1Tracer Portable XRF Analyzer III-SD



Figura 11 - Espectrômetro de fluorescência de raio X portátil

(Figura 11), que se baseia na tecnologia da fluorescência de raios-X de energia dispersiva (ED-XRF) e que usa como fonte de excitação um tubo de raios X de ródio (Rh). Neste estudo, foram usadas as seguintes condições: voltagem de aceleração de 40 kV, corrente de 30 μ A, tempo de acumulação de espectro de

120 s e filtro de Cu, Ti e Al (filtro vermelho com 0.0254 mm em cada um dos dois primeiros elementos e 0.305 mm no último elemento).

O equipamento é controlado por computador através do programa S1PXRF. Através deste e do programa Bruker Artax 7.2.1.1 pode identificar-se os elementos presentes nas amostras.

4.1.2. Potencióstato

As determinações voltamétricas foram efetuadas num Potencióstato/Galvanóstato AUTOLAB PGSTAT302N (Figura 12) da marca Eco Chemie, acoplado a um computador e controlado pelo software NOVA, versão 2.1. O programa de *software* permite o controlo do potencióstato bem como a aquisição, armazenamento e análise dos resultados.

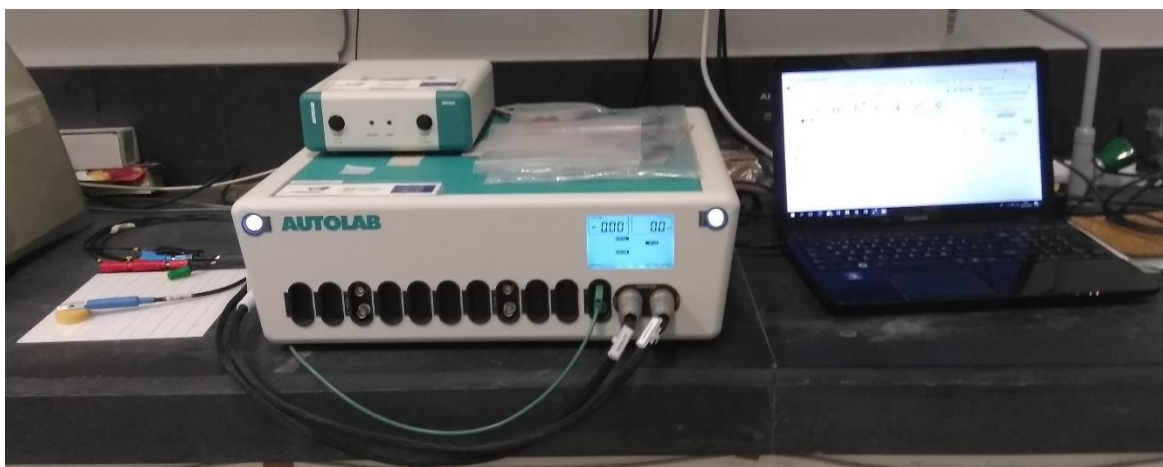


Figura 12 - Potencióstato/Galvanóstato AUTOLAB PGSTAT302N

4.1.3 Elétrodos utilizados na análise eletroquímica

4.1.3.1. Análise voltamétrica de chumbo

Na análise voltamétrica do chumbo utilizou-se um sistema de três elétrodos de tinta impressa, constituído por:

- Eléttrodo de trabalho – eléttrodo de filme de bismuto preparado a partir de eléttrodo de tinta impressa de carbono (*SPCE*) modificado com óxido de bismuto (III) (Bi_2O_3);
- Eléttrodo de referência (pseudo) – tinta de prata;
- Eléttrodo auxiliar – eléttrodo de tinta impressa de carbono.

Na Figura 13 apresenta-se o sistema utilizado (Ref. 110D, da DropSens), em que se mostra o eléttrodo de trabalho circular com um diâmetro 4 mm disposto no centro de uma placa de cerâmica, a qual possui um comprimento de 34 mm e largura de 10 mm. O pequeno retângulo cinzento nas proximidades do círculo é o eléttrodo de (pseudo)referência e o arco negro é o eléttrodo auxiliar.



Figura 13 – Sistema de três elétrodos de tinta impressa, com eléttrodo de trabalho de carbono modificado com óxido de bismuto (III). Este sistema permite a utilização de microvolumes de solução eletrolítica.

4.1.3.2. Análise voltamétrica de benzo[a]pireno

Na análise voltamétrica deste composto orgânico foi montado o seguinte sistema de três elétrodos:

- Eléttrodo de trabalho – Eléttrodo de diamante dopado com boro (*BDDE*); Este eléttrodo (Ref. D-0256-SA da Windsor-Scientific) tem a configuração de um disco com diâmetro efetivo de 3 mm;
- Eléttrodo de referência (pseudo) – Fio de prata com 1 mm de diâmetro;
- Eléttrodo auxiliar – Vareta de carbono vítreo (Ref. 6.1245.000 da Metrohm), com 65 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro.

Na Figura 14 apresenta-se o sistema de três eléttrodos utilizado, em que os três eléttrodos são suspensos e colocados em contacto com a solução do eletrólito de suporte. Esta solução, com volume de 200 – 220 μL , é colocada no poço de uma lâmina de vidro especial.

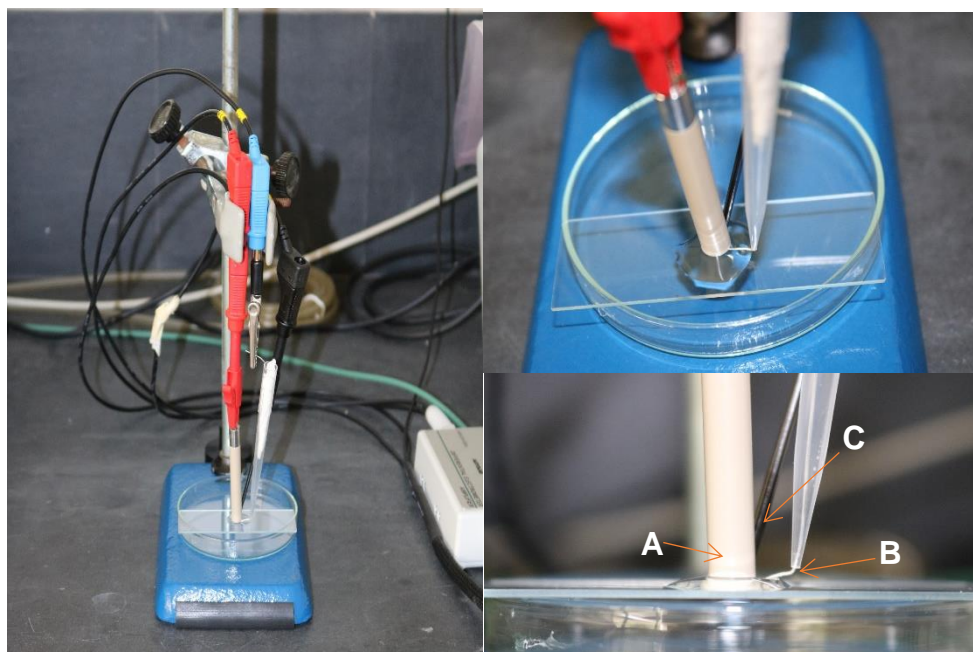


Figura 14 - Montagem do sistema de três eléttrodos utilizado na análise voltamétrica do benzo[a]pireno. Na imagem pode observar-se o eléttrodo de trabalho (A), o eléttrodo de referência (B) e o eléttrodo auxiliar (C).

4.2. Equipamento Auxiliar

Em relação ao restante equipamento utilizado, as pesagens foram efetuadas numa balança analítica da marca METTLER-TOLEDO, modelo AB204.

As amostras foram aquecidas numa placa de aquecimento (VMS-A – VWR).

Para a medição rigorosa de volumes foram usadas pipetas de vidro graduadas de diferentes capacidades, e micropipetas de volume regulável da marca GILSON, modelos P20, P100 e P1000, com capacidade máxima para 20, 100 e 1000 μL , respetivamente.

4.3. Preparação de soluções para a análise voltamétrica

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água de elevada pureza, obtida a partir do sistema Mili-Q, Simplicity® UV, Milipore Corp., France. As soluções de base não-aquosas foram preparadas com o solvente acetonitrilo (isocratic grade for liquid chromatography LiChrosolv®).

4.3.1. Soluções de eletrólitos de suporte

Para a realização deste trabalho experimental foram utilizados dois tipos de soluções de eletrólitos de suporte. Na análise voltamétrica do chumbo usou-se uma solução de tampão acetato 0.1 M, com pH 4.7 (Anexo 1), devido à compatibilidade do sistema de elétrodos utilizado e à boa resposta voltamétrica do chumbo neste meio. Na análise voltamétrica do benzo[a]pireno utilizou-se uma solução 0.1 M de perclorato de lítio em acetonitrilo com 9.1 % (v/v) em água. Esta solução foi obtida a partir de uma solução 0.5 M de perclorato de lítio em acetonitrilo (Anexo 1) e foi selecionada com base no trabalho de *Du et al.*⁵⁴, em que se observa uma resposta voltamétrica muito favorável do benzo[a]pireno.

4.3.2. Solução de trabalho de chumbo (II) 1000 ppb

A solução de trabalho de chumbo (II) 1000 ppb ($1000 \text{ ng/mL} = 1 \text{ ppm}$) foi preparada num balão de 10 mL. Para o efeito, transferiu-se 100 μL de solução *stock* 100 ppm de chumbo (II) (Anexo 1) para o respetivo balão, perfazendo-se com solução de tampão acetato 0.1 M, com pH 4.7 até à marca. Em seguida, a solução foi homogeneizada.

4.3.3. Soluções de trabalho de benzo[a]pireno 1000 ppb e 100 ppb

As soluções de trabalho de BaP 1000 ppb (1000 ng/mL) e 100 ppb ($100 \text{ ng/mL} = 0.1 \text{ ppm}$) foram preparadas em balões de 10 mL. Para o efeito, transferiu-se 100 μL e 10 μL de solução *stock* de BaP 100 ppm (Anexo 1) para cada um dos respetivos balões, perfazendo-se com acetonitrilo até à marca. Em seguida, as duas soluções foram homogeneizadas.

4.3.3.4. Preparação das soluções amostra para análise do chumbo

Utilizando como referência o trabalho que Prior ⁵⁵ desenvolveu com tintas de tatuagem, procedeu-se à digestão prévia das amostras, de modo a extrair o analito de interesse e minimizar os efeitos de matriz. Assim, colocou-se num copo uma gota de tinta (com massa de cerca de 30 mg), adicionando-se de seguida 2 mL de HNO_3 (*suprapur*). A mistura resultante foi aquecida numa placa de aquecimento até à *secura*, adicionando-se depois 1 mL do tampão acetato. Em seguida, a mistura voltou a ser aquecida até à *secura*. No final desta etapa o copo foi lavado sucessivas vezes com o tampão acetato, transferindo-se os líquidos de lavagem para um balão volumétrico de 10mL. Finalmente, perfez-se o volume do balão com o tampão acetato.

4.3.4. Preparação das soluções amostra para análise do BaP

Na preparação das soluções amostra para análise voltamétrica do BaP nas tintas de tatuagem optou-se por um número limitado de tintas negras comerciais. Foram selecionadas uma tinta-da-china (Tinta A) e uma tinta designada de

Eternal Black (Tinta B). Como ponto de partida para investigar se é possível detetar o BaP em extratos de tinta utilizou-se um procedimento de extração muito simples. O procedimento foi igualmente aplicado às duas tintas e consistiu em pesar uma massa apropriada (cerca de 30 mg, pesadas com exatidão) de cada tinta e em proceder à secagem rápida de cada uma delas (numa placa de aquecimento). Depois de secas, adicionou-se a cada uma delas 1 mL de acetoneitrilo (ACN), deixando-se a mistura em contacto durante 24 horas, com agitação esporádica. Posteriormente, uma alíquota de cada extrato (250 μ L) foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e diluída até à marca com ACN. Nos ensaios de dopagem, 200 μ L de cada um dos extratos diluídos foi dopado com 40 ng BaP (através da adição de 40 μ L de solução de trabalho de BaP 1000 ng/mL), obtendo-se uma concentração final de 166,67 ng/mL. As amostras não dopadas consistiram em 200 μ L de cada um dos extratos diluídos, aos quais se adicionaram 40 μ L de ACN.

4.4. Procedimento Experimental

4.4.1 Análise elementar das tintas por XRF

Cerca de 30 a 60 mg de cada amostra de tinta de tatuagem foram colocadas sobre a superfície de uma pequena porção de papel de filtro (Figura 15) e deixadas a secar ao ar durante 24 horas. Após esta etapa procedeu-se à análise XRF, colocando cada amostra seca, imobilizada sobre o papel de filtro, em cima do nariz do analisador XRF. Para evitar que a tinta de cada amostra pudesse cair sobre a janela do analisador XRF, utilizou-se uma pequena película protetora de parafilme. Uma pequena porção de papel de filtro sem qualquer tinta de tatuagem, conjuntamente com o filme protetor de parafilme constituíram o branco da análise XRF. Conforme já foi referido, a identificação dos elementos presentes em cada amostra de tinta é conseguida através do uso dos programas de software S1PXRF e Bruker Artax 7.2.1.1.



Figura 15 – Tinta de tatuagem previamente seca para colocação no nariz do analisador XRF.

4.4.2. Análise voltamétrica do chumbo

Para a análise do chumbo presente nas amostras de tinta de tatuagem foi utilizado um elétrodo de filme de bismuto, o qual foi preparado a partir de um elétrodo de tinta impressa de carbono modificado com óxido de bismuto (III). Para a formação do filme de bismuto colocou-se 100 μL de tampão acetato sobre o conjunto de três elétrodos de tinta impressa, os quais já estavam ligados ao potencióstato. Na formação do filme de bismuto, a qual envolveu a redução eletroquímica do Bi (III) presente no elétrodo de trabalho, foram estabelecidas as condições apresentadas na Tabela 4.

Após formação do filme lavou-se o conjunto de elétrodos com tampão acetato e colocou-se uma alíquota de 7 μL de amostra (preparada no ponto 3.3.4) no elétrodo de trabalho. Este conjunto foi depois colocado a secar numa placa de aquecimento por 10 minutos, a aproximadamente 100 $^{\circ}\text{C}$. Terminada esta etapa, o elétrodo foi retirado da placa e deixado arrefecer, sendo que no caso de se tratar de um branco (sem nenhuma adição de chumbo), pode prescindir-se da etapa de aquecimento e arrefecimento.

De seguida, o sistema de três elétrodos (com ou sem amostra) é ligado ao potencióstato, e sobre eles é colocado um volume de 50 μL de tampão acetato. Imediatamente a seguir procede-se à medição voltamétrica utilizando a voltametria de redissolução anódica de impulso diferencial, de acordo com as condições descritas na Tabela 4.

No caso de ser identificado no voltamograma de uma dada amostra, algum pico voltamétrico anódico devido ao chumbo, preparam-se novos elétrodos dessa amostra (de acordo com o procedimento acima descrito), mas com a adição conjunta de uma alíquota (μL) de solução de trabalho de chumbo (II) 1000 ppb. No presente caso utilizaram-se quatro adições de solução padrão, correspondentes a uma massa de padrão adicionado de 5, 10, 15 e 20 ng.

Caso não se verifique a presença de um pico anódico característico do chumbo na amostra analisada, é feita apenas mais uma medição com a mesma amostra no mesmo elétrodo e com a adição de 15 μl (15 ng) de solução de trabalho de chumbo (II) 1000 ppb. Este ensaio serve para despistar quaisquer dúvidas em relação à deteção e presença do elemento.

Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas na formação eletroquímica do filme de bismuto e na voltametria de redissolução anódica de impulso diferencial para a análise de chumbo (II).

Parâmetro	Preparação do Filme de Bismuto	DPASV
<i>Potencial de deposição (V)</i>	-1,200	-1,200
<i>Tempo de deposição (s)</i>	600	300
<i>Tempo de equilíbrio (s)</i>	-	
<i>Potencial de espera (V)</i>	-	-1,200
<i>Potencial inicial (V)</i>	-	-1,200
<i>Potencial final (V)</i>	-	-0,550
<i>Degrau de potencial (mV)</i>	-	5
<i>Duração do degrau de potencial (ms)</i>	-	250
<i>Amplitude do impulso (mV)</i>	-	50
<i>Duração do impulso (ms)</i>	-	50

4.4.3. Detecção voltamétrica de benzo[a]pireno

Com o objetivo de estabelecer as melhores condições experimentais, para detetar reduzidas quantidades de benzo[a]pireno num meio orgânico por voltametria de impulso diferencial, tomou-se como ponto de partida os trabalhos de Jeftic *et al.*⁵⁶ e Du *et al.*⁵⁴. Assim, sabendo que a resposta voltamétrica anódica do BaP em acetonitrilo é ampliada na presença de uma pequena fração de água, experimentaram-se várias misturas de perclorato de lítio (LiClO₄, eletrólito de suporte) em acetonitrilo com diferentes proporções de água. Conforme já foi antecipado previamente, a análise voltamétrica do benzo[a]pireno foi realizada numa solução de 0.1 M de perclorato de lítio em acetonitrilo com 9,1% (v/v) em água. Para avaliar como é que a resposta voltamétrica do BaP varia com a sua massa/concentração, na própria célula voltamétrica (Figura 14) foram preparadas soluções a partir de uma mistura de

40 μ L de solução de 0,5 M LiClO₄ com 160 μ L de uma mistura de volumes variáveis de acetonitrilo (ACN), às quais foi adicionado um volume de 20 μ L de água (por exemplo, para 20 ng de BaP na célula voltamétrica utilizou-se a mistura: 40 μ L LiClO₄ 0.5 M + 20 μ L BaP 1000 ng/mL + 20 μ L ACN + 20 μ L H₂O). Estando os três elétrodos ligados ao potencióstato procedeu-se à medição voltamétrica utilizando a voltametria de impulso diferencial, de acordo com as condições descritas na Tabela 5. Nestes ensaios realizou-se um par de medições voltamétricas, uma primeira sem adição dos 20 μ L H₂O e segunda com os 20 μ L H₂O.

Para avaliar a possibilidade de detetar o BaP em extratos de tinta de tatuagem, uma alíquota de 120 μ L de extrato diluído da amostra em análise (dopada ou não com BaP) foi transferida para a célula voltamétrica (Figura 14), adicionando-se de imediato 40 μ L de solução 0.5 M de perclorato de lítio em acetonitrilo mais 40 μ L de acetonitrilo. Com os três elétrodos ligados ao potencióstato procedeu-se à medição voltamétrica utilizando a voltametria de impulso diferencial, de acordo com as condições descritas na Tabela 5. Após a obtenção e registo digital do voltamograma adicionou-se à célula voltamétrica uma alíquota de 20 μ L de água Milli-Q, repetindo-se imediatamente a medição e o registo do voltamograma correspondente. No final de cada par de medições voltamétricas, removeu-se a solução da célula (ca. 240 μ L) e lavaram-se todos os elétrodos e o próprio suporte da solução. O elétrodo de diamante dopado com boro, em especial, foi polido com um pó muito fino de alumina (óxido de alumínio), existente para esse fim.

Tabela 5 - Condições experimentais utilizadas na voltametria de impulso diferencial para a detecção de BaP.

Parâmetro	DPV
<i>Tempo de equilíbrio (s)</i>	5
<i>Potencial inicial (V)</i>	0,350
<i>Potencial final (V)</i>	1,150
<i>Degrau de potencial (mV)</i>	5
<i>Duração do degrau de potencial (ms)</i>	500
<i>Amplitude do impulso (mV)</i>	25
<i>Duração do impulso (ms)</i>	50

5. Apresentação e Discussão de resultados

5.1. Análise elementar das tintas por Fluorescência de Raios X portátil (pXRF)

A partir dos espectros XRF obtidos para 70 tintas de tatuagem pode observar-se e confirmar-se (Anexo 2; Anexo 3), que a maioria delas contém elementos químicos que fazem parte de constituintes característicos de algumas tintas. Entre os principais elementos evidenciam-se o titânio (Ti), que resulta do óxido de titânio (branco de titânio, TiO_2) utilizado como pigmento branco, o vanádio (V), cuja presença pode dever-se ao uso de pentóxido de vanádio ou metavanadatos, utilizados como secantes das tintas, o ferro (Fe), que pode ter origem no uso de pigmentos à base de ocre ou sais de ferro, o cobre (Cu), que advém do uso de pigmentos ou corantes (especialmente orgânicos) de cor verde ou azul, e o zinco (Zn), que tem normalmente origem no uso de branco de zinco (ZnO). Em algumas das tintas analisadas evidencia-se ainda a presença de outros elementos, que também têm sido identificados em outras tintas de

tatuagem comerciais. Entres estes incluem-se o cálcio (Ca), o bário (Ba), o enxofre (S), o bromo (Br), o zircônio (Zr), o nióbio (Nb) e, pontualmente, o chumbo (Pb) ⁴⁵. A presença do cálcio pode dever-se ao uso do carbonato ou do sulfato de cálcio, enquanto a presença do bário, em conjunto com o próprio enxofre, pode ter origem no sulfato de bário. Estes sais são utilizados normalmente como pigmentos brancos ou como cargas das tintas (dar volume às tintas). Naturalmente, que a presença do enxofre pode também dever-se ao uso de uma grande variedade de outros compostos, quer inorgânicos quer orgânicos, e a presença de bário à presença de pigmentos de lago correspondentes (pigmentos produzidos através da precipitação de um corante orgânico com um aglutinante inerte/mordente contendo bário). Por sua vez, o bromo presente está provavelmente relacionado com o uso de corantes orgânicos, em que se inclui a eosina (p.e., a tetrabromofluoresceína). O zircônio deve-se provavelmente ao óxido de zircônio (ZrO₂), o qual é utilizado como pigmento branco ou um aditivo do branco de titânio. No entanto, tal como no caso do bário, não deve ser descartado o uso dos pigmentos de lago correspondentes ^{57,58}. Quanto ao nióbio, e até o vanádio, é possível que a sua presença seja devida à sua utilização como aditivo na preparação dos pigmentos à base de titânio, nomeadamente dos pigmentos de rútilo industriais ^{59,60}. O chumbo, um dos principais agentes tóxicos em foco neste estudo, foi detetado apenas em três tintas de tatuagem (Figura 16 e 17). A sua presença muito provavelmente deve-se ao uso indevido do branco de chumbo (pigmento branco, cujo uso é há muito proibido).

Acerca dos elementos químicos anteriores sabe-se que a sua presença nas tintas de tatuagem, em especial o vanádio, o bário, o bromo e o chumbo, constitui um potencial risco para a saúde humana se estes elementos se encontrarem em quantidades elevadas ⁴⁵. No entanto, os estudos existentes sobre a presença destes elementos nas tintas de tatuagem e efeitos que podem causar na saúde humana são ainda muito poucos e inconclusivos ²³. Por outro lado, a regulamentação sobre o uso destas substâncias nas tintas de tatuagem é praticamente inexistente. Por isso, pode afirmar-se que a deteção e

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

monitorização continuada destes elementos, nas tintas de tatuagem comerciais ou de fabrico artesanal, deve ser uma das primeiras medidas preventivas para mitigar o impacto negativo que podem ter na saúde humana.

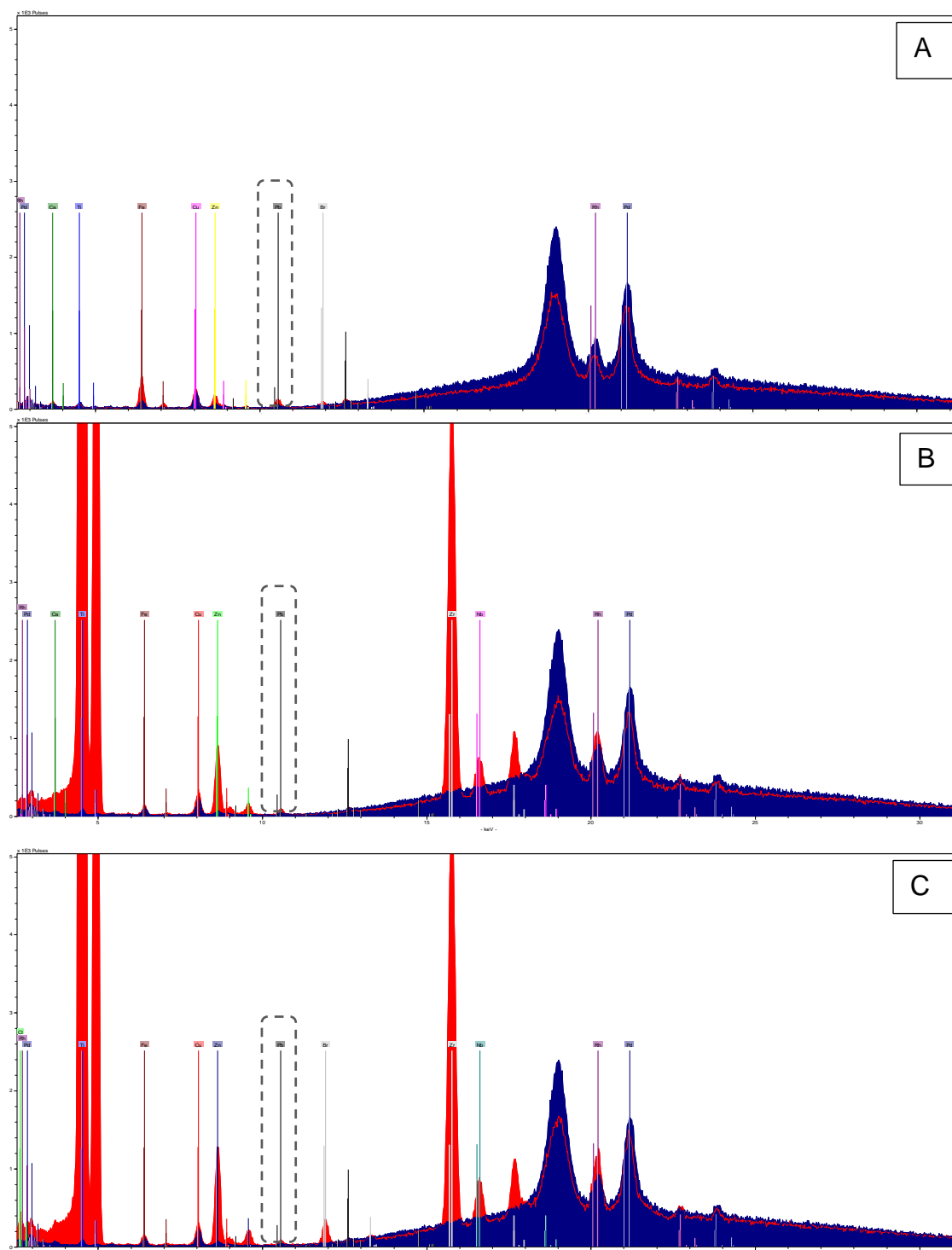


Figura 16 - Espectros de fluorescência de raios x (a vermelho) das tintas (A) TBCH (tinta com cor preta), (B) PTCH (tinta com cor branca), e (C) LVCH (tinta com cor lavanda), onde se evidencia o principal sinal do chumbo (ca. 10.55 keV), em conjunto com o espectro XRF (a azul) do parafilme + papel branco.

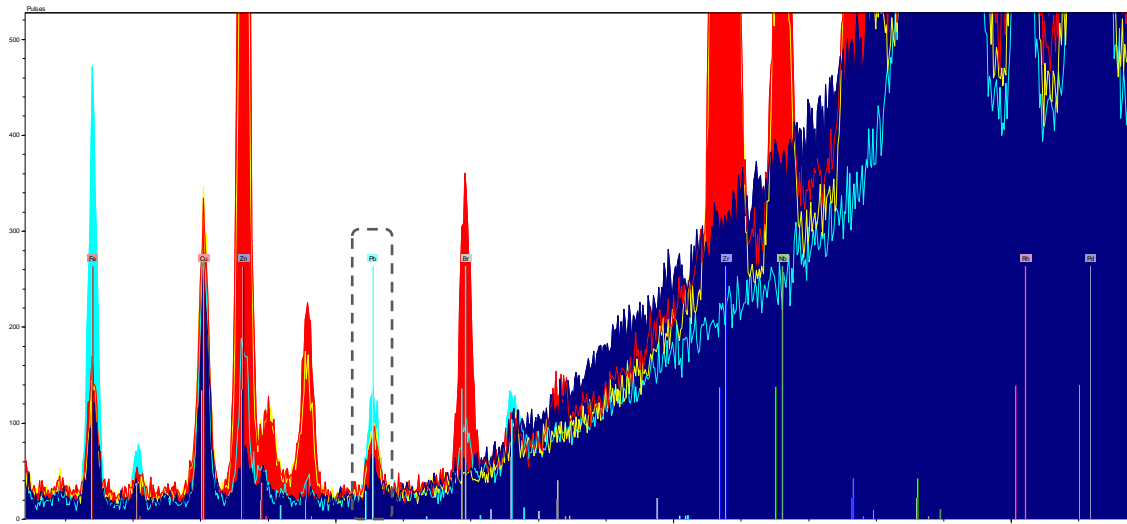


Figura 17 - Comparação dos espectros de fluorescência de raios x da tinta TBCH (espectro azul claro), PTCH (espectro amarelo), e LVCH (espectro vermelho), relativamente ao principal sinal do chumbo (Pb), em conjunto com o espectro XRF (a azul) do parafilme + papel branco.

5.2. Estudo prévio para a determinação voltamétrica de chumbo nas tintas de tatuagem

Os principais métodos não eletroquímicos utilizados até aos dias de hoje para determinação de elementos metálicos em matrizes complexas, como é o caso das tintas de tatuagem, são métodos que em regra são demorados e dispendiosos, como é o caso do ICP-MS ²³.

Como o método proposto neste trabalho é original e inovador, relativamente à análise de elementos metálicos em tintas de tatuagem, foi necessário proceder a estudos analíticos prévios, de modo a perceber quais seriam os procedimentos analíticos, condições e reagentes mais adequados para a determinação do chumbo. Deste modo, um dos aspetos estudados e avaliados foi a identificação de qual seria a melhor solução de eletrólito de suporte para a deposição do filme de bismuto. Segundo o folheto informativo sobre o uso do elétrodo de tinta impressa de carbono modificado com óxido de bismuto (III) e respetivas condições de formação do filme de bismuto, seria recomendável que este fosse

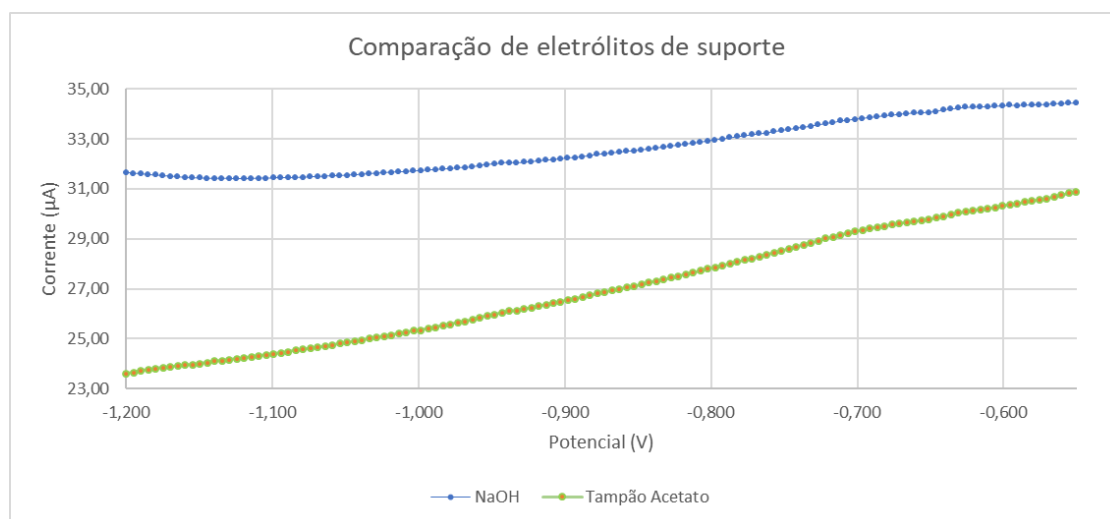


Figura 18 - Análise comparativa dos voltamogramas obtidos com elétrodos de filme de bismuto, formados em soluções de eletrólitos de suporte, 0.1 M NaOH e tampão acetato 0.1 M pH 4.7. Os dois voltamogramas foram obtidos em tampão acetato e na ausência de chumbo.

formado numa solução de KOH ou NaOH 0.1 M. No entanto, uma vez que as amostras foram preparadas em tampão acetato, optou-se por realizar a deposição do filme de bismuto também em tampão acetato, comparando-se depois o efeito de ambas as deposições na resposta voltamétrica de base do respetivo elétrodo (Figura 18). Nesta Figura pode observar-se que a utilização de tampão acetato como eletrólito de suporte é a mais adequada, pois a corrente capacitiva é inferior àquela que é apresentada pelo filme de bismuto formado em NaOH. Em consequência, espera-se uma maior sensibilidade na deteção voltamétrica do chumbo, no filme formado em tampão acetato.

No entanto, ainda antes da utilização de tampão acetato para a deposição do filme de bismuto foram realizados alguns testes básicos, com o objetivo de avaliar o comportamento eletroquímico da tinta, num elétrodo de filme de bismuto formado em hidróxido de sódio. Numa primeira abordagem juntou-se 3 gotas de tinta preta triple black da marca Eternal Ink, e 300 μL de tampão acetato, e levou-se depois ao ultrassons por 20min. Dessa solução retirou-se uma alíquota de 100 μL de sobrenadante e colocou-se em cima do elétrodo já previamente preparado e fez-se uma DPASV, da qual resultou um voltamograma (Figura 19) onde parece haver um pico de chumbo, ao mesmo tempo que o efeito da matriz revela-se muito elevado.

Posteriormente foi feita também uma avaliação da resposta do chumbo no elétrodo de tinta impressa de carbono modificado com óxido de bismuto. Para tal, foi realizada a deposição do filme de bismuto com NaOH, e foi colocado no

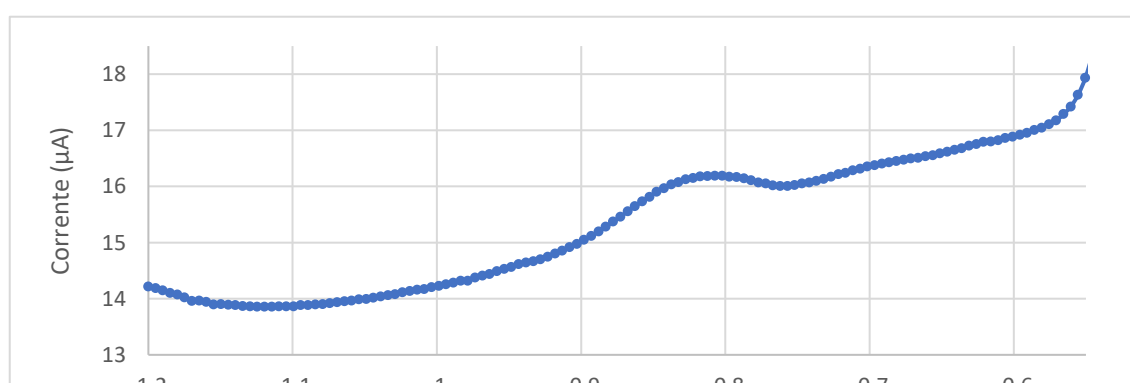


Figura 19 - Voltamograma de um extrato de tinta de tatuagem, obtido num elétrodo de filme de bismuto formado em meio hidróxido de sódio.

elétrodo 100 μL de tampão acetato em conjunto com 2 μL de solução de chumbo (II) 100 ppm e realizada uma DPASV, cujo resultado é apresentado no voltamograma da Figura 20.

Após a análise dos voltamogramas, e de acordo com a literatura, foi necessário fazer uma digestão das amostras de tinta, de modo a atenuar o efeito da matriz, e a permitir que houvesse uma extração do chumbo da própria tinta. Na sequência das digestões das amostras selecionadas foram realizadas para cada amostra várias DPASV. Caso o extrato de tinta evidenciasse a presença de um pico de chumbo faziam-se adições de 5 μL em 5 μL de solução de chumbo (II) 1 ppm, e as respectivas medições voltamétricas, das quais resultavam uma sequência de voltamogramas (Figura 21). Nestes ensaios utilizou-se um elétrodo de filme de bismuto formado em tampão acetato.

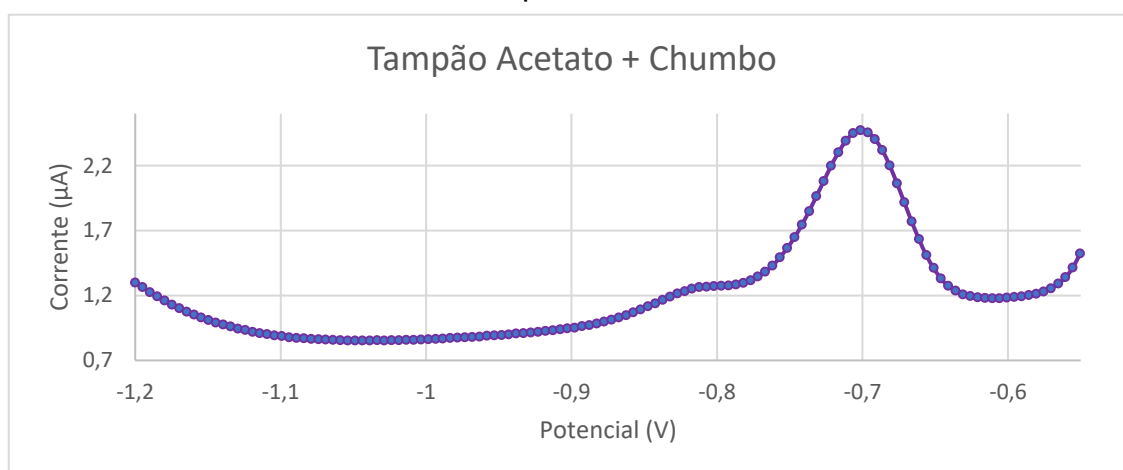


Figura 20 - Voltamograma obtido na sequência de uma DPASV num elétrodo de filme de bismuto formado em meio hidróxido e em tampão acetato com adição de chumbo (II).

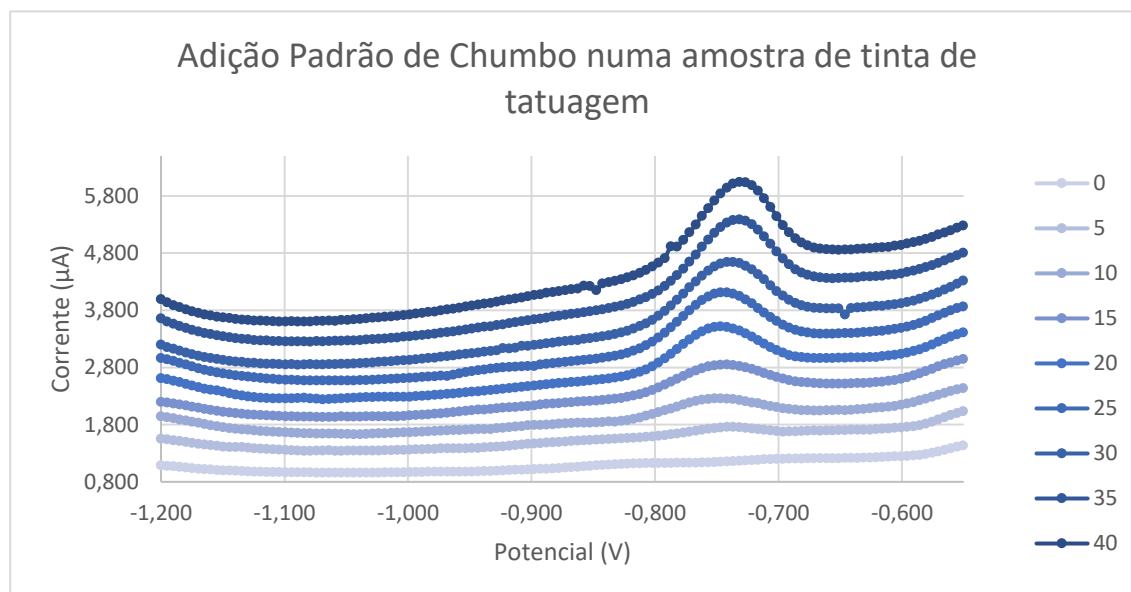


Figura 21 - Voltamogramas obtidos numa série de adições padrão de chumbo (II), caso o extrato da tinta manifestasse sinais da presença de chumbo.

A partir do conjunto de voltamogramas obtidos seria feita uma reta de adição padrão (altura do pico vs. massa Pb adicionada) (Figura 22), a qual seria extrapolada até à parte negativa do eixo das abcissas, para se obter a massa de chumbo presente em 100 mL de tinta utilizada para amostragem.

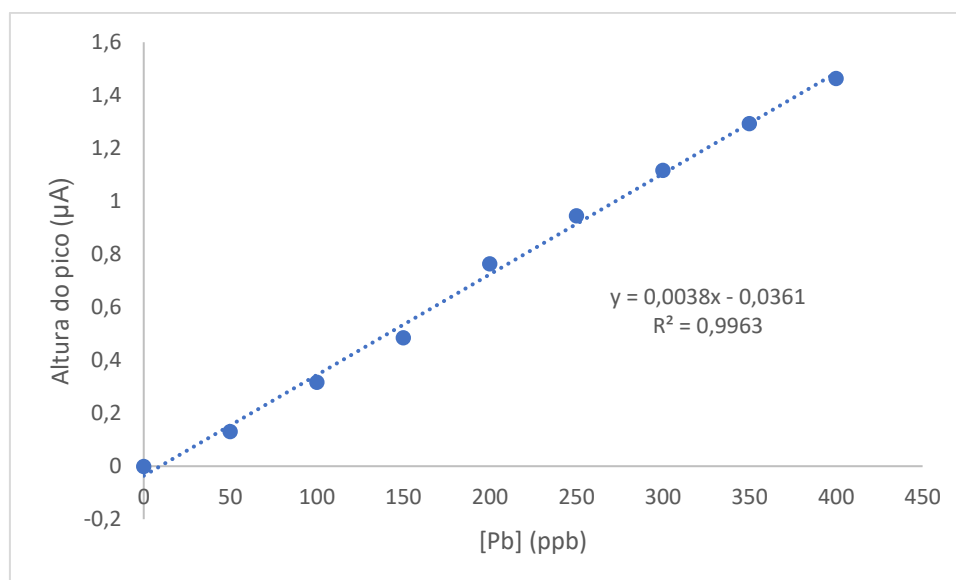


Figura 22 - Reta de adição padrão que evidencia a impossibilidade de determinar o chumbo (II) presente no extrato de tinta em análise.

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

Nesta fase pôde apurar-se, que o filme de bismuto formado em tampão acetato permite obter melhores resultados.

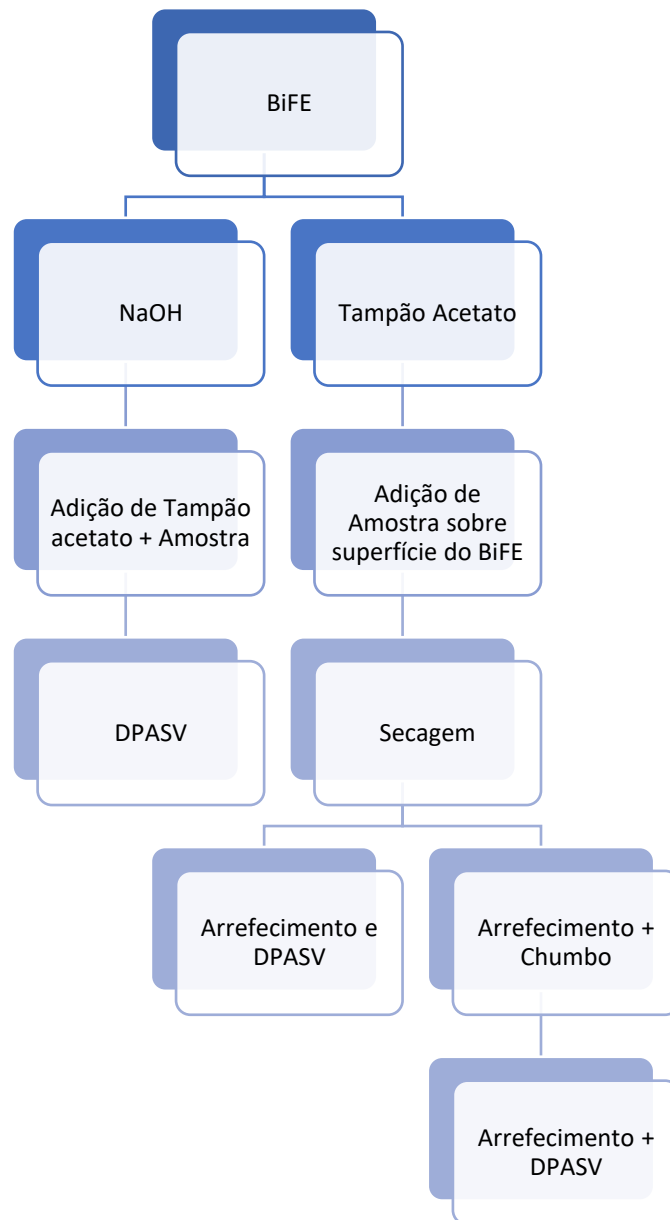


Figura 23 - Resumo esquemático dos procedimentos experimentais levados a cabo no estudo prévio.

5.3. Avaliação da presença de chumbo nas tintas de tatuagem

O desenvolvimento de um método voltamétrico de detecção e quantificação de chumbo em tintas de tatuagem, através da utilização de um elétrodo de tinta de carbono impressa modificado com filme de bismuto, foi um processo relativamente moroso e consistiu em várias etapas prévias de aperfeiçoamento. Entre as múltiplas variáveis estudadas destacam-se, a natureza do eletrólito de suporte utilizado na formação do filme de bismuto (NaOH 0.1 M versus tampão acetato 0.1 M pH 4.7) e o efeito produzido na resposta voltamétrica (na ausência e na presença de chumbo) do respetivo elétrodo, e o efeito da matriz da amostra na resposta voltamétrica deste filme.

Neste estudo prévio ficou estabelecido que a solução de eletrólito mais adequada para formar o filme de bismuto era a solução tampão acetato, e que a digestão prévia das amostras diminuía o efeito de matriz e aumentava a qualidade do sinal voltamétrico. Definidas estas condições, começou-se por realizar um estudo para avaliar qual o intervalo em que era possível detetar o chumbo através do método utilizado. Para cumprir este objetivo realizou-se uma série de medições voltamétricas, em que se usaram várias quantidades (massas) de chumbo (Figura 24).

Conforme se pode observar, o voltamograma de base (sem adição de chumbo, voltamograma verde na Figura 24) revela um pico voltamétrico que deve ser devido, muito provavelmente, a chumbo com origem no tampão acetato. Portanto, a sua contribuição deve ser tida em conta nos ensaios voltamétricos com as soluções amostra. Como neste ensaio existe uma relação de proporcionalidade aceitável entre o sinal analítico e a massa de chumbo presente (Gráfico 1B da Figura 24), foi possível estimar a contribuição em chumbo proveniente do tampão acetato. Esta é de 3.4 ng de Pb.

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

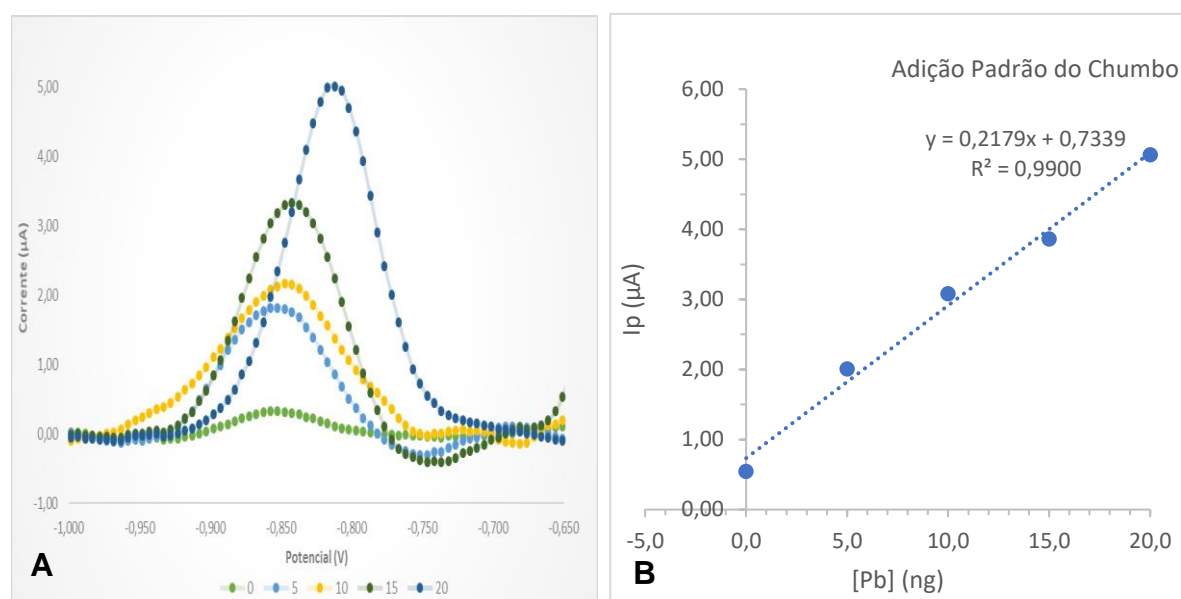


Figura 24 - No gráfico 1A podem ser observados os voltamogramas obtidos através da adição sucessiva de 5 μL de chumbo, até se atingir uma concentração de 20 ng. No gráfico 1B, através da intensidade do pico (I_p) retirada do gráfico 1A, obteve-se uma reta de adição padrão.

Antecipando que o efeito da matriz das soluções das tintas de tatuagem, mesmo que digeridas, poderia ter alguma influência na resposta voltamétrica do sistema chumbo/BiFE, procedeu-se a uma série de ensaios para avaliar qual a quantidade de amostra a utilizar, que permite obter um voltamograma bem definido e sem interferências consideráveis. Selecionando uma das soluções amostra de uma tinta com chumbo (a TBCH) realizou-se um conjunto de ensaios voltamétricos, em que se utilizaram cinco volumes diferentes dessa solução (nomeadamente, 5, 7, 8, 10 e 20 μL). Na Figura 25 resumem-se os resultados obtidos.

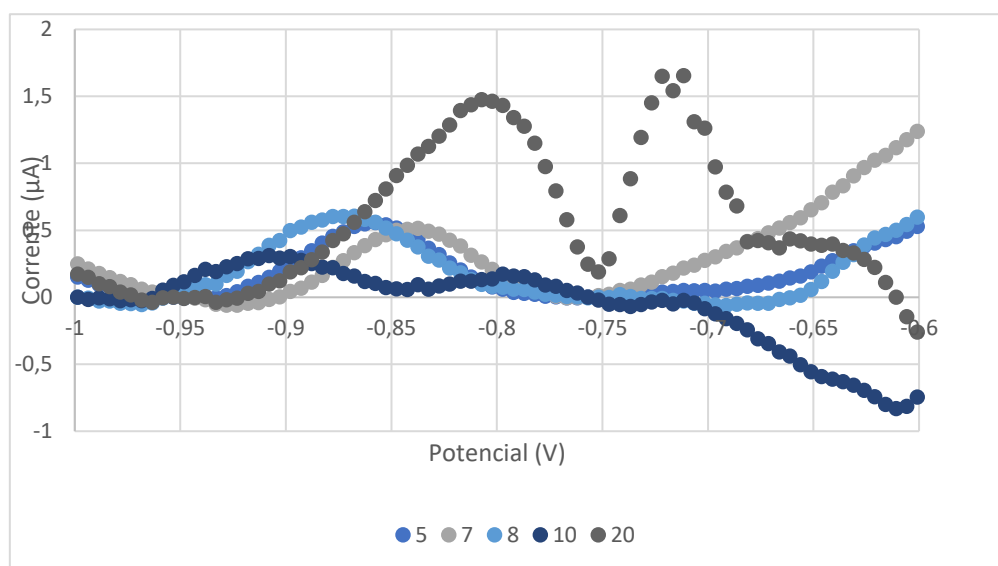


Figura 25- Voltamogramas obtidos em cada um dos ensaios em que se utilizou um volume específico de uma solução amostra com Pb (solução amostra TBCH).

A partir da Figura 25 pode observar-se que o pico voltamétrico do chumbo aparece tanto mais definido, quanto menor é o volume de amostra utilizado. Para quantidades maiores de amostra ($> 8 \mu\text{L}$), a indefinição do pico voltamétrico do chumbo e o aumento da complexidade do perfil do voltamograma tornam a sua interpretação mais difícil. Provavelmente, o efeito de matriz é maior neste caso e a saturação do eléctrodo, face a uma quantidade de chumbo mais elevada, é mais facilmente atingida. Com um volume de $7 \mu\text{L}$ parece obter-se um bom compromisso entre a quantidade de chumbo presente e a medição do respetivo sinal analítico, e por isso utilizou-se este volume, na análise voltamétrica de outras soluções amostra de tintas de tatuagem.

Selecionando aleatoriamente outras doze tintas, para as quais não foi possível detetar chumbo por XRF, procedeu-se à análise voltamétrica das respetivas soluções amostra, para averiguar a presença de chumbo. Adicionalmente, para a solução amostra da tinta TBCH foi ainda realizado um ensaio voltamétrico, diluindo a respetiva solução de $\frac{1}{4}$ (solução amostra TBCH_1_4). Na Figura 26 apresentam-se os respetivos voltamogramas e no Anexo 4 apresentam-se os voltamogramas individualmente. Analisando os voltamogramas pode observar-

se que, para além da solução amostra TBCH, há outras soluções amostra que contêm também chumbo. Entre estas destacam-se a EL01, NC08, EL07, NC05, NC12, EL13 e EL08. O voltamograma obtido com a solução amostra TBCH diluída de $\frac{1}{4}$ demonstra que pode haver alguma vantagem em minimizar o efeito de matriz, através de uma diluição posterior (Figura 27).

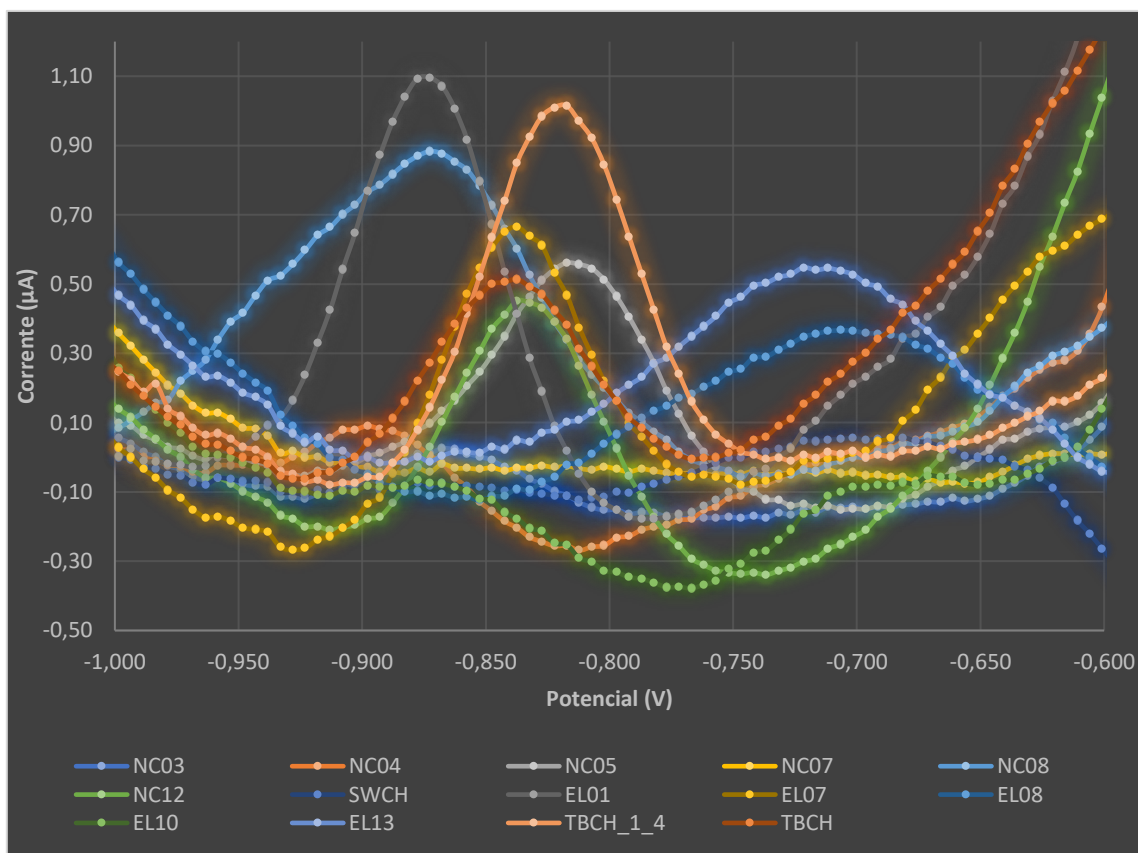


Figura 26 - Voltamogramas de cada uma das soluções amostra das tintas de tatuagem analisadas voltametricamente (volume de amostra colocado sobre o eletrodo, 7 µL)

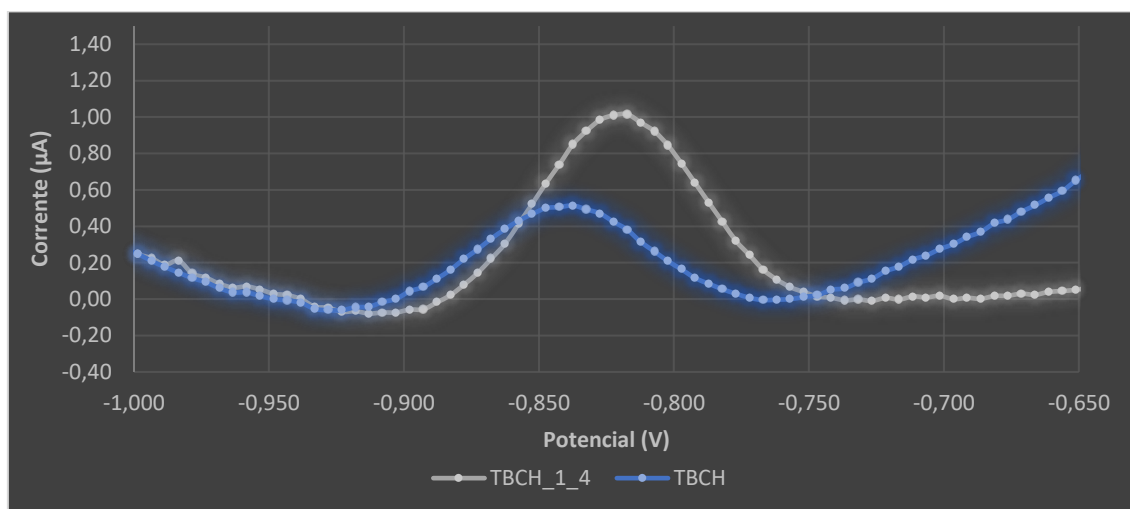


Figura 27 - Voltamogramas da solução amostra da tinta de tatuagem TBCH sem e com diluição de ¼.

No final desta parte procedeu-se à estimativa da concentração de chumbo presente por grama de tinta (em ppm), selecionando duas amostras. Na Tabela 5 apresentam-se os resultados. Conforme se pode observar, estas duas tintas apresentam um valor superior ao recomendado pelas normas europeias (2 ppm).

Tabela 5 - Quantidades de chumbo presentes nas tintas de tatuagem analisadas.

Tinta (código)	[Pb] (ppm)
TBCH	51,81
NC12	8,02

5.4. Voltametria de redissolução anódica de impulso diferencial (DPASV) vs. Fluorescência de raios X (XRF)

Após a realização dos dois métodos para a identificação do chumbo, foi possível perceber as diferenças relativas aos limites de detecção e sensibilidade de ambos. Ao analisar um conjunto de tintas por DPASV foi possível compreender que esta técnica apresenta um limite de detecção mais baixo do que a XRF e que também é muito mais sensível. Além de haver tintas que apresentavam, ainda que em quantidades vestigiais, indícios de chumbo na sua constituição, conforme foi possível verificar por DPASV, a XRF não revelou capacidade suficiente para a sua detecção, pois esta última técnica só detecta o metal se este estiver presente em grandes quantidades.

Para corroborar isto, fez-se uma análise XRF a um eletrodo que foi previamente utilizado num ensaio de DPASV, onde foi feita uma deposição de chumbo e onde era facilmente mensurável um pico voltamétrico do Pb. Conforme se pode observar nos espectros XRF da Figura 28, o Pb não foi detectado.

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

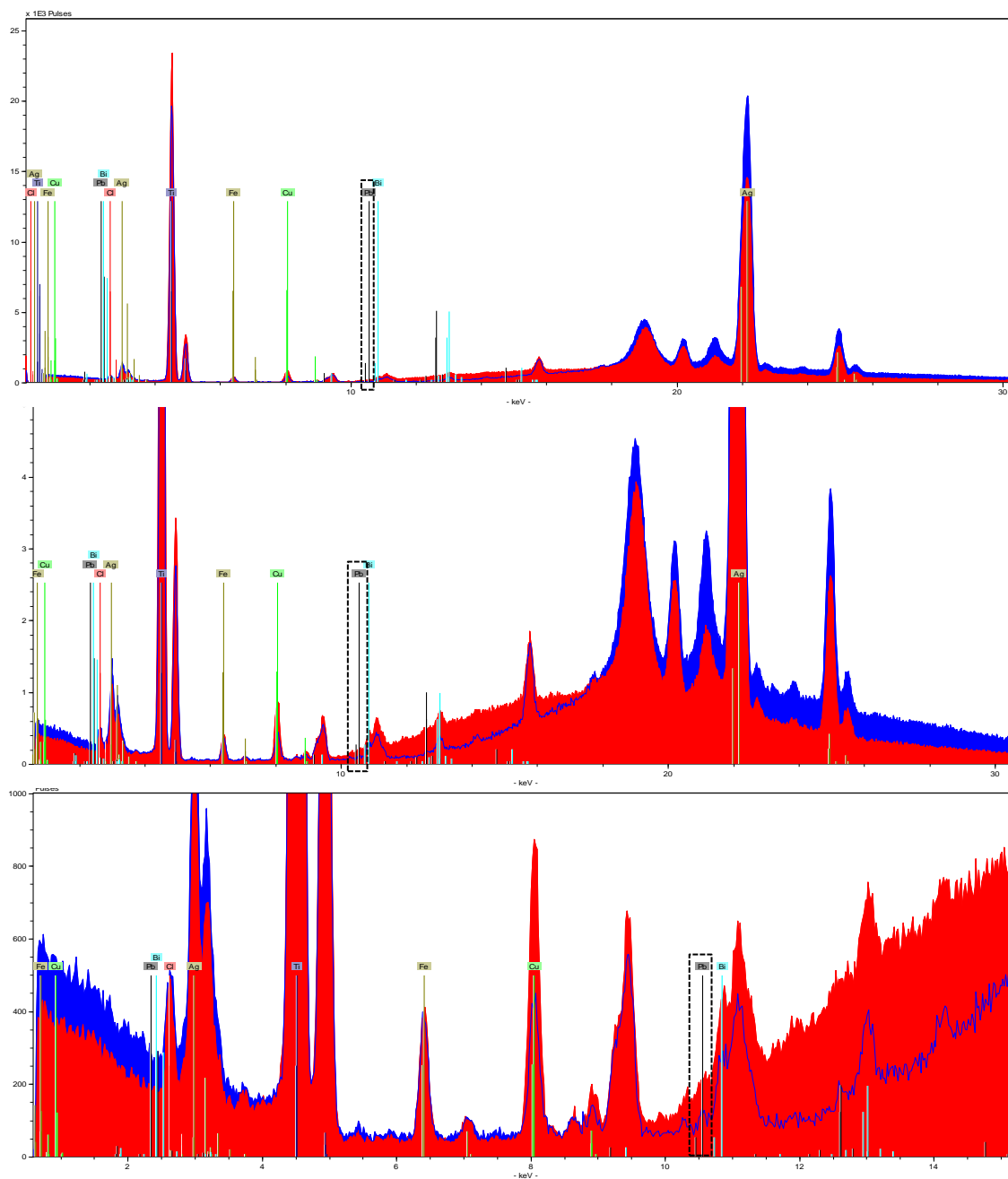


Figura 28 – Espectro XRF de um BiFE antes da utilização (azul) e depois da utilização (vermelho). No espectro são visíveis os picos do bismuto, devido à constituição do próprio eletrodo.

5.5. Determinação voltamétrica do B[a]P

Na Figura 29 apresentam-se os voltamogramas de impulso diferencial obtidos com três quantidades diferentes de BaP (10, 20 e 30 ng), na ausência e na presença de 20 μL de água. Conforme se pode observar nesta Figura, o pico anódico relativo à eletrooxidação do BaP na ausência de água é muito pouco definido, variando muito pouco com o aumento de massa do próprio BaP (isto é, a sensibilidade é muito reduzida).

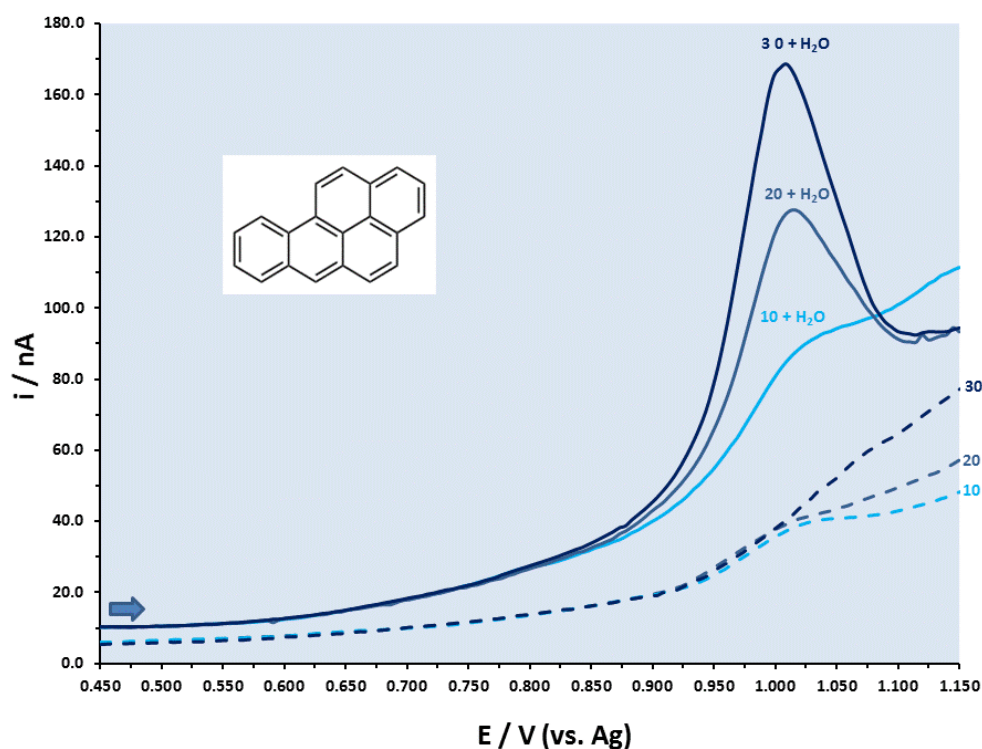


Figura 29 - Voltamogramas de impulso diferencial de 10, 20 and 30 ng BaP in 0.1 M LiClO₄/ACN (200 μL), sem (linhas a tracejado) e com (linhas contínuas) 20 μL de água.

Naturalmente, que do ponto de vista analítico uma resposta deste tipo não oferece vantagens. Por outro lado, é notória a alteração que se produz nos voltamogramas, quando é introduzida a água. Todos os picos voltamétricos do BaP, que se desenvolvem a cerca de 1.000 V, são ampliados consideravelmente, sendo que a diferença entre eles também é significativa.

Neste caso pode concluir-se que o método voltamétrico oferece uma capacidade de deteção e uma sensibilidade muito elevadas, na presença de água.

Quanto à variação do sinal analítico (intensidade de corrente de pico) com a massa de BaP presente na célula voltamétrica, pode observar-se que existe uma proporcionalidade aceitável no meio seleccionado (Figura 30). Neste sentido, pode considerar-se que o método voltamétrico pode ser convenientemente

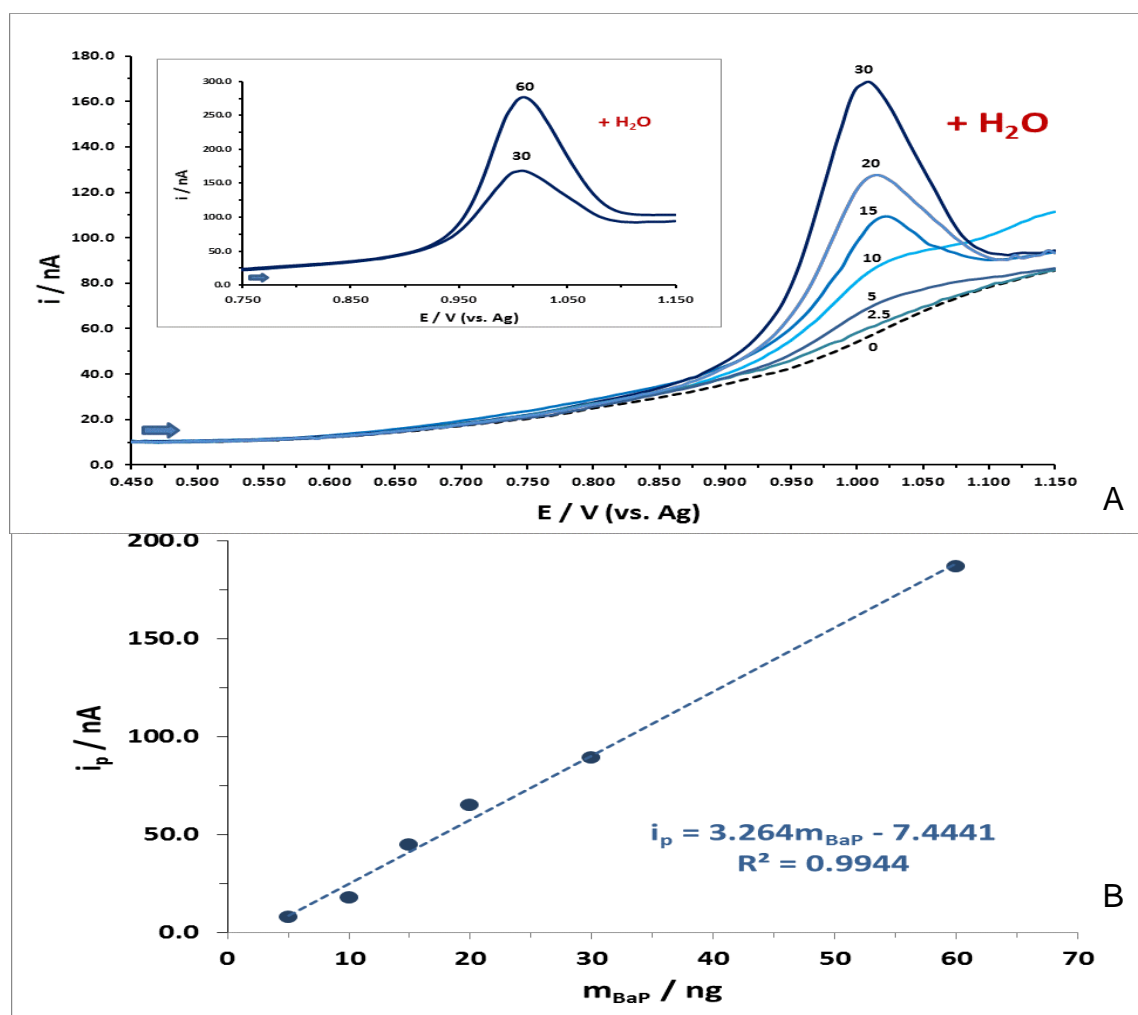


Figura 30 - (A) Voltamogramas de impulso diferencial de 2.5 a 60 ng BaP em 0.1 M LiClO₄/ACN (200 µL) com 20 µL de água; (B) Curva de calibração correspondente.

utilizado (ou adaptado) para a quantificação de BaP, se não houver limitações introduzidas por matrizes muito mais complexas.

Nos ensaios com as duas amostras de tintas, dopadas ou não com BaP, tentou verificar-se se alguma das tintas evidenciava alguma contribuição deste analito, e averiguou-se qual o efeito que a matriz das tintas pode ter no pico voltamétrico do BaP, quando este é adicionado a um extrato de tinta. Na Figura 31 resumem-se os resultados obtidos nestes ensaios.

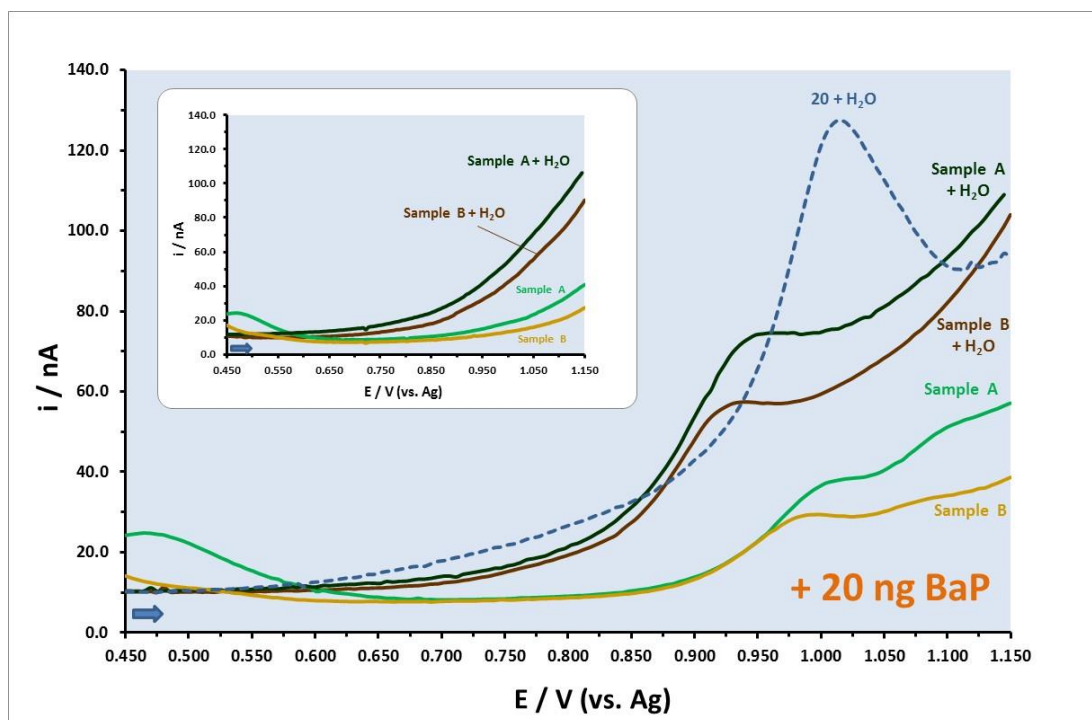


Figura 31 - Voltamogramas de impulso diferencial das amostras A e B dopadas com 40 ng BaP em 0.1 M LiClO₄/ACN (20 ng BaP em 200 µL), com e sem adição de 20 µL de água. Na Figura interna apresentam-se os voltamogramas das amostras A e B não dopadas com BaP.

Conforme se pode observar, em nenhum dos voltamogramas das amostras não dopadas (quer na ausência de água quer na presença dela) aparece um pico anódico característico do BaP, indicando que este não é detetável nas duas tintas, nas condições usadas. Quanto à possibilidade de detetar o BaP nestas matrizes mais complexas, pode concluir-se que o método voltamétrico é viável. No entanto, o efeito que a matriz provoca no sinal analítico deve ser tomado em consideração, uma vez que a altura do pico voltamétrico do BaP é menor nas soluções com amostra, do que nas soluções padrão sem amostra.

Face às vantagens que o método voltamétrico oferece (onde se incluem principalmente, a possibilidade de detetar quantidades de BaP na ordem das unidades de ng, e de utilizar pequenas quantidades de amostra e de solvente orgânico, através da montagem de uma mini-célula muito simples), e às limitações que apresenta na análise de matrizes mais complexas, acredita-se que o seu aperfeiçoamento pode traduzir-se num método ainda mais eficaz para determinar o BaP em tintas de tatuagem.

6. Conclusões

Neste trabalho, foram desenvolvidos e implementados pela primeira vez métodos eletroquímicos voltamétricos, para a análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem, produtos que como se sabe têm forte interação com a bioquímica humana.

Os métodos analíticos desenvolvidos centraram-se na análise de dois agentes tóxicos principais (o metal pesado chumbo e o composto orgânico benzo[a]pireno), e na capacidade que estas duas substâncias possuem em serem oxidadas electroquimicamente. Os métodos em causa são muito mais simples, rápidos e económicos, que os métodos analíticos não-eletroquímicos de referência atualmente usados na deteção destas substâncias, nessas tintas, e evidenciaram ter uma capacidade de deteção igualmente comparável. Estes métodos eletroquímicos basearam-se na utilização da voltametria de impulso diferencial e no uso de mini-células eletroquímicas, em que se consomem quantidades de reagentes, soluções e amostras, extremamente reduzidas (inferior ao mL e mg). A estas características soma-se a possibilidade de utilizar os métodos em qualquer lugar, devido à portabilidade dos equipamentos e mini-células eletroquímicas à disposição.

Na deteção do chumbo, em particular, em que se utilizou a voltametria de redissolução anódica de impulso diferencial e um sistema de três elétrodos de tinta impressa com um elétrodo de trabalho de filme de bismuto, foi possível detetar quantidades da ordem do nanograma (ng), em algumas das soluções amostra das tintas. Nestes ensaios voltamétricos, entre diversas variáveis estudadas, verificou-se que as mais críticas foram: 1. a etapa de digestão das amostras de tinta e, 2. o volume de solução amostra a imobilizar no elétrodo de trabalho e a utilizar na respetiva medição. Daqui conclui-se que um meio nítrico concentrado foi suficiente para realizar a digestão das amostras, e que um volume da ordem do 5-7 μL da solução amostra de tinta era o mais adequado.

Reconheceu-se, no entanto, que este volume também podia variar de amostra para amostra. Utilizando as condições otimizadas e obedecendo a estes dois últimos critérios foi também possível estimar quantitativamente a concentração de chumbo (expressa em $\mu\text{g Pb/g}$ tinta, ppm pb) em duas tintas. As duas tintas apresentaram um teor em chumbo (8.02 e 51.81 ppm) superior ao recomendado pelas normas europeias (2 ppm).

Relativamente às potencialidades e eficácia do método voltamétrico usado na detecção e quantificação do chumbo, há ainda a acrescentar que se comprovou a sua superioridade, relativamente à espectrometria de fluorescência de raios-x usada complementarmente neste trabalho.

Relativamente à detecção do BaP, em que se utilizou a voltametria de impulso diferencial e um sistema de três elétrodos com um elétrodo de trabalho de diamante dopado com boro, verificou-se que uma solução eletrolítica 0.1 M de perclorato de lítio em acetonitrilo com 9.1 % (v/v) em água constituía um meio muito favorável para detetar quantidades do composto na ordem do nanograma (ng). Nos ensaios com as tintas de tatuagem utilizou-se apenas um procedimento de extração simples e com uma eficácia talvez questionável (quer pela massa de tinta submetida à extração, quer pelo meio e condições de extração), sem se avançar para outros métodos potencialmente mais eficientes, e por isso, também não foi possível detetar quaisquer quantidades de BaP, em duas soluções amostra de tintas negras selecionadas. Contudo, dopando estas duas últimas soluções amostra foi possível efetuar a detecção do BaP aí introduzido. Neste último ensaio pôde concluir-se que, o efeito de matriz da tinta de tatuagem diminui o sinal analítico do BaP, e por isso é necessário tomar medidas adicionais para minimizar este efeito.

Com os resultados que se obtiveram, quer na análise do chumbo quer na análise do benzo[a]pireno, reconhece-se ainda que os métodos voltamétricos aqui apresentados podem ser objeto de evolução e que podem vir a ser adaptados à análise de outros agentes tóxicos presentes nas tintas de tatuagem ou em

produtos cosméticos. No fundo, a monitorização analítica destes agentes tóxicos em produtos de uso humano e a disponibilidade de meios analíticos para o fazer constitui uma primeira salvaguarda ao consumo seguro desses produtos.

7. Perspetivas futuras

Após a análise dos resultados obtidos, surgiram algumas questões ao longo deste estudo. Desse modo, serão apresentados alguns tópicos de interesse que poderão vir a ser alvos de estudo no futuro:

- Neste estudo foi analisada apenas a presença de chumbo em tintas de tatuagem, no entanto, foram encontradas outras espécies metálicas como o nióbio e o zircónio, cuja deteção/quantificação da sua presença traria interesse.
- Quantificação de compostos orgânicos em tintas de tatuagem, visto que neste trabalho apenas pudemos proceder à sua identificação, mas não nos foi permitido fazer a sua quantificação.
- Investigação da possibilidade de utilização de outros sensores voltamétricos modificados com diferentes materiais (exemplo: nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro ou prata).
- Estudar a percentagem de recuperação de um ou vários compostos metálicos numa tinta de tatuagem.
- Expandir o material de amostragem para maquilhagem semipermanente e avaliar também a presença e quantidades de compostos orgânicos e inorgânicos presentes nestes produtos.
- Explorar a nova tendência de tintas de tatuagem que brilham no escuro, de modo a perceber de que maneira a sua composição será afetada, e se algum modo poderá ser prejudicial à saúde humana.

8. Referências bibliográficas

1. OANȚĂ, A., IRIMIE, M., BRĂNIȘTEANU, D. E., STOLERIU, G. & MORARIU, S. H. TATTOOS - HISTORY AND ACTUALITY. (2014).
2. FISHER, J. A. Tattooing the Body, Marking Culture. *Body Soc.* **8**, 91–107 (2002).
3. Jablonski, N. G. Skin: a natural history. (2013).
4. Samadelli, M., Melis, M., Miccoli, M., Vigl, E. E. & Zink, A. R. Complete mapping of the tattoos of the 5300-year-old Tyrolean Iceman. *J. Cult. Herit.* **16**, 753–758 (2015).
5. Sepehri, M., Sejersen, T., Qvortrup, K., Lerche, C. M. & Serup, J. Tattoo Pigments Are Observed in the Kupffer Cells of the Liver Indicating Blood-Borne Distribution of Tattoo Ink. *Dermatology* **233**, 86–93 (2017).
6. Ferraglio, A. Tattoos from a medical-toxicological point of view. *Off. J. Int. Union Aesthetic Med. – UIME* **2**, 123–129 (2016).
7. Ferguson, J. E., Andrew, S. M., Jones, C. J. P. & August, P. J. The Q-switched neodymium: YAG laser and tattoos: A microscopic analysis of laser-tattoo interactions. *Br. J. Dermatol.* **137**, 405–410 (1997).
8. Jacob, C. I. Tattoo-associated dermatoses: a case report and review of the literature. *Dermatol. Surg.* **28**, 962–5 (2002).
9. N. Raison-Peyron, L. Meunier, L. Vian, J. M. Eczéma de contact à un tatouage labile contenant du henné. *Ann. Dermatol. Venereol.* **127**, 1083 (2000).
10. Gutermuth, J., Hein, R., Fend, F., Ring, J. & Jakob, T. Cutaneous pseudolymphoma arising after tattoo placement Editor. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **21**, 070209222700093–??? (2007).

11. Polimón Olabarrieta, I., Ortiz de Frutos, F. J., Comuni3n Artieda, A., Zarco Olivo, C., Rodr3guez Peralto, J. L. & Iglesias D3ez, L. *Actas dermo-sifiligr3ficas. Actas Dermo-Sifiligr3ficas* **92**, (Elsevier Espa3a, Place of publication not identified, 2007).
12. Schreiber, I., Hesse, B., Seim, C., Castillo-Michel, H., Villanova, J., Laux, P., Drejack, N., Penning, R., Tucoulou, R., Cotte, M. & Luch, A. Synchrotron-based v-XRF mapping and μ -FTIR microscopy enable to look into the fate and effects of tattoo pigments in human skin. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
13. Timko, A. L., Miller, C. H., Johnson, F. B. & Ross, E. In vitro quantitative chemical analysis of tattoo pigments. *Arch. Dermatol.* **137**, 143–7 (2001).
14. Yoshihisa, Y. & Shimizu, T. Metal Allergy and Systemic Contact Dermatitis: An Overview. *Dermatol. Res. Pract.* **2012**, 1–5 (2012).
15. Grant, C. A., Twigg, P., Baker, R., Grant, C. A., Twigg, P. C., Baker, R. & Tobin, D. J. Tattoo ink nanoparticles in skin tissue and fibroblasts Tattoo ink nanoparticles in skin tissue and fibroblasts. (2015). doi:10.3762/bjnano.6.120
16. Laux, P., Tralau, T., Tentschert, J., Blume, A., Dahouk, S. Al, B3uml, W., Bernstein, E. & Bocca, B. Review A medical-toxicological view of tattooing. **6736**, 1–8 (2015).
17. Kl3gl, I., Hiller, K.-A., Landthaler, M. & B3uml, W. Incidence of Health Problems Associated with Tattooed Skin: A Nation-Wide Survey in German-Speaking Countries. *Dermatology* **221**, 43–50 (2010).
18. Cuyper, C. De & P3rez-Cotapos, M.-L. *Dermatologic Complications with Body Art*. (Springer Berlin Heidelberg, 2010). doi:10.1007/978-3-642-03292-9
19. Wenzel, S. M., Rittmann, I., Landthaler, M. & B3uml, W. Adverse Reactions after Tattooing: Review of the Literature and Comparison to

- Results of a Survey. *Dermatology* **226**, 138–147 (2013).
20. Bäumlér, W., Eibler, E. T., Hohenleutner, U., Sens, B., Sauer, J. & Landthaler, M. Q-switch laser and tattoo pigments: first results of the chemical and photophysical analysis of 41 compounds. *Lasers Surg. Med.* **26**, 13–21 (2000).
 21. Vasold, R., Engel, E., König, B., Landthaler, M. & Bäumlér, W. Health risks of tattoo colors. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 9–13 (2008).
 22. Forte, G., Petrucci, F., Cristaudo, A. & Bocca, B. Science of the Total Environment Market survey on toxic metals contained in tattoo inks. *Sci. Total Environ.* **407**, 5997–6002 (2009).
 23. Jacobsen, E., Tønning, K., Pedersen, E., Bernth, N., Serup, J., Høgsberg, T. & Nielsen, E. *Chemical Substances in Tattoo Ink*. (2012).
 24. Carson, S. Skin Painting Studies in Mice with 14 Fd&c and D&c Colors: Fd&c Blue no. 1, Red No. 3, and Yellow No. 5, D&c Red No. 7, Red No. 9, Red No. 10, Red No. 19, Red No. 21, Red No. 27, Red No. 31, Red No. 36, Orange No. 5, Orange No. 10, and Orange No. 17. *J. Toxicol. Cutan. Ocul. Toxicol.* **3**, 357–370 (1984).
 25. Cui, Y., Spann, A. P., Couch, L. H., Gopee, N. V., Evans, F. E., Churchwell, M. I., Williams, L. D., Doerge, D. R. & Howard, P. C. Photodecomposition of Pigment Yellow 74, a pigment used in tattoo inks. *Photochem. Photobiol.* **80**, 175–84 (2004).
 26. Hutton Carlsen, K. & Serup, J. Photosensitivity and photodynamic events in black, red and blue tattoos are common: A 'Beach Study'. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **28**, 231–237 (2014).
 27. De Cuyper, C. Permanent makeup: indications and complications. *Clin. Dermatol.* **26**, 30–34 (2008).
 28. Laux, P., Tralau, T., Tentschert, J., Blume, A., Dahouk, S. Al, Bäumlér, W.,

- Bernstein, E., Bocca, B., Alimonti, A., Colebrook, H., De Cuyper, C., Dähne, L., Hauri, U., Howard, P. C., Janssen, P., Katz, L., Klitzman, B., Kluger, N., Krutak, L., Platzek, T., Scott-Lang, V., Serup, J., Teubner, W., Schreiver, I., Wilkniß, E. & Luch, A. A medical-toxicological view of tattooing. *Lancet* **387**, 395–402 (2016).
29. Gopee, N. V., Cui, Y., Olson, G., Warbritton, A. R., Miller, B. J., Couch, L. H., Wamer, W. G. & Howard, P. C. Response of mouse skin to tattooing: use of SKH-1 mice as a surrogate model for human tattooing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **209**, 145–158 (2005).
30. Lehner, K., Santarelli, F., Penning, R., Vasold, R., Engel, E., Maisch, T., Gastl, K., König, B., Landthaler, M. & Bäuml, W. The decrease of pigment concentration in red tattooed skin years after tattooing. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **25**, 1340–1345 (2011).
31. Regensburger, J., Lehner, K., Maisch, T., Vasold, R., Santarelli, F., Engel, E., Gollmer, A., Ko, B., Landthaler, M. & Ba, W. Tattoo inks contain polycyclic aromatic hydrocarbons that additionally generate deleterious singlet oxygen. 275–281 (2010). doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01068.x
32. Kluger, N. & Koljonen, V. Tattoos, inks, and cancer. *Lancet Oncol.* **13**, e161–e168 (2012).
33. Laux, P., Tralau, T., Tentschert, J., Blume, A., Dahouk, S. Al, Bäuml, W., Bernstein, E., Bocca, B., Alimonti, A., Colebrook, H., de Cuyper, C., Dähne, L., Hauri, U., Howard, P. C., Janssen, P., Katz, L., Klitzman, B., Kluger, N., Krutak, L., Platzek, T., Scott-Lang, V., Serup, J., Teubner, W., Schreiver, I., Wilkniß, E. & Luch, A. A medical-toxicological view of tattooing. *Lancet* **387**, 395–402 (2016).
34. Conaglen, P. D., Laurenson, I. F., Sergeant, A., Thorn, S. N., Rayner, A. & Stevenson, J. Systematic review of tattoo-associated skin infection with rapidly growing mycobacteria and public health investigation of a cluster in

- Scotland, 2010. *Euro Surveill.* **18**, 20553 (2013).
35. Charnock, C. Biocidal activity of a bioactive glass-protected, preservative-free tattooing solution. *Am. J. Infect. Control* **34**, 290–295 (2006).
36. Sowden, J. M., Byrne, J. P., Smith, A. G., Hiley, C., Suarez, V., Wagner, B. & Slater, D. N. Red tattoo reactions: X-ray microanalysis and patch-test studies. *Br. J. Dermatol.* **124**, 576–80 (1991).
37. Fors, R., Persson, M., Bergström, E., Stenlund, H., Stymne, B. & Stenberg, B. Lifestyle and Nickel Allergy in a Swedish Adolescent Population: Effects of Piercing, Tattooing and Orthodontic Appliances. *Acta Derm. Venereol.* **92**, 664–668 (2012).
38. Bhardwaj, S. S., Brodell, R. T. & Taylor, J. S. Red tattoo reactions. *Contact Dermatitis* **48**, 236–7 (2003).
39. Taaffe, A., Knight, A. G. & Marks, R. Lichenoid tattoo hypersensitivity. *Br. Med. J.* **1**, 616–8 (1978).
40. Mortimer, N. J., Chave, T. A. & Johnston, G. A. Red tattoo reactions. *Clin. Exp. Dermatol.* **28**, 508–10 (2003).
41. Lerche, C. M., Sepehri, M., Serup, J., Poulsen, T. & Wulf, H. C. Black tattoos protect against UVR-induced skin cancer in mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **31**, 261–268 (2015).
42. Agrawal, P., Mittal, A., Kumar, M. & Tripathi, S. K. A comprehensive review of environmental exposure of Lead and its toxicity - Review Article. *J. Indian Acad. Forensic Med.* **31**, 299–303 (2004).
43. Gurer, H. & Ercal, N. *CAN ANTIOXIDANTS BE BENEFICIAL IN THE TREATMENT OF LEAD POISONING?* (2000).
44. Abadin, H., Ashizawa, A., Stevens, Y.-W., Lladós, F., Diamond, G., Sage, G., Citra, M., Quinones, A., Bosch, S. J. & Swarts, S. G. HEALTH EFFECTS. (2007).

45. Tighe, M. E., Libby, D. K., Dorn, S. K., Hosmer, J. R. & Peaslee, G. F. A Survey of Metals Found in Tattoo Inks. *J. Environ. Prot. (Irvine,. Calif)*. **08**, 1243–1253 (2017).
46. Bannon, D. I. *Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern. Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern* (2015). doi:10.1016/B978-0-12-800020-5.00020-X
47. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. risks to humans* **92**, 1–853 (2010).
48. Williams, M. A., Salice, C. & Reddy, G. *Wildlife Toxicity Assessment for Benzo[a]Pyrene, in M.A. Williams, G. Reddy, M.J. Quinn Jr., M.S Johnson (Eds). Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern* **24**, (Elsevier, 2015).
49. *Portable X-ray Fluorescence Spectrometry*. (Royal Society of Chemistry, 2008). doi:10.1039/9781847558640
50. Veiga, A. Estudo Arqueométrico de Pinturas a Óleo sobre Cobre dos Séculos XVII / XVIII do Museu de Évora. (2015) (<http://hdl.handle.net/10174/17299>).
51. A.C. Thompson & D. Vaughan. *X-Ray Data Booklet*. (University of California Berkeley, Califórnia, 2009).
52. Sieber, J. R. Portable X-ray fluorescence spectrometry-capabilities for *in situ* analysis. Edited by P. J. Potts and M. West. RSC Publishing, Cambridge, UK, 2008, 291 pp. ISBN 978 0 85404 552 5. *X-Ray Spectrom.* **38**, 157–157 (2009).
53. Wang, J. *Analytical Electrochemistry*. (John Wiley & Sons, Inc., 2006). doi:10.1371/journal.pone.0022191

54. Du, C., Hu, Y., Li, Y., Fan, L. & Li, X. Electrochemical detection of benzo (a) pyrene in acetonitrile – water binary medium. *Talanta* **138**, 46–51 (2015).
55. Prior, G. Tattoo Inks: Legislation , Pigments , Metals and Chemical Analysis. **48**, 152–157 (2015).
56. Jeftic, L. & Adams, R. N. Electrochemical Oxidation Pathways. *Journal Am. Chem. Soc.* **92**, 1332–1337 (1970).
57. Elsner, P. & Maibach, H. I. *Cosmeceuticals : drugs vs. cosmetics*. (Marcel Dekker, 2000).
58. Winter, R. *A consumer's dictionary of cosmetic ingredients : complete information about the harmful and desirable ingredients found in cosmetics and cosmeceuticals*. (Three Rivers Press, 2009).
59. Matteucci, F., Cruciani, G., Dondi, M. & Raimondo, M. The role of counterions (Mo, Nb, Sb, W) in Cr-, Mn-, Ni- and V-doped rutile ceramic pigments: Part 1. Crystal structure and phase transformations. *Ceram. Int.* **32**, 385–392 (2006).
60. Pfaff, G. *Inorganic Pigments*. (De Gruyter, 2017). doi:10.1515/9783110484519
61. Engel, E., Vasold, R., Santarelli, F., Maisch, T., Gopee, N. V., Howard, P. C., Landthaler, M. & Bäumler, W. Tattooing of skin results in transportation and light-induced decomposition of tattoo pigments“ a first quantification in vivo using a mouse model. *Exp. Dermatol.* **19**, 54–60 (2010).

Anexos

Anexo 1 – Preparação de soluções stock e de trabalho

Solução tampão acetato 0.1 M pH 4.7

A solução de tampão acetato 0.1 M, com pH 4.7, foi preparada num balão volumétrico de 100 mL. Primeiramente foi adicionado ao balão cerca de 50 mL de água MilliQ acrescentando-se depois 300 µL de ácido acético glacial p.a. (CH₃COOH). Ao mesmo tempo, pesou-se num copo 0.3937g de acetato de sódio suprapur (NaCH₃COO), dissolvendo-se em seguida em água MilliQ. Depois, esta solução foi transferida quantitativamente para o balão volumétrico de 100 mL, efetuando-se 2-3 lavagens do copo, seguidas da transferência do líquido de lavagem para o balão. Finalmente, perpez-se o balão com água MilliQ e agitou-se para homogeneizar a solução resultante.

Solução stock de perclorato de lítio 0.5 M em acetonitrilo

A solução 0.5 M de perclorato de lítio em acetonitrilo foi preparada num balão de 10 mL. Para o efeito, pesou-se 0.5320 g de perclorato de lítio (LiClO₄) num copo, adicionando-se de seguida 4-5 mL de acetonitrilo para dissolver o sal. Depois, esta solução foi transferida quantitativamente para o balão volumétrico de 10 mL, efetuando-se 2-3 lavagens do copo com acetonitrilo, seguidas da transferência do líquido de lavagem para o balão. Finalmente, perpez-se o balão com acetonitrilo e agitou-se para homogeneizar a solução resultante.

Solução stock de chumbo (II) 100 ppm

A solução stock de chumbo (II) 100 ppm foi preparada num balão de 100 mL. Para o efeito, pesou-se 0.0160 g de nitrato de chumbo (II) p.a. ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) num copo, adicionando-se de seguida 20-30 mL de solução de tampão acetato 0.1 M, com pH 4.7 para dissolver o sal. Depois, esta solução foi transferida quantitativamente para o balão volumétrico de 100 mL, efetuando-se 2-3 lavagens do copo com o tampão acetato, seguidas da transferência do líquido de lavagem para o balão. Finalmente, perpez-se o balão com a solução de tampão acetato e agitou-se para homogeneizar a solução resultante.

Solução stock de benzo[a]pireno 100 ppm

A solução stock de benzo[a]pireno 100 ppm (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi preparada num balão de 10 mL. Para o efeito, pesou-se 0.0010 g de benzo[a]pireno (BaP; >96% HPLC da SIGMA; N^o B1760) num copo, adicionando-se de seguida 4-5 mL de acetonitrilo para dissolver o composto. Depois, esta solução foi transferida quantitativamente para o balão volumétrico de 10 mL, efetuando-se 2-3 lavagens do copo com acetonitrilo, seguidas da transferência do líquido de lavagem para o balão. Finalmente, perpez-se o balão com acetonitrilo e agitou-se para homogeneizar a solução resultante.

Anexo 2 – Espectros de fluorescência de raios-X de 22 das tintas de tatuagem analisadas

Nota: Para todos os gráficos, a cor vermelha está representada a tinta e a cor azul está representado o espectro do conjunto parafilme + papel branco.

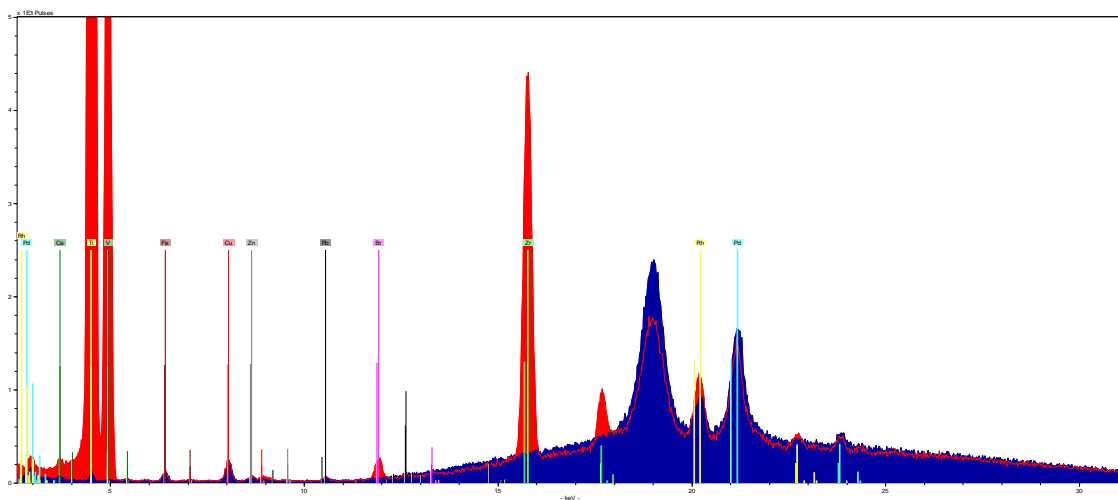


Figura 32 - NC08 + parafilme+papel branco

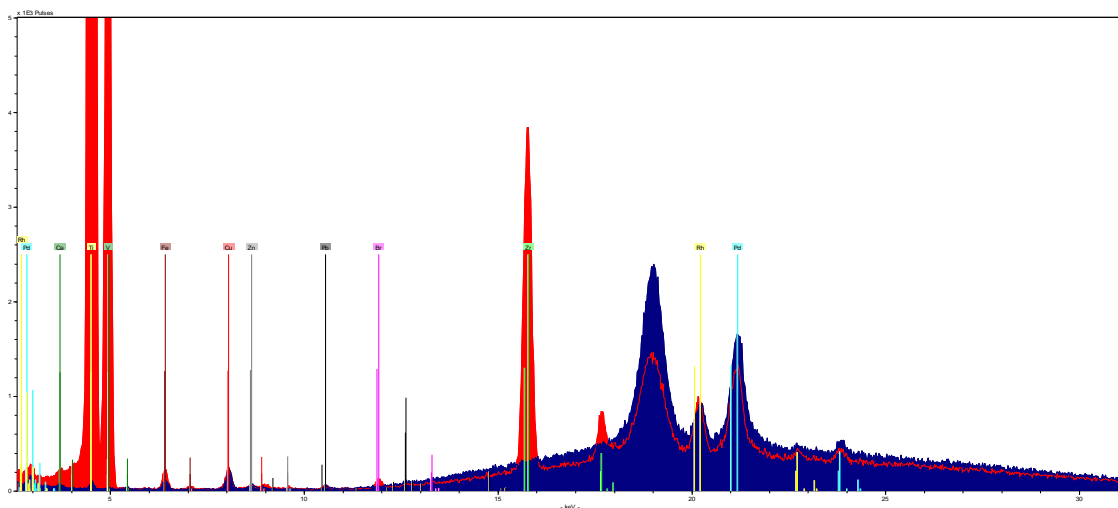


Figura 33 - NC12 + parafilme+papel branco

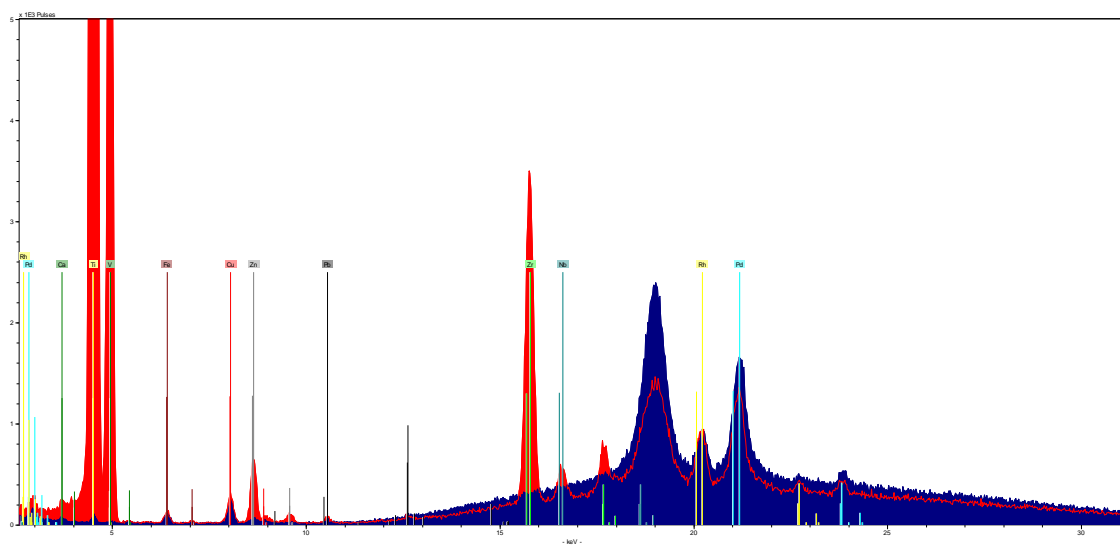


Figura 34 - SWCH + parafilme+papel branco

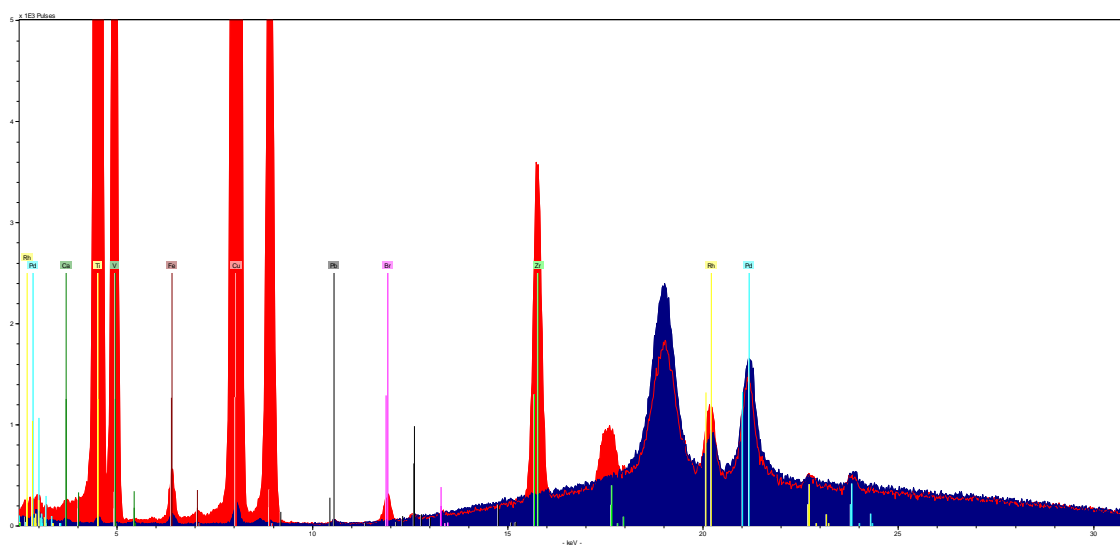


Figura 35 - NC07 + parafilme+papel branco

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

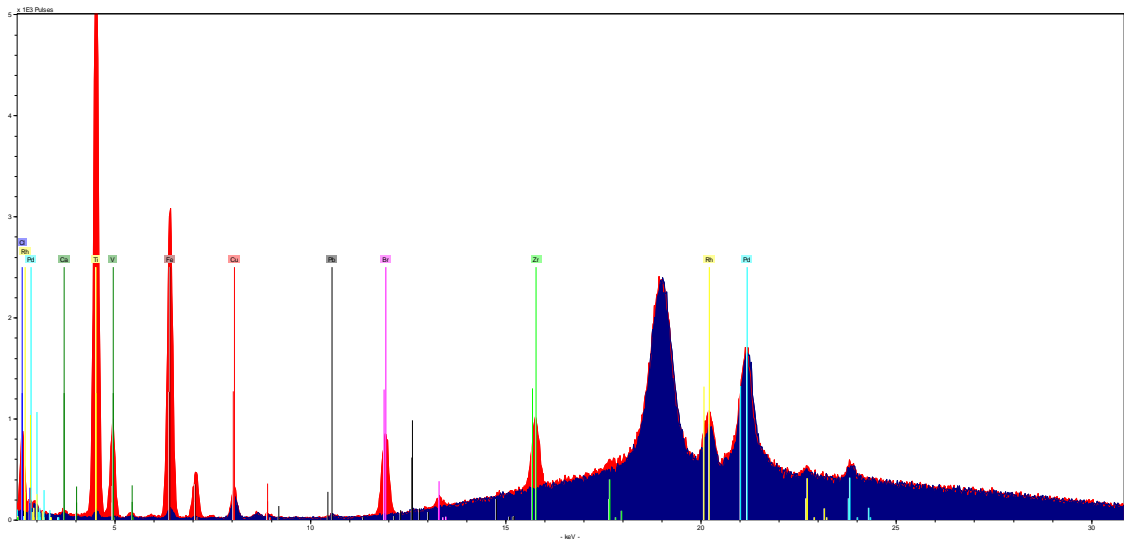


Figura 36 - NC05 + parafilme+papel branco

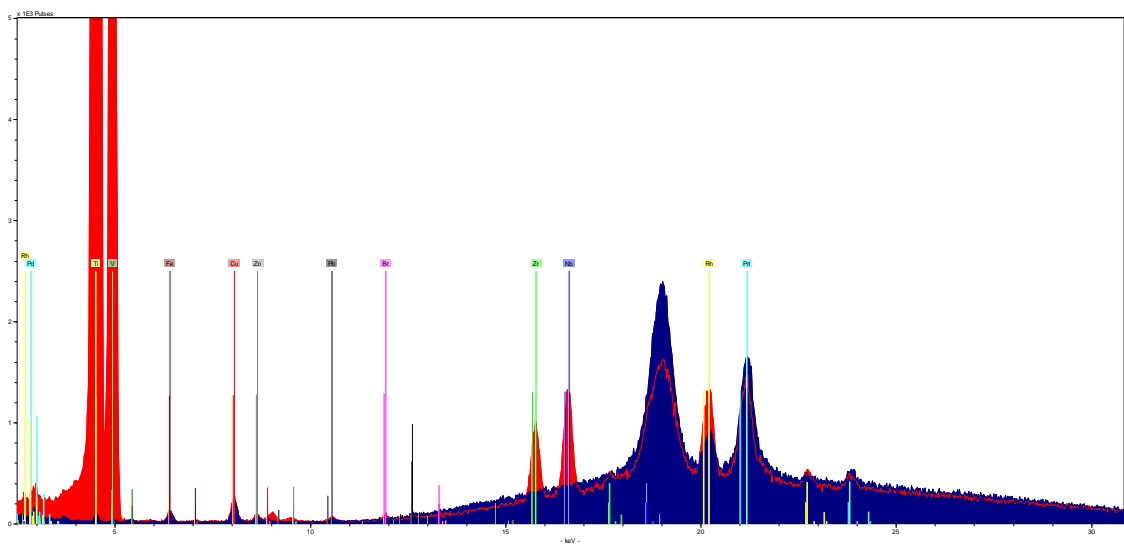


Figura 37 - NC04 + parafilme+papel branco

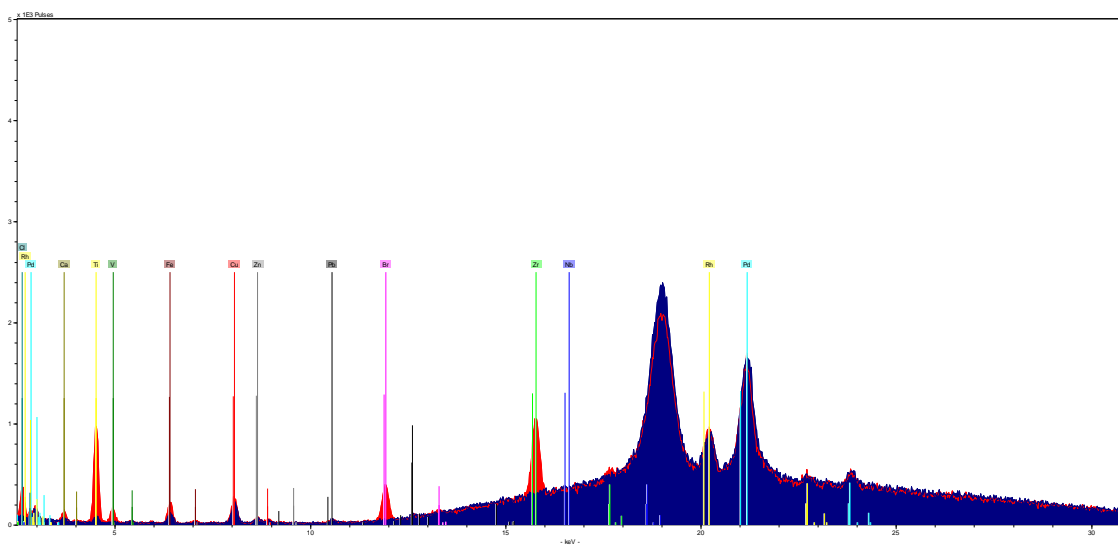


Figura 38 - NC03 + parafilme+papel branco

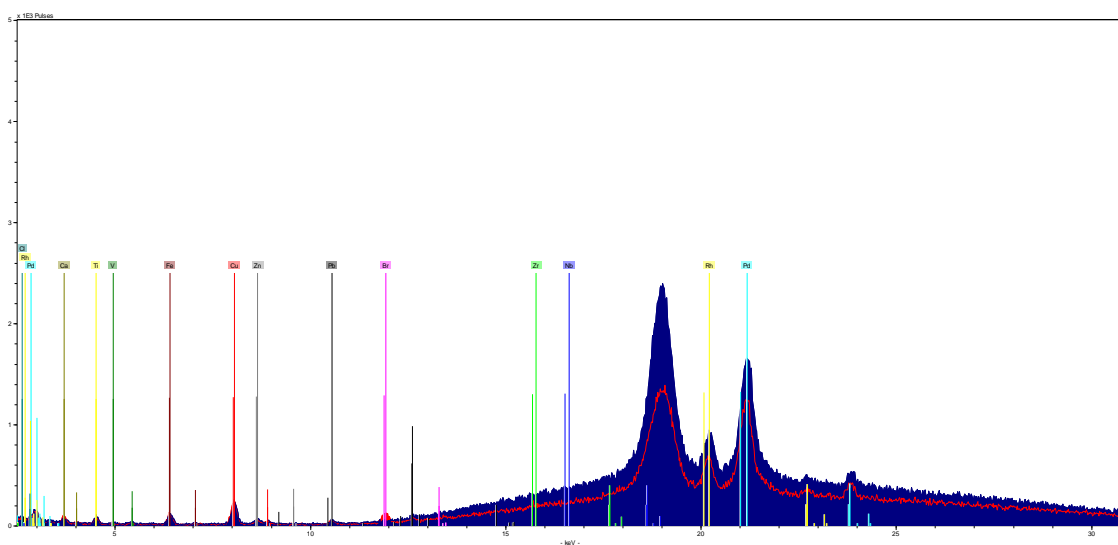


Figura 39 - NC01 + parafilme+papel branco

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

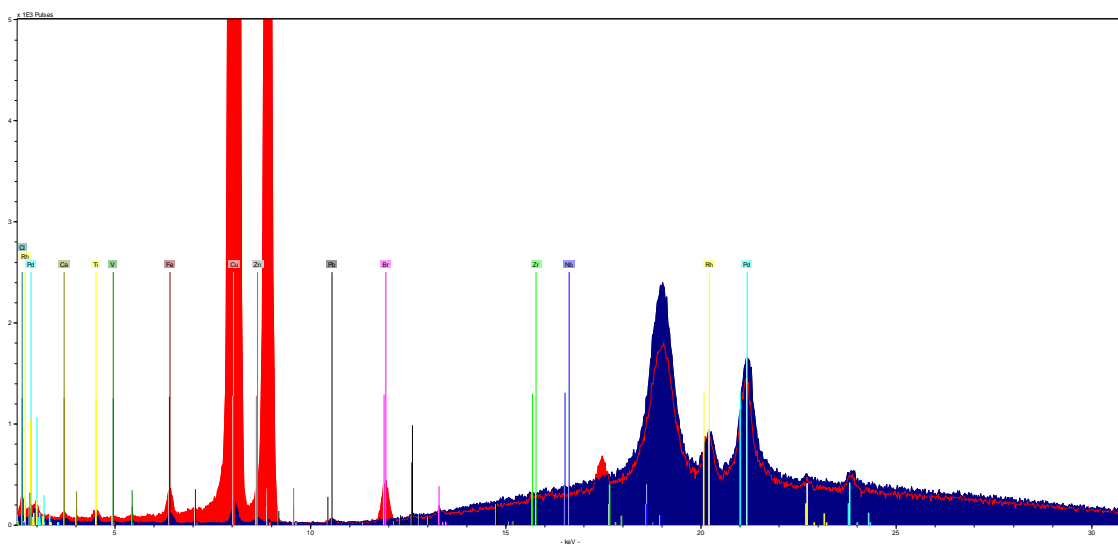


Figura 40 - NC02 + parafilme+papel branco

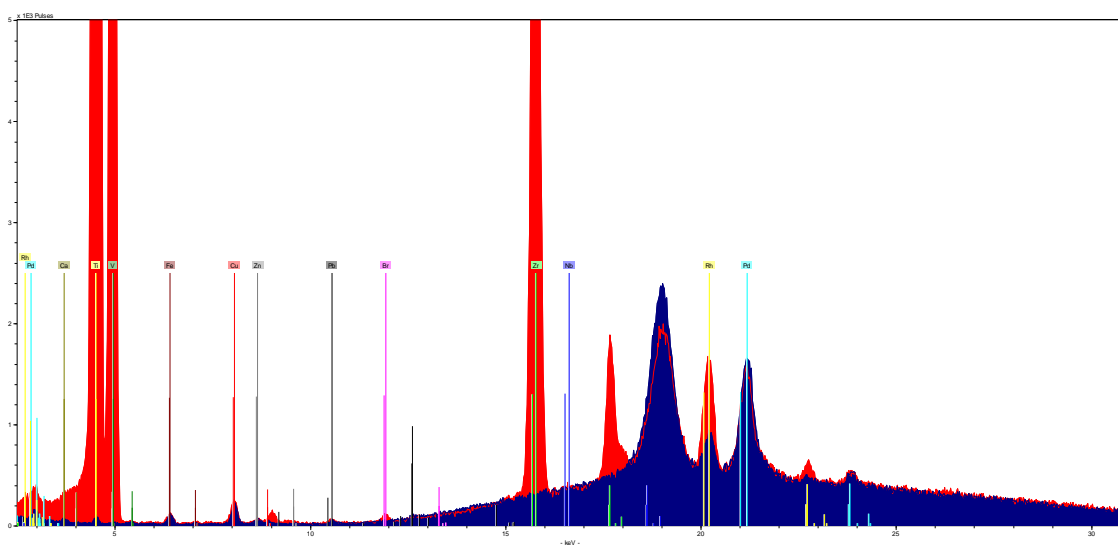


Figura 41 - NC06 + parafilme+papel branco

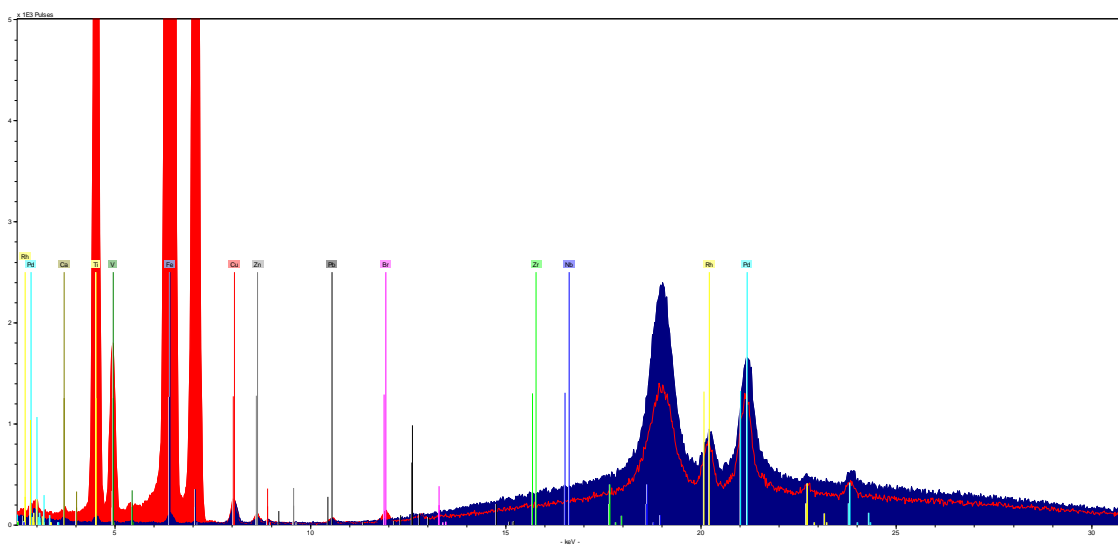


Figura 42 - NC09 + parafilme+papel branco

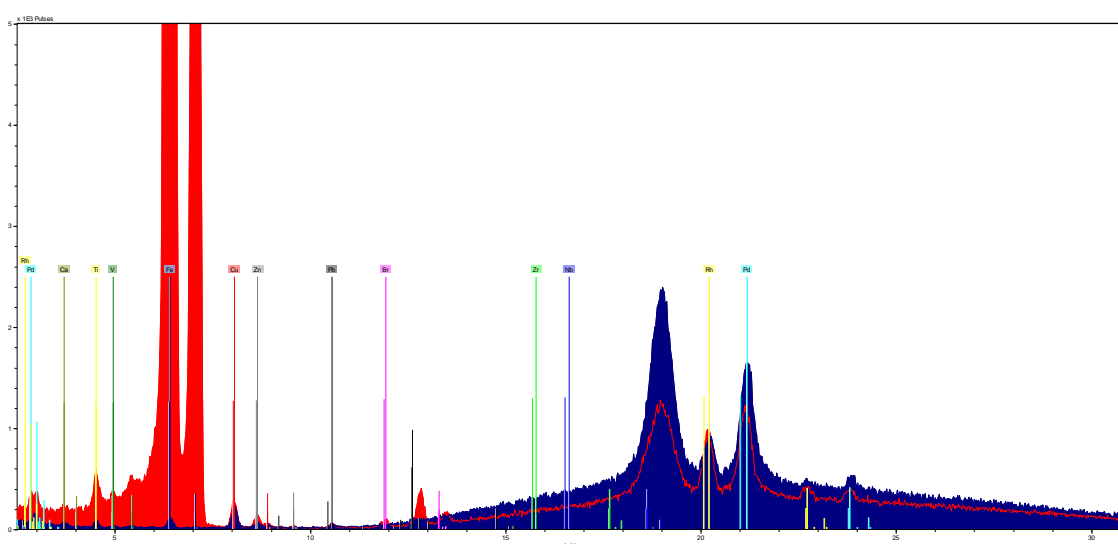


Figura 43 - NC10 + parafilme+papel branco

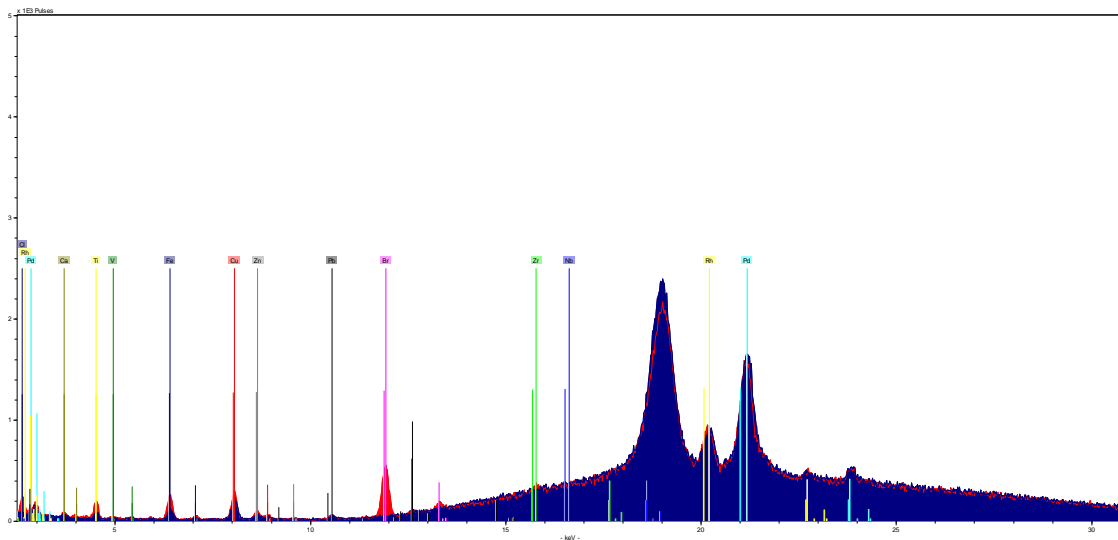


Figura 44 - NC11 + parafilme+papel branco

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

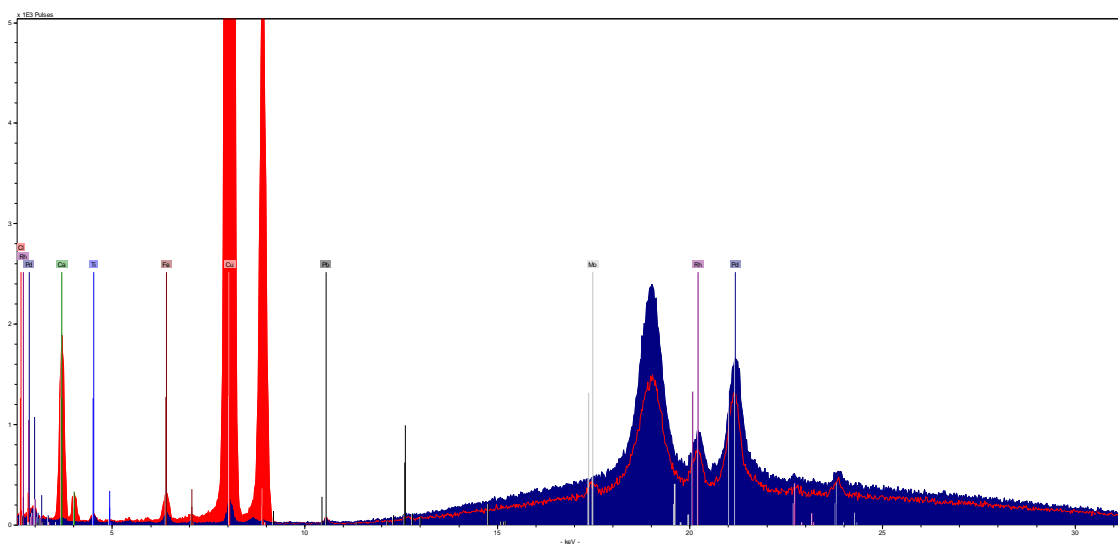


Figura 45 - TCH + parafilme+papel branco

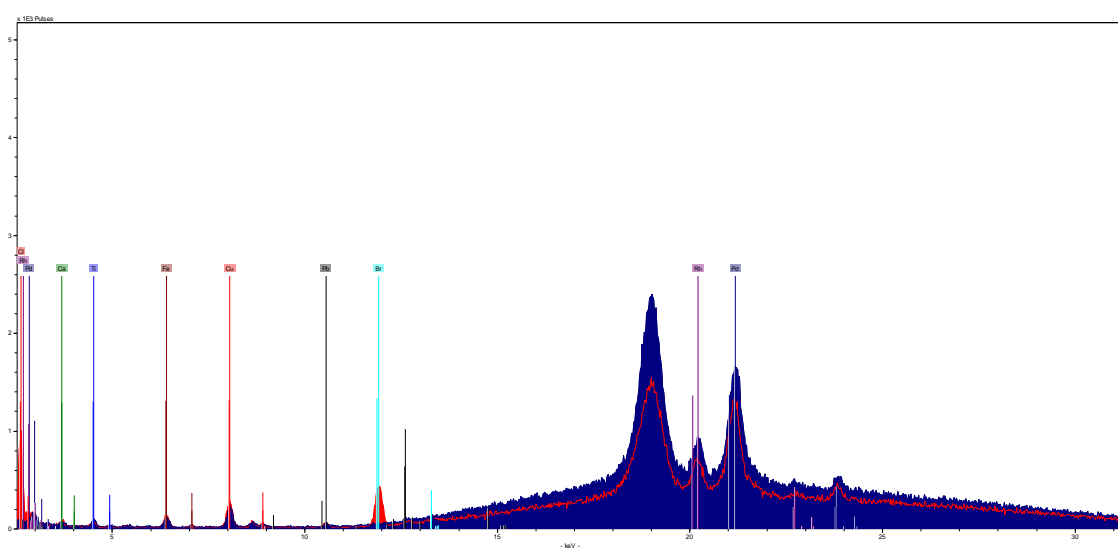


Figura 46 - TGCH + parafilme+papel branco

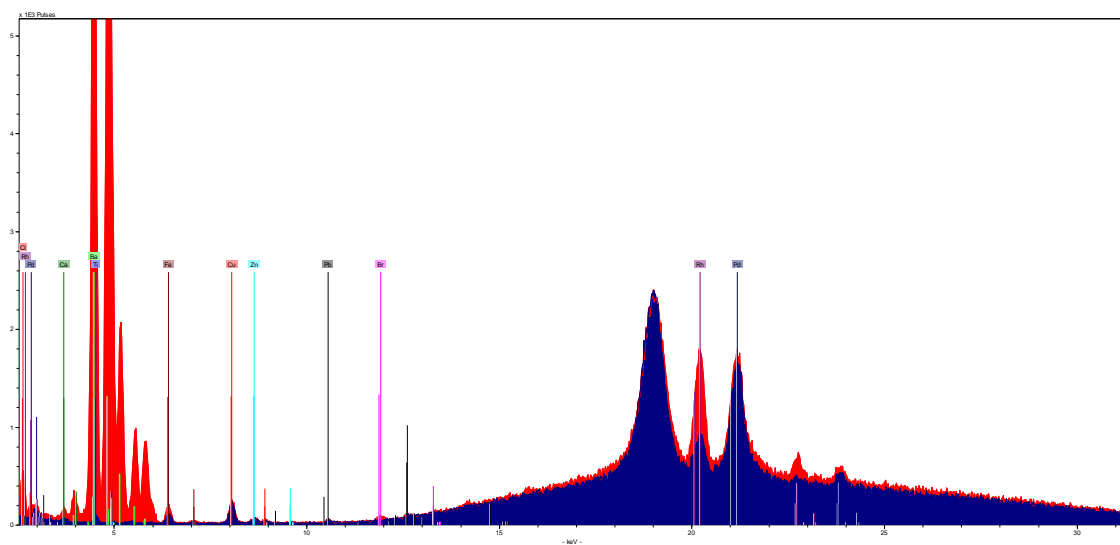


Figura 47 - VBR + parafilme+papel branco

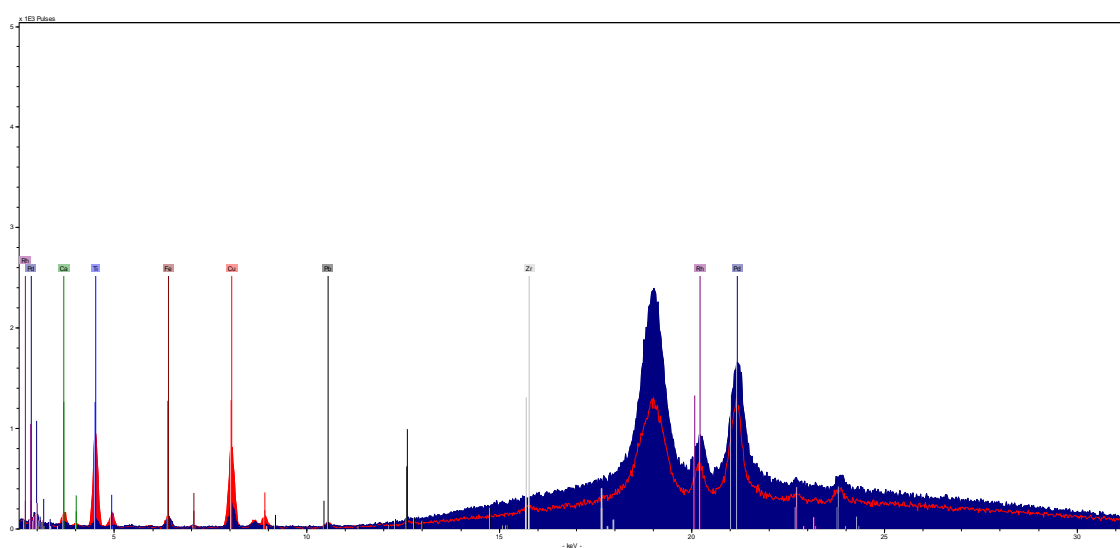


Figura 48 - BSCH + parafilme+papel branco

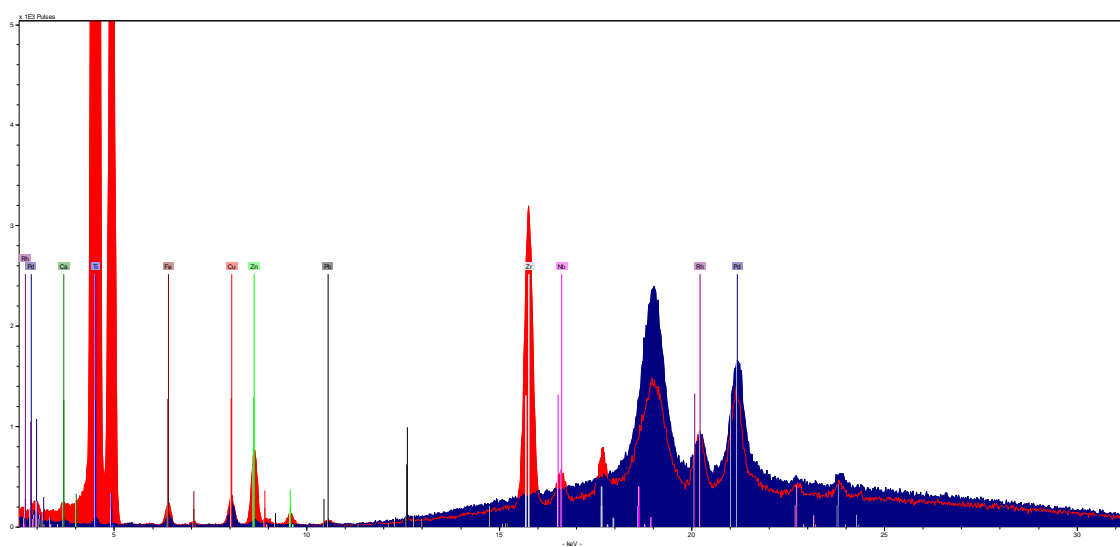


Figura 49 - LPPCH + parafilme+papel branco

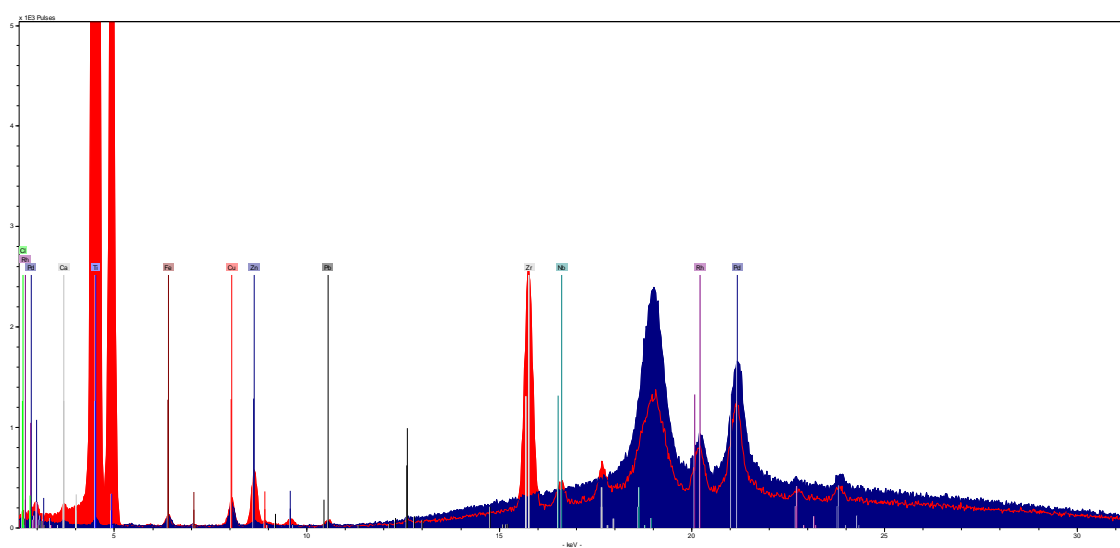


Figura 50 - SCH + parafilme+papel branco

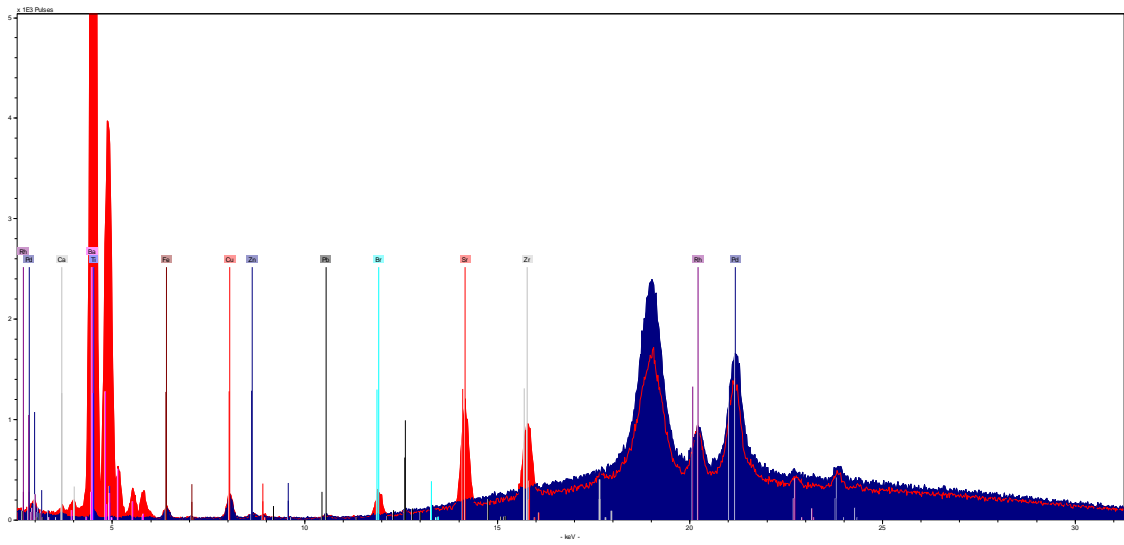


Figura 51 - EL13 + parafilme+papel branco

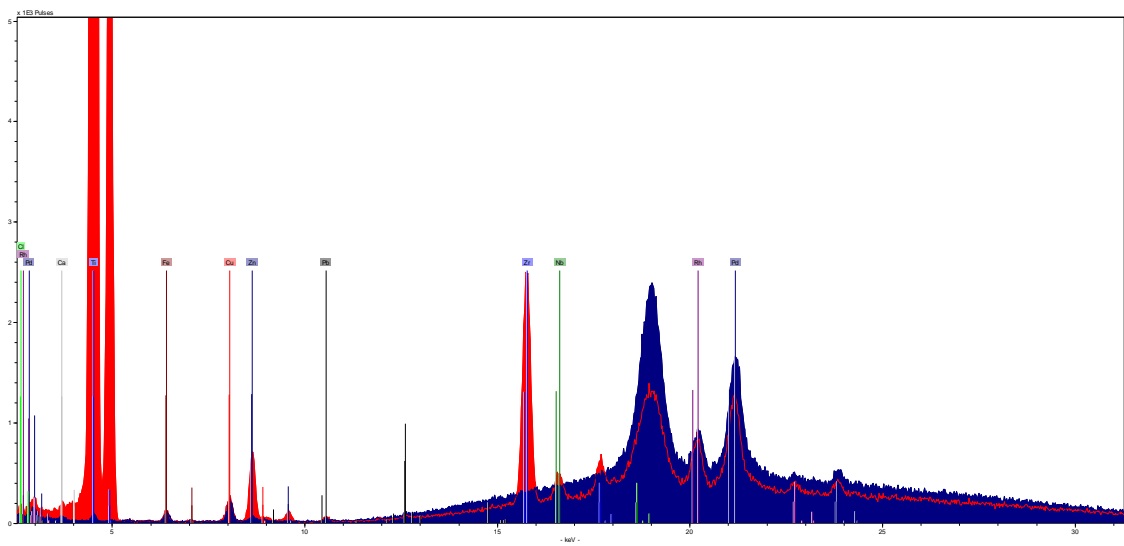


Figura 52 - MWCH + parafilme+papel branco

Anexo 3 – Tabela resumo dos metais encontrados com mais abundância em tintas de tatuagem.

Amostra (cor)	Metal												
	Titânio	Vanádio	Zinco	Zircônio	Cobre	Nióbio	Bromo	Estrôncio	Bário	Ferro	Chumbo	Molibdênio	Crômio
FCH (rosa)	X	X	X	X									
LPCH (roxo)					X								
BSCH (azul)	X				X								
CCH (roxo)	X												
SWCH (branco)	X		X	X		X					X		
CPCH (rosa fluorescente)			X										
BCH (amarelo)	X						X						
DCCH (castanho escuro)	X							X	X				
RPCH (vermelho escuro)													
MLCH (azul arroxeado)					X								
MBCH (azul)	X				X								
HGCH (verde escuro)			X		X		X						
GCH (rosa escuro)													
BBLCH (azul)	X				X								
BRCH (vermelho)													
TCH (azul escuro)					X					X			

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

Amostra	Metal												
	Titânio	Vanádio	Zinco	Zircônio	Cobre	Nióbio	Bromo	Estrôncio	Bário	Ferro	Chumbo	Molibdênio	Crômio
TGCH (amarelo)							X						
DBCH (castanho escuro)	X							X	X	X			
KCH (rosa)	X		X										
PTCH (branco)	X		X	X		X					X		
BOCH (laranja)										X			
GYCH (laranja)	X									X			
DGCH (verde escuro)			X		X					X			
LPPCH (lilás)	X		X	X		X							
BCCH (amarelo)	X									X			
LVCH (lavanda)	X		X	X		X	X				X		
PCH (rosa fluorescente)			X							X			
G3CH (roxo)					X					X			
LGCH (verde)	X				X					X			
SCH (cinza)	X		X	X		X							
DRCH (vermelho escuro)			X							X			
LYCH (amarelo fluorescente)													
TBCH (preto)			X				X			X	X		
MBRCH (verde)			X		X		X			X			
GHCH (verde)			X		X					X			

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

Amostra	Metal												
	Titânio	Vanádio	Zinco	Zircônio	Cobre	Nióbio	Bromo	Estrôncio	Bário	Ferro	Chumbo	Molibdênio	Crômio
MCH (verde)	X		X		X		X			X			
BBCH (azul)													
G2CH (azul)					X					X			
C BCH (vermelho)			X							X			
MWCH (branco)	X		X	X		X							
DCH (preto)							X						
NC01 (preto)							X						
NC02 (azul)				X	X		X			X		X	
NC03 (vermelho)	X			X			X			X			
NC04 (branco)	X		X	X		X	X						
NC05 (roxo)	X			X			X			X			
NC06 (rosa)	X			X			X						
NC07 (azul)	X			X	X		X			X			
NC08 (rosa)	X			X			X						
NC09 (castanho)	X						X			X			X
NC10 (castanho escuro)							X			X			X
NC11 (vermelho)	X						X			X			
NC12 (lavanda)	X			X			X			X			
EL01 (preto)	X			X									
EL02 (preto)													
EL03 (preto)							X						
EL04 (cinza)													

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para análise de agentes tóxicos em tintas de tatuagem

Amostra	Metal												
	Titânio	Vanádio	Zinco	Zircônio	Cobre	Nióbio	Bromo	Estrôncio	Bário	Ferro	Chumbo	Molibdênio	Crômio
EL05 (vermelho)	X						X	X					
EL06 (vermelho)	X			X			X						
EL07 (verde)	X				X		X	X	X				
EL08 (amarelo)	X						X	X	X				
EL09 (azul)				X	X		X			X		X	
EL10 (roxo)	X			X			X						
EL11 (verde escuro)				X	X		X			X			
EL12 (rosa)	X			X			X						
EL13 (amarelo claro)	X			X			X	X	X				
EL14 (castanho)	X			X	X		X	X	X				
VBR (vermelho)	X						X		X				
VMB (castanho)			X							X			X
EITB (preto)										X			

Anexo 4 – Voltamogramas das tintas de tatuagem selecionadas para a análise de presença de chumbo

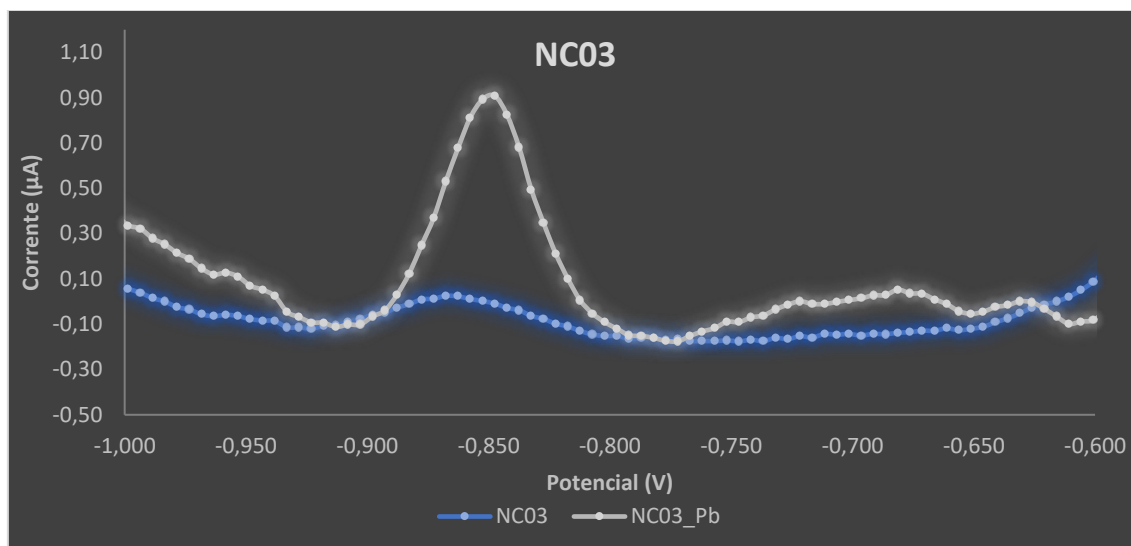


Figura 53 - Comparação da resposta da amostra NC03 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

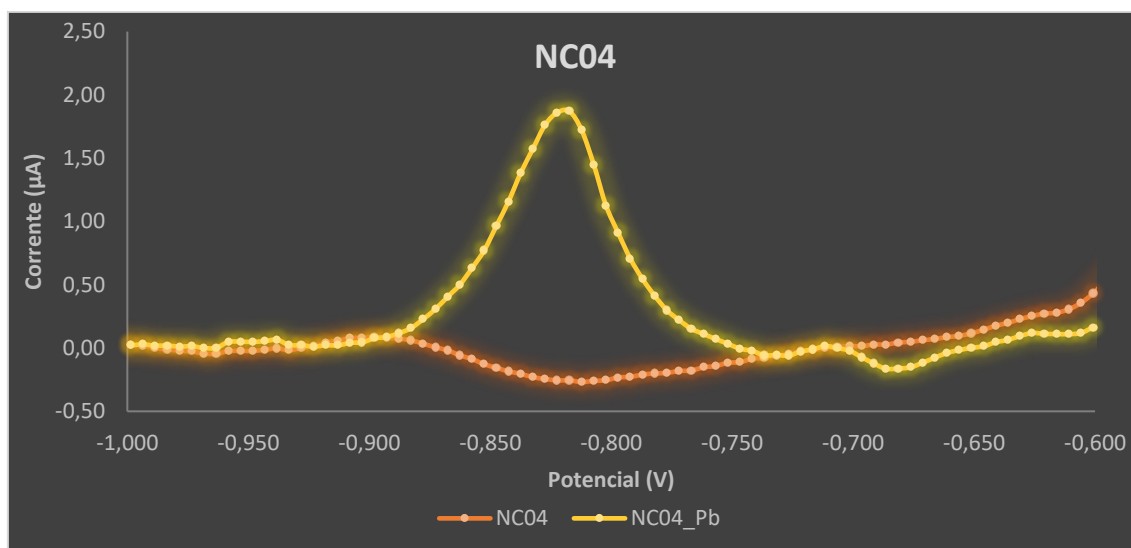


Figura 54 - Comparação da resposta da amostra NC04 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

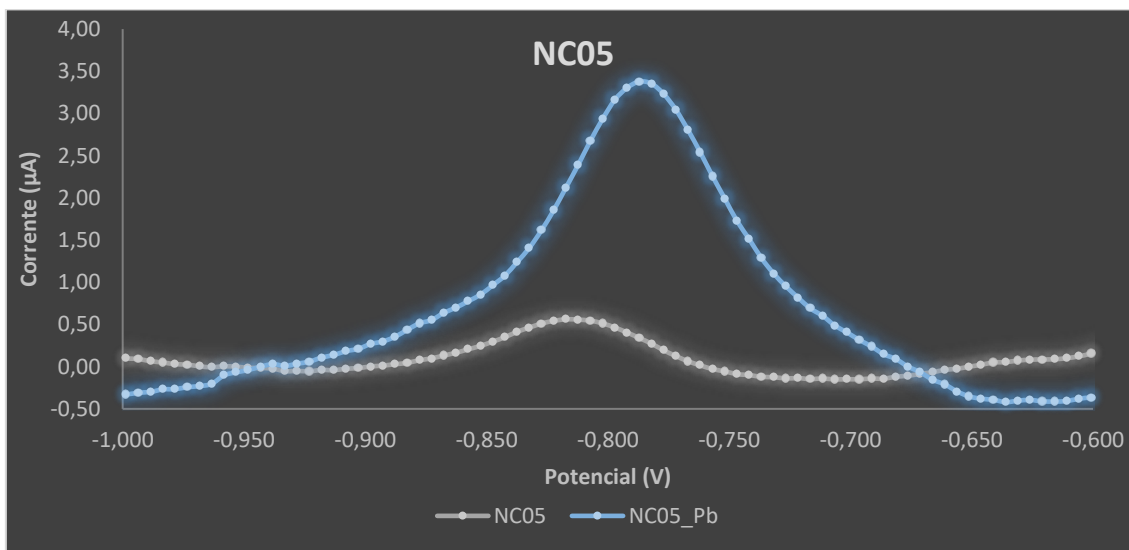


Figura 55 - Comparação da resposta da amostra NC05 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

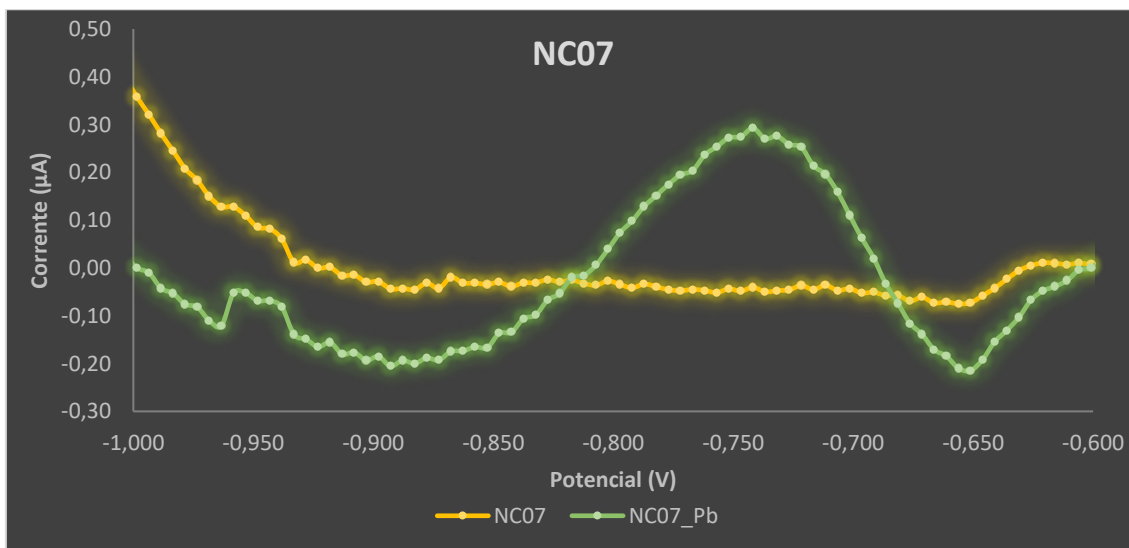


Figura 56 - Comparação da resposta da amostra NC07 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

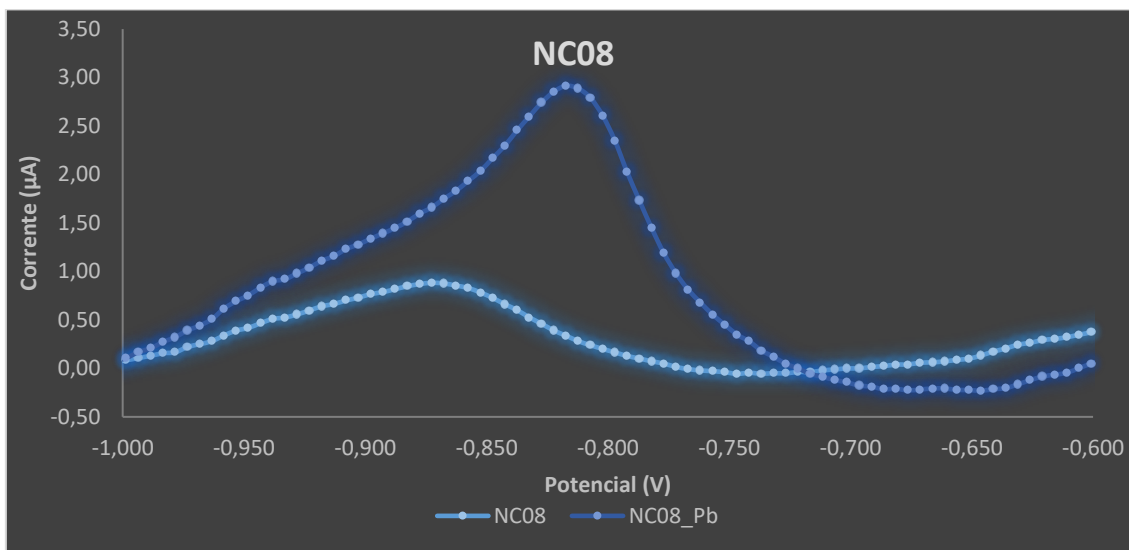


Figura 57 - Comparação da resposta da amostra NC08 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

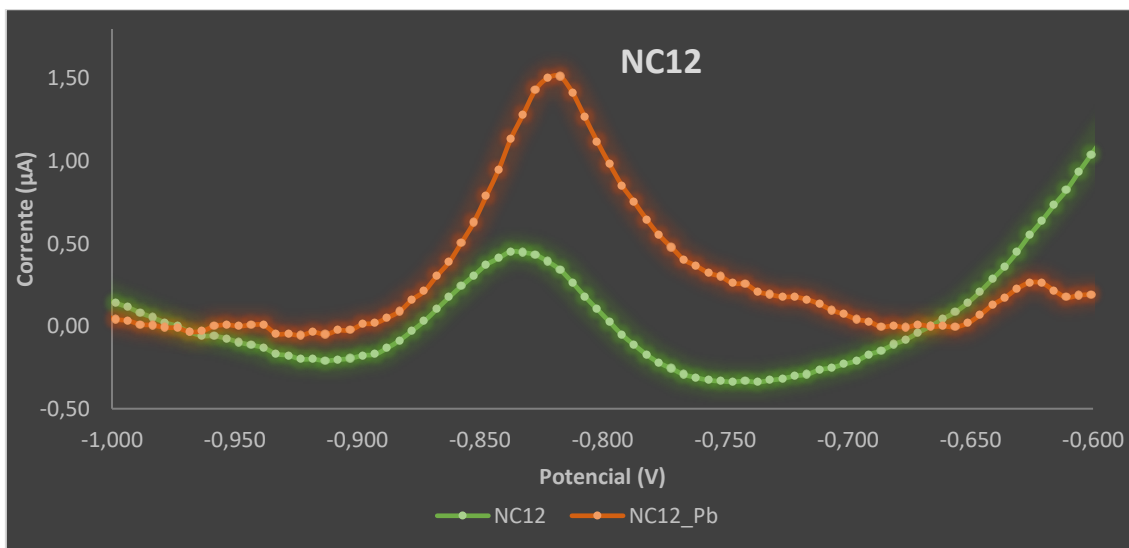


Figura 58 - Comparação da resposta da amostra NC12 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

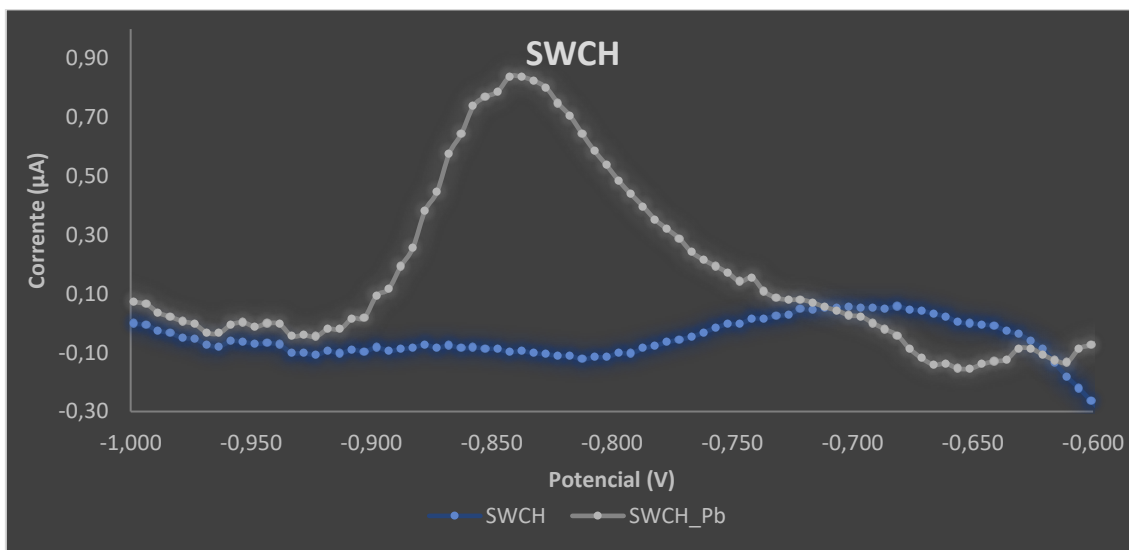


Figura 59 - Comparação da resposta da amostra SWCH sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

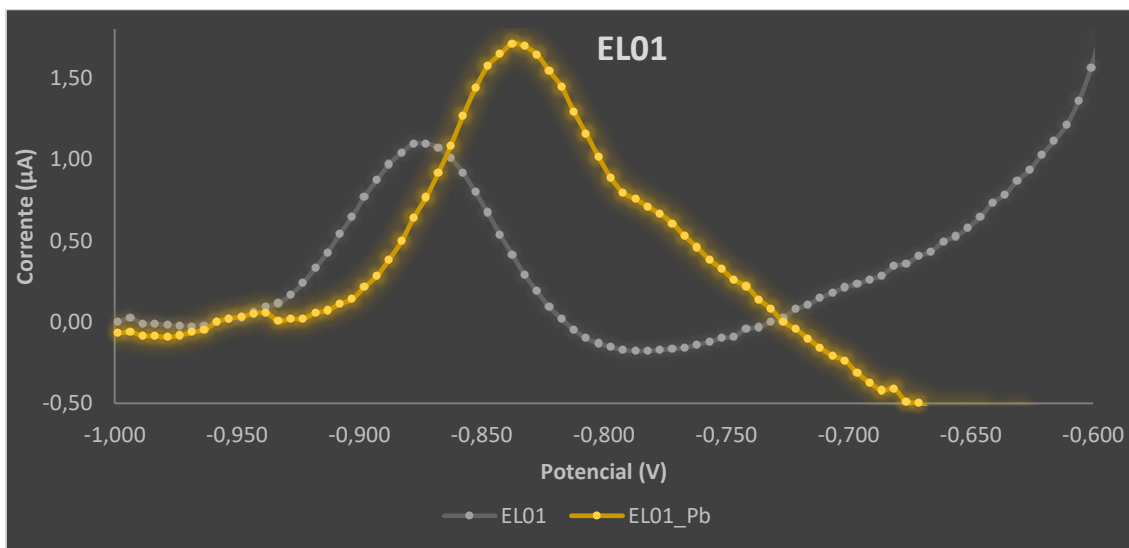


Figura 60 - Comparação da resposta da amostra EL01 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

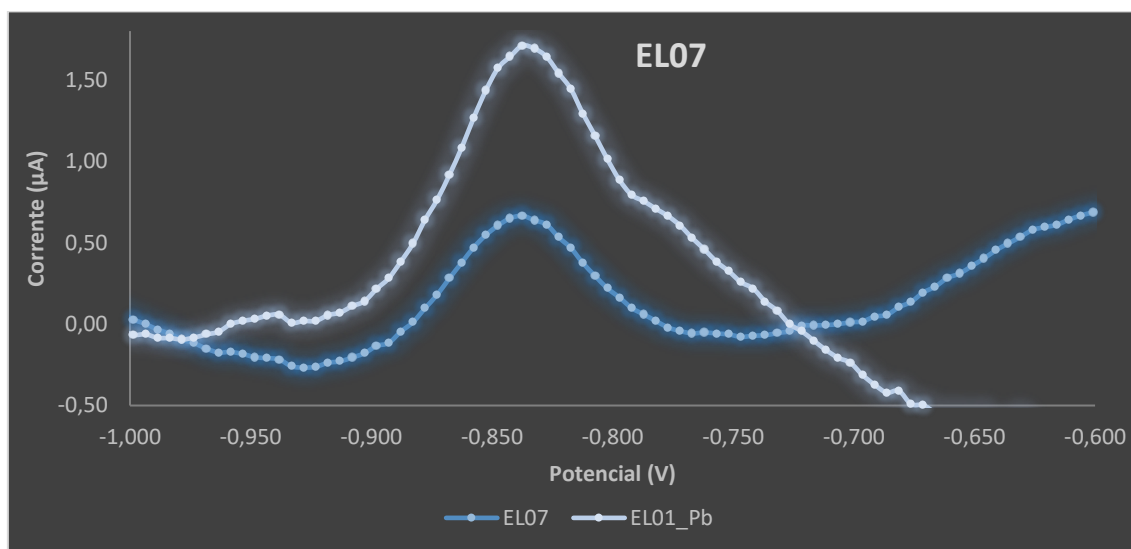


Figura 61 - Comparação da resposta da amostra EL07 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

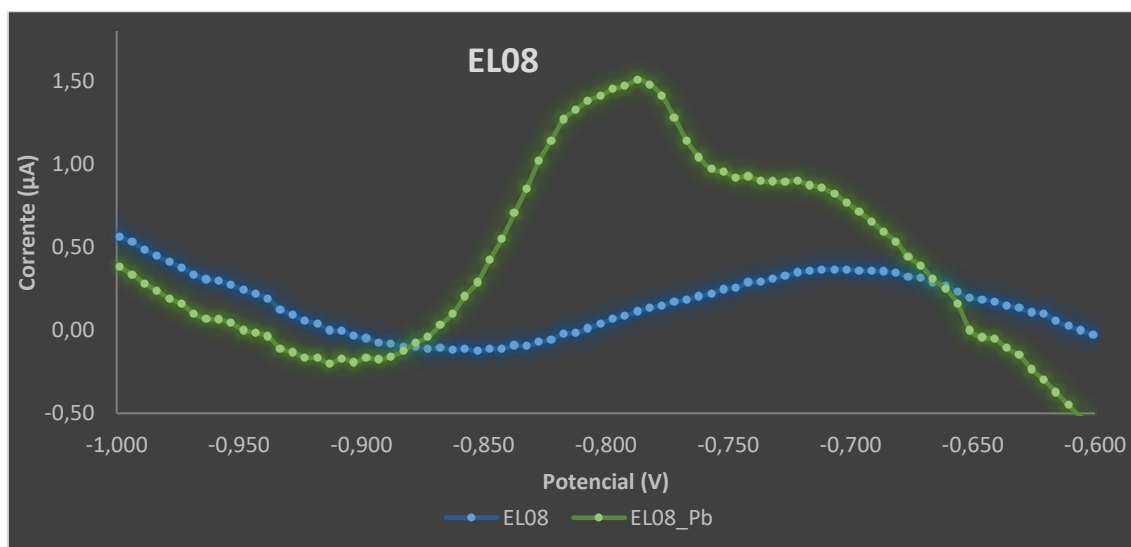


Figura 62 - Comparação da resposta da amostra EL08 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

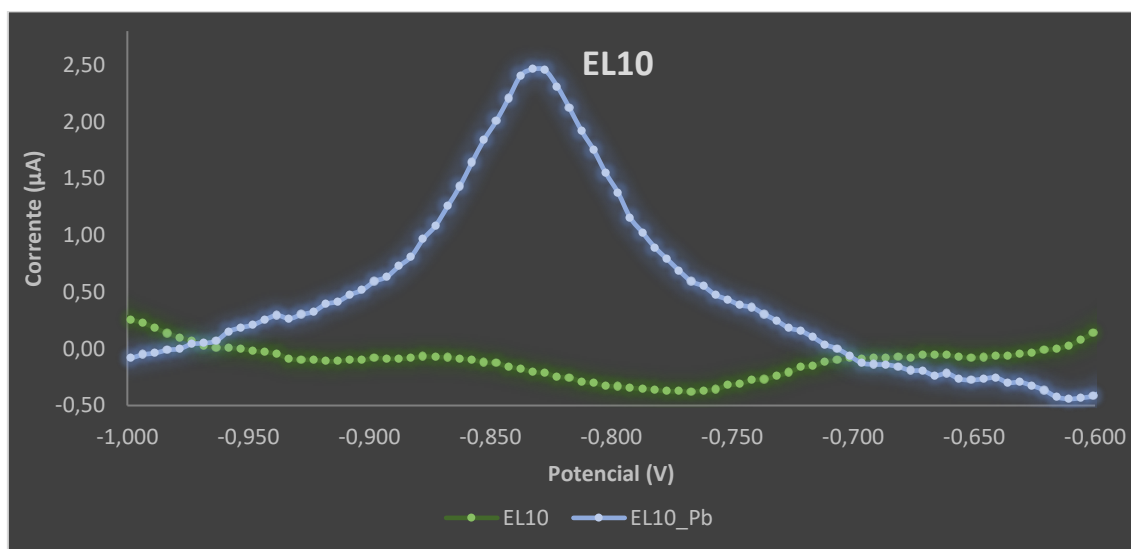


Figura 63 - Comparação da resposta da amostra EL10 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

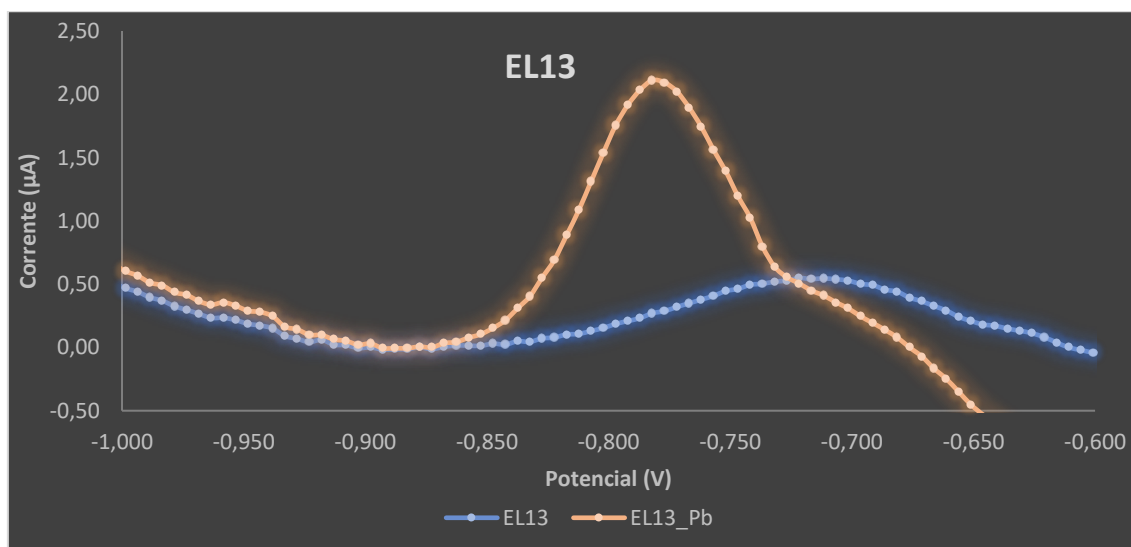


Figura 64 - Comparação da resposta da amostra EL13 sem adição de Pb e com adição de 15µL de Pb.

Anexo 5 – Poster apresentado no 18º encontro da Sociedade Portuguesa de Eletroquímica



Development of voltammetric methodologies towards the detection of benzo(a)pyrene in black tattoo inks



Bruna Ramos^a, Jorge Ginja Teixeira^{a,b,*} and Dora Martins Teixeira^{a,b}

^a Chemistry Department of Science and Technology School and HERCULES Laboratory, Évora University, CLAV, Rua Romão Ramalho n.º 59, 7000-671 Évora, Portugal; *jmg@uevora.pt

Introduction

Nowadays, it's well known that the use of tattoos and permanent make-up has grown in popularity all over the world, particularly amongst the young population. Naturally that the direct and permanent contact of these products with the skin of an individual raises some questions on the health risks involved, due to the presence of chemicals with adverse effects towards the humans. At the same time, the possibility to acquire online tattoo inks, without the proper risk assessment on the chemicals contained therein, has substantially increased [1,2]. Among the various chemicals found in tattoo inks with adverse health effects are the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), being one of the most representative of this class, the benzo(a)pyrene (BaP). This compound can be found, especially, in black tattoo ink [1]. To detect and assess the presence of this compound in the materials, it is necessary to use very sensitive analytical methods. Knowing that the electroanalytical methods offer this possibility, and that this approach has not been yet duly explored, it is proposed a simple voltammetric method to detect BaP in black tattoo inks.

The developed method is based on the anodic voltammetric response of BaP at a boron doped diamond electrode (BDDE), in 0.1 M LiClO₄ acetonitrile solution to which was added a small quantity of water. In the present method it is used a voltammetric cell, in which less than 250 µL of electrolyte supporting solution are used. The proposed method presents a good performance for the detection of BaP and its applicability is demonstrated in spiked samples of black tattoo inks.

Experimental

Electrochemical Technique: Differential Pulse Voltammetry (DPV).

Electrochemical Equipment: Potentiostat/Galvanostat AUTOLAB from Ecochemie B.V. (Holland), model PGSTAT302N controlled by software NOVA, version 1.9.

Electrodes (standard three-electrode cell configuration): Working electrode - Boron Doped Diamond Electrode (BDDE; ϕ = 3 mm from Winsor Scientific Ltd., UK); Reference electrode - Silver wire; Auxiliary electrode - Glassy carbon rod.

Reagent and stock solutions: Benzo(a)pyrene (BaP; >96% HPLC from SIGMA; Product Number B1760); Stock solution 1 (100 µg/mL, in acetonitrile); Stock solution 2 (1000 ng/mL) and Stock solution 3 (100ng/mL) were both prepared from stock solution 1, in acetonitrile (ACN).

Supporting electrolyte solution: LiClO₄ in acetonitrile (diluted to 0.1 M).

Sample preparation and analysis: An appropriate mass (app. 30 mg accurately weighed) of two commercial black tattoo inks (A and B) were dried and extracted with acetonitrile; Afterwards, an aliquot of each extract was diluted in ACN to a final volume of 10 mL; Finally, an appropriate aliquot of each extract (undoped or doped with BaP) was transferred to the mini electrochemical cell - final volume: 200 to 220 µL.

Results and Discussion



Fig. 1 - Black ink tattoo and commercial black ink.

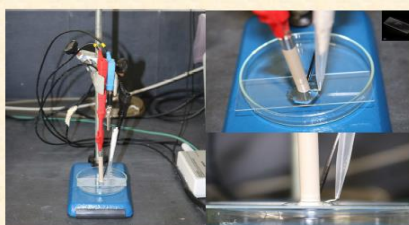


Fig. 2 - Mini electrochemical cell with three-electrode cell configuration. The solution is placed on a well of a special microscope glass slide.

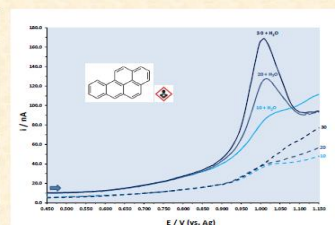


Fig. 3 - Differential pulse voltammograms of 10 and 30 ng BaP in 0.1 M LiClO₄/ACN (200 µL), without and with 20 µL of water.

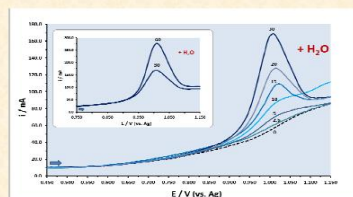


Fig. 4 - Differential pulse voltammograms of 2.5 to 60 ng BaP in 0.1 M LiClO₄/ACN (200 µL) with addition of 20 µL of water.

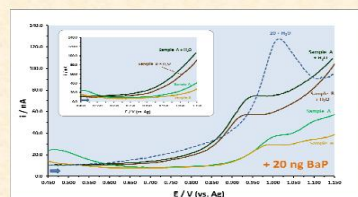


Fig. 5 - DPVs of samples A and B doped with 20 ng BaP in 0.1 M LiClO₄/ACN (200 µL), without and with addition of 20 µL of water. The inset shows the differential pulse voltammograms of samples A and B undoped with 20 ng BaP.

- ☑ The voltammetric response of BaP at the BDDE corresponds to an anodic peak around 1.0 V vs. Ag, that can be used for its electroanalytical detection and determination.
- ☑ The voltammetric response of BaP in ACN is greatly enhanced in the presence of water (Fig. 3), corroborating the observations made by Jeffric and Adams at platinum electrodes [3].
- ☑ In the presence of water, the voltammetric signal of BaP increases with its concentration/mass.
- ☑ The proposed electrochemical mini-cell it's a simple and suitable assembly for the determination of BaP in black tattoo inks.
- ☑ The sample's composition has effect on the peak potential and height of the BaP's anodic peak.

Conclusions

1. In the presence of water, the BDDE showed good response and a relatively low limit of detection for benzo(a)pyrene (BaP).
2. The electrochemical mini-cell developed in this work is very simple and allows us to detect rapidly BaP in tattoo inks.
3. In the tested conditions, BaP was not detected in any of the commercial samples.

References

- [1] E. Jacobsen, K. Tanning, E. Pedersen, N. Bernth, J. Serup, T. Høgsberg, E. Nielsen, Chemical Substances in Tattoo Ink, Survey of chemical substances in consumer products, Miljøstyrelsen, 2012, no. 116.
- [2] P. Piccinini, I. Bianchi, S. Pokalin, C. Senaldi, Safety of tattoos and permanent make-up: Compilation of information on legislative framework and analytical methods, Report EUR 27394 EN, JRC Technical Report, Joint Research Centre, European Commission, 2015.
- [3] L. Jeffric, R.N. Adams, Electrochemical Pathways of Benzo(a) pyrene, J. Amer. Chem. Soc., 92 (1970) 1332-1337.

Anexo 6 – Apresentação de comunicação oral nas Jornadas do Departamento de Química 2017

ANÁLISE DE CHUMBO EM TINTAS DE TATUAGEM ATRAVÉS DE MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

A Tatuagem

A Tinta

O Processo

Os Resultados

Breves Conclusões

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ginja Teixeira

UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Bruna Ramos, Mestrado em Bioquímica