

**Miriam Arl**

**TINTAS DE TATUAGEM: IDENTIFICAÇÃO DOS  
COMPONENTES E RESPOSTAS TOXICOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Ambiental da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do título de Mestre em  
Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. William Gerson  
Matias, Dr.

Coorientadora: Denice Schulz  
Vicentini, Dra.

**Florianópolis  
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Arl, Miriam

TINTAS DE TATUAGEM: IDENTIFICAÇÃO DOS  
COMPONENTES E RESPOSTAS TOXICOLÓGICAS / Miriam Arl ;  
orientador, William Gerson Matias, coorientadora,  
Denice Schulz Vicentini, 2018.

86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis,  
2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. tintas de tatuagem.  
3. toxicologia. 4. in vivo. 5. in vitro. I. Matias,  
William Gerson. II. Vicentini, Denice Schulz . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Miriam Arl

**TINTAS DE TATUAGEM: IDENTIFICAÇÃO DOS  
COMPONENTES E RESPOSTAS TOXICOLÓGICAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental

Florianópolis, 22 de Fevereiro de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup>. Maria Eliza Nagel Hassemer, Dr.<sup>a</sup>. (Coordenadora do Curso)

**Banca Examinadora:**

---

Prof. William Gerson Matias, Dr.  
(Orientador) / UFSC

---

Denice Schulz Vicentini, Dr.<sup>a</sup>  
(Coorientadora) / UFSC

---

Prof. Rodrigo de Almeida  
Mohedano, Dr.<sup>a</sup> (Membro da  
Banca) / UFSC

Prof. Rozangela Curi Pedrosa,  
Dr.<sup>a</sup> (Membro da Banca) / UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Claudia Beatriz Nedel  
Mendes de Aguiar, Dr.<sup>a</sup>. (Membro  
da Banca) / UFSC

---



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa etapa em minha formação, em especial ao meu orientador Prof. William Gerson Matias pela oportunidade de desenvolver um trabalho com um tema diferenciado no Laboratório de Toxicologia Ambiental.

A minha coorientadora Denice S. Vicentini e ao meu colega de laboratório Diego Nogueira pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho e também pela amizade e companheirismo. Aos técnicos do LAMEB e LCME por serem pessoas maravilhosas e envolvidas com todos os projetos que abraçam.

Nunca deixarei de agradecer ao Rafael Trevisan, que me ensinou como ser uma pesquisadora em tempos de graduação, tornando mais fácil o desenvolvimento desta etapa.

À todos os meus amigos que me fazem acreditar na beleza da vida e no valor das relações humanas, em especial a Maria Gabriela, Janine e João Gabriel que incentivaram e estiveram comigo durante este processo de aprendizado.

Dedico este trabalho principalmente à minha família, pelo apoio e suporte todos esses anos longe de casa. Ao meu pai Valdemar motivador dos meus estudos em biologia, que me ensinou a lutar pelo que acho correto, sendo minha inspiração para seguir sempre em frente, à minha mãe Cely por todo amor e acolhimento e a minha irmã Raquel que preenche meu coração de alegrias.

A UFSC, ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental e ao CNPq e CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa e financiamento.



As letras e a ciência só tomarão seu verdadeiro lugar na obra do desenvolvimento humano no dia em que, livres de toda servidão mercenária, forem cultivadas pelos que as amam e para os que as amam.

(Piotr Kropotkine, 1892)



## RESUMO

Na última década o número de pessoas que aderiram à tendência de tatuar o corpo aumentou significativamente. Isto elevou a produção e o desenvolvimento de tecnologias aplicadas às tintas de tatuagem. Entretanto, as exigências das agências reguladoras para essas tintas são pouco rígidas e alguns componentes podem ser prejudiciais tanto para os humanos como para o meio ambiente. Neste sentido, foram estudadas quatro tintas comerciais de tatuagem (azul, verde, vermelho e preto) para identificar a composição e possíveis efeitos toxicológicos. A fim de caracterizar as tintas de tatuagem foram realizadas análises térmicas, microscopia eletrônica de transmissão (TEM), potencial zeta (PZ), diâmetro hidrodinâmico (DH), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). A avaliação toxicológica *in vivo* foi realizada com testes de germinação e crescimento em *Lactuca sativa* e efeitos agudos e crônicos em *Daphnia magna*. A avaliação *in vitro* consistiu em análises de viabilidade celular, indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e apoptose em células HaCat. A análise da composição das tintas de tatuagem confirmou os grupos funcionais dos veículos e pigmentos orgânicos, indicou a presença de partículas nanométricas e alguns elementos químicos não descritos na embalagem em quantidades inferiores a 5%, caracterizando-os como aditivos. A avaliação toxicológica indicou toxicidade significativa para as tintas de tatuagem, com resultados distintos nos parâmetros testados para tintas azul e verde, apesar dos níveis semelhantes de metais. A tinta vermelha apresentou maior toxicidade, devido às concentrações analisadas serem menores do que as utilizadas para as outras tintas e mesmo assim mais significativas. A maior toxicidade das tintas vermelha, seguida pela verde, possivelmente é relacionada aos pigmentos azo. A tinta preta se mostrou a mais segura toxicologicamente. Este estudo contempla uma visão geral da composição e dos efeitos toxicológicos das tintas de tatuagem em células epidérmicas e no meio ambiente.

Palavras-chave: Tinta de tatuagem, nanopartículas, toxicologia, *Daphnia magna*, *Lactuca sativa*, células HaCat



## ABSTRACT

In the last decade the number of people who have adhered to the global trend of tattooing the body has increased significantly. This has raised the production and development of technologies applied to tattoo inks. However, regulatory agency requirements for these inks are poorly enforced and some components can be harmful to both humans and the environment. In this sense, four commercial tattoo inks (blue, green, red and black) were studied to identify the composition and possible toxicological effects. In order to determine the composition and size of the particles contained in the inks thermal analyzes, transmission electron microscopy (MET), zeta potential (PZ), hidrodinamic diameter (DH), X-ray diffraction (DRX), scanning electron microscopy coupled to dispersive energy spectroscopy (MEV-EDS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) were performed. *In vivo* toxicological evaluation was performed through germination and growth tests in *Lactuca sativa* and acute and chronic effects in *Daphnia magna*. The *in vitro* toxicological evaluation consisted of cellular viability analyzes, induction of reactive oxygen species (EROs) and apoptosis in HaCat cells. The analysis of the composition of the tattoo inks confirmed the functional groups of vehicles and organic pigments, indicated the presence of nanometric particles and some chemical elements not described in the packaging in quantities of less than 5%, characterizing them as additives. The toxicological evaluation indicated significant toxicity to tattoo inks, with distinct results in the parameters tested for blue and green inks, despite the similar levels of chemical elements. The red ink presented higher toxicity, due the analyzed concentrations were smaller than those used for the other inks and even more significant. The increased toxicity of green and red inks is possibly related to azo pigments. The black ink proved to be the safest toxicologically. This study provides an overview of the composition and toxicological effects of tattoo inks in epidermal cells and environment.

Keywords: Tattoo ink, nanoparticles, toxicology, *Daphnia magna*, *Lactuca sativa*, HaCat cells



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfis de tamanhos de partículas obtidas por difração a laser, a partir de seis cores de tintas de tatuagem .....	24
Figura 2. Imagem representando a inserção da tinta de tatuagem na pele .....	30
Figura 3. Imagens de MET das nanoestruturas das tintas de tatuagem azul e verde na forma de ST e SF.....	48
Figura 4. Imagens de MET das nanoestruturas das tintas de tatuagem vermelha e preta na forma de ST e SF. ....	49
Figura 5. Espectros no FTIR e tabelas com as absorções vibracionais dos principais grupos funcionais das tintas de tatuagem azul e verde. ....	55
Figura 6. Espectros no FTIR e tabelas com as absorções vibracionais dos principais grupos funcionais das tintas de tatuagem vermelha e preta.....	56
Figura 7 DRX dos sólidos totais (ST) e sólidos fixos (SF) presentes nas tintas tatuagem. ....	57
Figura 8. Identificação qualitativa dos elementos químicos presentes na composição das tintas de tatuagem através de MEV-EDS para as cores azul, verde vermelha e preta em ST e SF.....	60
Figura 9. Comprimento total das plântulas de <i>L. sativa</i> após exposição as tintas de tatuagem.....	64
Figura 10. Foto das plântulas de <i>L. sativa</i> após 7 dias de exposição as tintas de tatuagem.....	65
Figura 11. Imagens de estereomicroscopia de indivíduos sobreviventes de <i>D. magna</i> após os 21 dias de teste crônico com as tintas de tatuagem.....	70
Figura 12 Viabilidade celular através do teste NRU, representando integridade da membrana lisossomal de células HaCat expostas às tintas de tatuagem por 24, 48 e 72 h.....	71
Figura 13 Viabilidade celular através do ensaio de MTT, indicando atividade mitocondrial de células HaCat expostas às tintas de tatuagem por 24, 48 e 72 h. ....	73
Figura 14. Imagens de microscopia de luz das células HaCat expostas por 24 h às tintas de tatuagem.....	75
Figura 15. Indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) através do método de DCFH-DA em células Hacat expostas a tinta de tatuagem por 3, 6, 12 e 24 h. ....	76

Figura 16. Apoptose e necrose avaliadas através do ensaio IP/LA em células HaCat expostas durante 24 h às tintas de tatuagem. ....	78
Figura 17. Imagens de microscopia de fluorescência das células HaCat expostas durante 24 h às tintas de tatuagem marcadas pela coração IP/LA.....	79
Figura 18. Ensaio clonogênico em células HaCat expostas a tinta de tatuagem por 7 dias.....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fórmulas químicas e composições dos pigmentos descritos nos rótulos das embalagens das diferentes cores de tinta de tatuagem..	35
Tabela 2. Concentrações utilizadas, com base nos resultados do teste de MTT, nas análises de indução de ROS, apoptose e ensaio clonogênico.	43
Tabela 3. Porcentagem de massas de ST, SV e SF das tintas de tatuagens.....	46
Tabela 4. PH, PZ e DH das tintas de tatuagem em água de OR, meios de cultivo do microcrustáceo <i>D. magna</i> ISO e M4 e meio de cultura celular Dulbecco (DMEM). .....	52
Tabela 5. Quantificação dos elementos químicos presentes nas amostras através de ICP-OES.....	71
Tabela 6. Germinação (%) de <i>L. sativa</i> expostas às tintas de tatuagem..	63
Tabela 7. Toxicidade aguda das tintas de tatuagem para o microcrustáceo <i>D. magna</i> .....	66
Tabela 8. Toxicidade crônica das tintas de tatuagem para o microcrustáceo <i>D. magna</i> .....	67

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Fórmulas moleculares dos constituintes descritos nas embalagens das tintas de tatuagem azul, verde, vermelha e preta.....	91
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EROs	Espécies reativas de oxigênio
CAT	Catálise
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DRX	Espectrometria de energia dispersiva de raios X
EC <sub>50</sub>	Concentração efetiva do composto para qual 50 por cento do efeito é observado
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (em inglês: Fourier transform infrared spectroscopy)
IC <sub>50</sub>	Concentração de um composto necessária para reduzir o crescimento de células eucarióticas, em 50 por cento, <i>in vitro</i> .
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (em inglês: (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
IP / LA	Iodeto de propideo / Laranja de acridina
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LIMA	Laboratório Integrado do Meio Ambiente
MET	Microscopia Eletrônica de Trasmissão
MEV-EDS	Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectrometria de energia dispersiva de raios X
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol il-2,5-difeniltetrazólio)
NM	Nanomaterial
NP	Nanopartículas
NP	Nanopartícula
NRU	Retenção do vermelho neutro (do inglês “ <i>neutral red uptake</i> ”)
PAH	Hidrocarboneto policíclico aromático
PZ	Potencial zeta
RAS	Regra para análise de sementes
RDC	Resolução da diretoria colegiada
SF	Sólidos fixos
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	OBJETIVOS .....	23
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	24
3.1.	Tintas de Tatuagem .....	24
3.2.	Nanomateriais .....	27
3.3.	Toxicologia das tintas de tatuagem e relação com a derme e epiderme.....	29
3.3.1.	Procedimento de implantação e respostas iniciais .....	29
3.3.2.	Toxicidade das tintas de tatuagem .....	30
3.4.	Regulamentação das tintas de tatuagem .....	32
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
4.1.	Materiais utilizados.....	35
4.2.	Caracterização das tintas de tatuagem .....	35
4.2.1.	Determinação da fração sólida .....	35
4.2.2.	Potencial zeta (PZ) e Diâmetro hidrodinâmico (DH).....	36
4.2.3.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	36
4.2.4.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	37
4.2.5.	Difração de raios X (DRX).....	37
4.2.6.	Microscopia eletrônica de transmissão acoplado a um espectrômetro de energia dispersiva (MEV-EDS).....	37
4.2.7.	Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) .....	38
4.3.	Toxicologia geral.....	39
4.3.1.	Fitotoxicidade em sementes de <i>Lactuca sativa</i> .....	39
4.3.2.	Ensaio de toxicidade com <i>Daphnia magna</i> ( <i>D. magna</i> ) .....	40
4.4.	Toxicologia específica .....	41
4.4.1.	Cultura celular .....	41

4.4.2.	Quantificação da viabilidade celular através do ensaio de NRU .....	42
4.4.3.	Quantificação da viabilidade celular pelo ensaio MTT .....	42
4.4.4.	Produção de EROs .....	43
4.4.6.	Ensaio Clonogênico .....	44
4.5.	Análise estatística.....	45
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
5.1.	Caracterização das tintas de tatuagem .....	46
5.1.1.	Determinação dos sólidos .....	46
5.1.2.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	47
5.1.3.	Potencial zeta (PZ) e Diâmetro hidrodinâmico (DH).....	51
5.1.3.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	53
5.1.4.	Difratometria de raios X (DRX).....	57
5.1.5.	Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV- EDS).....	58
5.1.6.	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).....	61
5.2.	Ensaio toxicológicos .....	62
5.2.1.	Toxicologia geral.....	63
5.2.1.1.	Ensaio de fitotoxicidade em <i>L. sativa</i> .....	63
5.2.1.2.	Ensaio toxicológicos com <i>D. magna</i> .....	66
5.2.2.	Toxicologia específica em células HaCat .....	71
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	83
7.	<b>RECOMENDAÇÕES</b> .....	83
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85

## 1. INTRODUÇÃO

As tatuagens podem ser definidas como a introdução de pigmentos exógenos na derme, a fim de produzir uma pigmentação permanente. Na Europa, foram encontrados registros de tatuagens com motivos espirituais e tribais em torno de 3300 a. C. Ao longo do tempo essa prática evoluiu, representando uma prática cosmética comum em todo o mundo (LAUX et al., 2015).

Na última década, o número de pessoas que aderiram à prática de tatuar o corpo aumentou significativamente, com aproximadamente 36% das pessoas com menos de 40 anos com pelo menos uma tatuagem. (LAUX et al., 2015). No Brasil, apesar de nenhuma pesquisa estimar a população adepta da prática, um censo publicado pela revista Super Interessante em março de 2014 (KIST, 2014) mostrou o perfil das pessoas tatuadas no país. Esta pesquisa entrevistou mais de 80 mil pessoas, a maioria das regiões sudeste e sul e verificou que 60% das pessoas que possuíam tatuagens eram mulheres, 48% dos entrevistados possuía idades entre 19 e 25 anos, 61,2% ensino superior completo ou cursando e 37% possui renda média 3 mil reais mensais.

As tintas de tatuagem movimentam um mercado crescente na economia mundial, englobando os setores de prestação de serviços e fabricação de insumos. Os pigmentos encontrados nas tintas de tatuagem em geral apresentam diâmetros nanométricos e alguns metais em sua composição. Apesar do desenvolvimento de tecnologias para obter novos pigmentos orgânicos e elevar a durabilidade deste produto, estudos sobre esse produto ainda são escassos. Segundo dados da *Web of Science*® (fevereiro 2018), até o momento apenas 472 trabalhos foram publicados a respeito de tintas de tatuagem (*tattoo ink*), porém destes apenas 19 trabalhos estudaram os efeitos tóxicos (*toxicity*), 20 trabalhos fizeram estudos *in vitro* e 18 se relacionam a presença de metais (*metals*) na composição deste produto.

O processo de inserção de pigmentos na camada dérmica depende do tatuador, que pode utilizar instrumentos como espinhos, dentes afiados, pentes, agulhas ou, na maioria dos casos, máquinas elétricas (LAUX et al., 2015). Atualmente, a introdução de normas de higiene estritas, como o uso de agulhas descartáveis e procedimentos de assepsia, bem como requisitos para o licenciamento de estúdios de tatuagem diminuiu o risco de doenças infecciosas, tornando as reações adversas raras, com predominância de reações imunomediadas e

infecções de pele, causadas principalmente pigmentos, que correspondem a maior fração das tintas de tatuagem (LAUX et al., 2015).

No entanto, a utilização de pigmentos não testados, a potencial contaminação de tintas comerciais, e a utilização de tintas de tatuagem não regulamentadas são um problema nessa prática devido à vulnerabilidade da regulamentação e fiscalização da composição das tintas (ISLAM et al., 2016). Isso remete a necessidade de uma maior compreensão sobre a composição e efeitos toxicológicos das tintas no tecido cutâneo e no meio ambiente, uma vez que as tintas podem conter componentes com relevante toxicidade.

Neste estudo foi identificada a composição química de quatro cores de tintas de tatuagem através de técnicas de caracterização térmica, potencial zeta (PZ), diâmetro hidrodinâmico (DH), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS) e espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). A toxicologia global foi determinada utilizando organismos das espécies *Lactuca sativa*, e *Daphnia magna*, frequentemente utilizados em testes de toxicologia ambiental. Os experimentos a nível celular foram realizados com a linhagem celular HaCat, avaliando viabilidade mitocondrial e lisossomal, espécies reativas de oxigênio (EROs), apoptose e atividade proliferativa, a fim de identificar efeitos tóxicos específicos das tintas analisadas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Identificar a composição química de quatro tintas de tatuagem e determinar a toxicidade geral e específica desse material.

### 2.2. Objetivos específicos

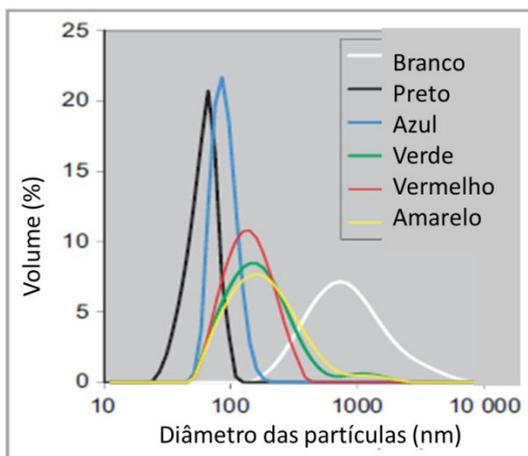
- Determinar a estabilidade das partículas de tinta em suspensão e verificar o diâmetro e morfologia das mesmas;
- Identificar a composição da tinta de tatuagem e quantificar os principais elementos presentes;
- Verificar a toxicidade desse material na planta *Lactuca sativa* e no microcrustáceo *Daphnia magna* enfatizando a questão ambiental;
- Avaliar a viabilidade celular, a produção de EROs, apoptose e atividade clonogênica em células HaCat expostas a tintas de tatuagem *in vitro*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Tintas de Tatuagem

A composição das tintas de tatuagem varia de acordo com o fabricante. Em sua maioria são misturas complexas compostas por veículos (água, glicerina e outros derivados oxigenados), aditivos (polímeros, surfactantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), nanopartículas (NP) e polímeros) e pigmentos (complexos orgânicos ou inorgânicos e NP) (HØGSBERG et al., 2011). O quadro a seguir mostra o tamanho destas estruturas, confirmando que todas as tintas, exceto para a branca, tem uma porção significativa de componentes que se enquadram na faixa de nanoescala.

Figura 1. Perfis de tamanhos de partículas obtidas por difração a laser, a partir de seis cores de tintas de tatuagem (Ft Lauderdale, FL, EUA). Cada tinta contém um tipo de pigmento exceto a tinta verde que consiste de uma mistura dos pigmentos verde e amarelo. Fonte: (HØGSBERG et al., 2011).



Devido a maior concentração nas tintas de tatuagem os pigmentos dominam o foco analítico em tintas de tatuagem, no qual os conservantes e impurezas podem ser considerados o menor dos problemas (LAUX et al., 2015). Os pigmentos empregados nas tintas de tatuagem podem ser orgânicos, compreendendo pigmentos azoicos, hidrocarbonetos aromáticos contendo heteroátomos (nitrogênio (N), oxigênio (O) ou cloro (Cl)) ou grupos funcionais (amina, amida,

hidroxila, etc.) ou complexos de centros metálicos e ligantes orgânicos. Já a tinta preta, formada a partir da combustão incompleta de hidrocarbonetos é composta basicamente por nanopartículas de carbono (C) e a tinta branca é formada basicamente por dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) (HØGSBERG et al., 2011, 2013; REGENSBURGER et al., 2010).

Os pigmentos inorgânicos são geralmente óxidos metálicos (por exemplo, óxido de alumínio, óxido de titânio) que são adicionados intencionalmente como nanopartículas para criar base ou efeitos de cor (LAUX et al., 2015). Misturas entre pigmentos orgânicos e metais são comumente utilizados para criar diferente matiz, brilho ou tom das cores (FORTE et al., 2009).

Dessa forma, os metais podem estar presentes, dependendo da concentração, como pigmentos, aditivos ou contaminantes na forma de sais de metais ou NP. A análise de tintas comerciais mostra que o titânio (Ti), bário (Ba), alumínio (Al) e cobre (Cu) são predominantemente utilizados como corantes, enquanto o antimônio (Sb), arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobalto (Co), chumbo (Pb) e níquel (Ni) tendem a ser contaminantes (LAUX et al., 2015). No estudo de Forte e colaboradores (2009) foi relatado que há contribuição significativa de metais na composição de tintas de tatuagem, e que o arranjo de metais era altamente variável entre marcas e mesmo entre pigmentos semelhantes sendo que os principais metais encontrados em todas as amostras foram Al, Ba, Cu, ferro (Fe) e estrôncio (Sr). Entre os metais alergênicos presentes nas tintas de tatuagem estudadas, o cromo (Cr) era o que se apresentava em concentrações mais elevadas (0,315-147  $\mu\text{g/g}$ ), seguido por Ni (0,037-9,59  $\mu\text{g/g}$ ) e Co (0,0028-6,43  $\mu\text{g/g}$ ). Em 56 tintas de tatuagem, Cr, Ni e Co excederam o limite alergológico seguro de 1  $\text{ng/g}$  em 62,5%, 16,1% e 1,8% de casos, respectivamente.

As concentrações destes elementos podem ser consideradas bastante elevadas, uma vez que as tintas de tatuagem são misturas toxicologicamente indefinidas com pureza de pigmentos inferiores a 80% (ENGEL et al., 2010). É importante ressaltar que os pigmentos foram desenvolvidos para utilizações industriais em tintas, vernizes ou plásticos (LAUX et al., 2015) e alguns estudos retratam a similaridade da matriz de cores em tintas para diversas utilizações como esmalte, serigrafia e tatuagem (BENTLIN; POZEBON; DEPOI, 2009).

Os aditivos não ultrapassam 5% da composição, mas influenciam significativamente na manufatura, estabilidade, aplicabilidade, qualidade e aspecto da tinta. Os aditivos podem ser adicionados para atuar como espessantes, dispersantes, biocidas, conservantes e estabilizantes de ultravioleta, dependendo da aplicação requerida para o

produto (ANGHINETTI, 2012). Em adição aos metais, os surfactantes são adicionados como agentes dispersantes, mantendo os pigmentos dispersos e estabilizam a tinta, evitando a separação dos componentes. A literatura cita que os surfactantes são empregados em baixos percentuais (0,2 a 0,3%) (ANGHINETTI, 2012).

Os surfactantes são moléculas anfifílicas, na qual a porção apolar é frequentemente composta por uma cadeia de hidrocarbonetos, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. A principal propriedade dos surfactantes é promover uma mistura com determinada estabilidade entre fases de diferentes polaridades. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico). Quando os surfactantes são providos de carga é necessário que seja adicionado à solução contra íons a fim de promover a estabilização das micelas, alguns aditivos utilizados como contra íons são:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{Cl}^-$  (SOUZA; PERES; MORAES, 2010).

Os surfactantes anfotéricos apresentam diferentes cargas na sua estrutura, sendo considerados menos agressivos, pois causam menor irritação e, por isso são utilizados em formulações que necessitam surfactantes mais suaves. Os surfactantes não iônicos são utilizados em quase todos os tipos de produtos cosméticos. Dentre as principais características dos surfactantes não iônicos pode-se destacar a melhor eficácia na remoção de gorduras e estabilização de espuma. Mesmo não sendo o principal surfactante atuam como cosurfactantes, alterando de maneira significativa algumas propriedades do produto final como desempenho, viscosidade e estabilidade (DAVE; JOSHI, 2017).

Além dos surfactantes, as tintas de tatuagem podem conter pequenas quantidades de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Os HPA são formados pela combustão incompleta de matéria orgânica e podem estar presentes principalmente na tinta preta como resíduos após a formação das NP de carbono (CARUSO; ALABURDA, 2008; HØGSBERG et al., 2013). Esses contaminantes são resistentes à biodegradação e podem causar efeitos tóxicos em longo prazo, tais como mutagenicidade e carcinogenicidade (HARITASH; KAUSHIK, 2009). Um estudo que analisou 19 tintas comerciais de tatuagem na cor preta mostrou a presença desses contaminantes em concentrações de 0,14 - 201  $\mu\text{g g}^{-1}$  (REGENSBURGER et al., 2010). Apesar disso, a presença deste material não está relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas que em excesso podem

acarretar em danos celulares (HØGSBERG et al., 2013; NEALE et al., 2015).

O número de pessoas que possuem várias tatuagens aumenta constantemente e os corantes e pigmentos utilizados tradicionalmente estão sendo substituídos por materiais que ainda não foram testados anteriormente para este fim. Esta substituição de materiais coincide com um aumento nos relatórios de reações adversas e, portanto, representa um desafio para a regulação e avaliação de risco de tintas de tatuagem em todo o mundo. (LAUX et al., 2015).

### **3.2. Nanomateriais**

Os nanomateriais (NM) são definidos com materiais que possuem pelo menos uma das três dimensões menores que 100 nm e em razão do tamanho reduzido exibem propriedades e comportamentos únicos, que permitem aplicações nas mais diversas áreas como: medicamentos, cosméticos, construção civil, militares, comunicação, entre outras (ISO/TR, 2010). Controversias a respeito da definição podem ser encontradas na literatura, levando em conta que a escala nanométrica enquadra partículas de 1 a 1000 nm, especialmente quando os materiais formam agregados (KHAN; FULEKAR; PATHAK, 2015).

A produção e comercialização de produtos contendo NM, sem um estudo prévio para avaliar os possíveis efeitos tóxicos, pode resultar em danos irreversíveis à saúde humana e ao meio ambiente. Tais danos podem ocorrer, pois os NM apresentam características físicas e químicas diferentes dos compostos em escalas convencionais (ISO, 2010). Esses efeitos são difíceis de prever a partir das propriedades conhecidas da mesma matéria em escala microscópica ou de extrapolações teóricas com base em propriedades atômicas ou moleculares. As investigações no âmbito físico-químico avançam rapidamente; contudo, a compreensão dos efeitos biológicos dos NM na saúde humana e o meio ambiente ainda é limitada. Tais preocupações são expressas pela comunidade científica e também pelo público em geral (KHAN; FULEKAR; PATHAK, 2015).

As propriedades físico-químicas dos NM podem variar conforme a redução de tamanho (área de superfície e a distribuição de tamanho), composição química (pureza, cristalinidade, propriedades eletrônicas, etc.), estrutura de superfície (reatividade da superfície, grupos de superfície, revestimentos orgânicos ou inorgânicos, etc.), solubilidade, morfologia e agregação (NEL et al., 2006). Os NM mais estudados e utilizados são: nanofibras, nanofolhas, nanotubos e NP.

Devido suas propriedades físico-químicas, os NM promovem o aumento da capacidade de penetrar as barreiras fisiológicas, e deslocar-se pelo organismo através da corrente sanguínea, e sua grande área superficial é relacionada à reatividade desses materiais, pela maior quantidade de átomos ou moléculas disponíveis em sua superfície (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

Embora muitas NP possam interagir com as células sem respostas tóxicas agudas, as NP de óxido metálico são mais propensas do que outras em induzir a autofagia devido à sua capacidade de aumentar o estresse oxidativo e os danos catiônicos (ZHANG et al., 2012). A autofagia é um processo evolutivamente conservado de controle da qualidade celular que tem como objetivo a degradação de organelas danificadas e proteínas pelos lisossomos (STERN; ADISESHIAH; CRIST, 2012).

Frequentemente, a toxicidade de NM metálicos está associada a 3 mecanismos principais: (I) liberação de íons tóxicos no meio de exposição, como no caso de NP de zinco (Zn) e prata (Ag), que liberam suas respectivas formas iônicas ( $Zn^{2+}$  e  $Ag^+$ ) em meio aquoso; (II) interação da superfície da NP com o meio produzindo substâncias tóxicas, como radicais químicos e EROs e (III) interação da superfície dos NM com membranas e DNA (BRUNNER et al., 2006).

Os NM são amplamente utilizados na indústria cosmética, onde a maior parte dos produtos são desenvolvidos com base na nanotecnologia. A versão em nanoescala dos ingredientes proporciona uma melhor proteção contra a radiação ultravioleta, penetração profunda da pele, maior estabilidade de ingredientes ativos e efeitos duradouros, além de aumentar a cor e a qualidade na finalização do produto (RAJ et al., 2012).

Dessa forma, podem ser adicionados a constituição dos produtos NP de óxidos metálicos, onde destacam-se o  $SiO_2$  comumente utilizado para controlar a viscosidade do produto, adicionar massa e reduzir a transparência de uma formulação,  $Al_2O_3$  é utilizado para dar brilho e a adição de  $TiO_2$  se deve as propriedades antifúngicas e antibacteriais (BOROWSKA; BRZÓSKA, 2015; RAJ et al., 2012).

Outros trabalhos já verificaram que as partículas de tintas de tatuagem possuem diâmetros nanométricos e elementos metálicos em sua composição, evidenciando assim a incerteza toxicológica da utilização desse produto (BEUTE et al., 2008; FORTE et al., 2009; GRANT et al., 2015; HØGSBERG et al., 2011).

### 3.3. Toxicologia das tintas de tatuagem e relação com a derme e epiderme

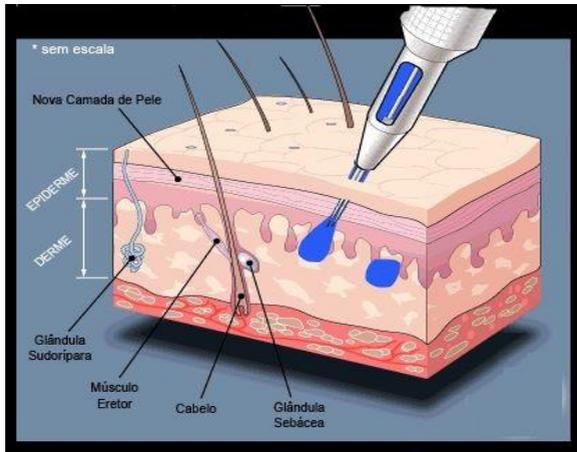
#### 3.3.1. Procedimento de implantação e respostas iniciais

Em tatuagens e maquiagens permanentes os pigmentos são depositados na derme por meio de uma agulha (Figura 2). Este processo garante que os pigmentos não possam ser removidos e, dessa forma o organismo é exposto aos componentes das tintas de tatuagem de uma forma direta e por tempo prolongado (FORTE et al., 2009). A quantidade de tinta depositada na derme depende das características da agulha, da tinta, da pele, da profundidade e da densidade das penetrações (GOPEE et al., 2005), sendo usualmente injetada uma quantidade de pigmento que varia entre 0,60 a 9,42 mg/cm<sup>2</sup>, sendo em média 2,5 mg/cm<sup>2</sup> (ENGEL et al., 2008). Apesar do usual tamanho nanométrico das partículas, quando é realizada uma biopsia da pele cicatrizada é possível visualizar os agregados de pigmentos a olho nu (LAUX et al., 2015).

O procedimento causa ruptura da base epidérmica, causando necrose em algumas células dérmicas e epidérmicas e tal como acontece com qualquer tipo de trauma para a derme, a primeira resposta é formar um coágulo a fim de cessar o sangramento resultante. Após aproximadamente 2 h, ocorre o edema seguido por uma migração de células do sistema imune para o local (neutrófilos e macrófagos) com objetivo de fagocitar substâncias estranhas, restos de células e micro-organismos (GRANT et al., 2015; ISLAM et al., 2016), redirecionando algumas partículas para os nódulos linfáticos (ZIRKIN; AVINOACH; EDELWITZ, 2001). Depois de 24 h, são observados agregados de pigmento em fagossomas citoplasmáticos de queratinócitos, macrófagos, mastócitos e fibroblastos. Após um mês, a eliminação transepidérmica ainda está ocorrendo e o pigmento é encontrado em queratinócitos, macrófagos e fibroblastos (ISLAM et al., 2016).

Qualquer matriz extracelular danificada na derme papilar ferida é então reparada através da ação dos fibroblastos, o qual forma o tecido da cicatriz, onde os pigmentos ficam alocados (GRANT et al., 2015). Com a membrana basal da pele restaurada, presumivelmente não ocorre mais eliminação transepidérmica (ISLAM et al., 2016), porém após longos períodos de tempo, as partículas de tinta de tatuagem podem mover-se gradualmente para a derme profunda (ou seja, derme reticular), o que dá à tatuagem uma aparência desbotada e turva (GRANT et al., 2015).

Figura 2. Imagem representando a inserção da tinta de tatuagem na pele.



Em um experimento utilizando camundongos com a mesma concentração de tinta utilizada em humanos, observou-se que após 42 dias a concentração de tinta diminuiu 32%. As biopsias mostraram que as células carregadas de pigmento se aglomeravam em torno de pequenos vasos, presumivelmente, em uma tentativa de eliminar pigmento da tatuagem como numa reação normal de reconhecimento de corpo estranho através do sistema linfático, corrente sanguínea e rota transepidérmica (ENGEL et al., 2010).

### 3.3.2. Toxicidade das tintas de tatuagem

A toxicidade de tintas de tatuagem é relacionada a infecções de pele geralmente causadas por *Staphylococcus* sp. e reações imunomediadas (ISLAM et al., 2016). Também são reportadas como condições menos frequentes o desenvolvimento de condições cutâneas, como reações pseudolinfomatosa e hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Como condições raras e dependentes de uma condição genética pré-existente, pode ocorrer a evolução no linfoma neoplásico, carcinoma de células escamosas e queratoacantoma (BASSI et al., 2014).

A exposição às tintas de tatuagem pode induzir a formação de EROs, que em excesso pode causar danos em macromoléculas como lipídeos, proteínas e/ou DNA e conseqüentemente nas funções celulares (XIA et al., 2014). Já foi relatado indução de EROs após exposição a diferentes cores de tinta de tatuagem (BOURDON et al., 2012;

HØGSBERG et al., 2013; NEALE et al., 2015). Apesar da literatura citar os HPA como potenciais causadores dessa resposta, foi confirmada que a produção de EROs em tintas pretas comerciais é variável conforme a marca e com o estado de agregação das partículas, mas não com a quantidade desse composto (HØGSBERG et al., 2013).

Em outro trabalho, que estudou duas tintas comerciais das cores amarela e preta, usando como modelo para respostas fisiológicas de tatuagem em humanos ratos da linhagem SKH-1 foi verificado que esses animais além de produzirem respostas histológicas similares à da pele humana também houve aumento da concentração da proteína fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), envolvido em respostas transcricionais relacionadas a estímulos como o estresse, no tecido cutâneo. Biomarcadores relacionados à inflamação e proliferação celular também tiveram seus níveis elevados após o procedimento tais como a proteína ornitina descarboxilase, ciclo-oxigenase-1, ciclo-oxigenase-2. Estes foram elevados nos 4 primeiros dias após o procedimento e retomaram a normalidade após 14 dias. Os níveis de interleucina-1 beta e interleucina-10 se elevaram somente nos linfonodos dos animais, mas não na pele tatuada. Ainda neste mesmo estudo, foi constatado que após o terceiro dia, os animais tatuados apresentaram pigmentação nos nódulos linfáticos aumentando a incidência no 14º dia posterior ao procedimento nos linfonodos inguinais e axilares (GOPEE et al., 2005). Apesar de alguns estudos relatarem a presença de pigmentos de tinta de tatuagem em nódulos linfáticos, nenhum relata a presença em outro órgão distante (GOPEE et al., 2005; LEHNER et al., 2014; ZIRKIN; AVINOACH; EDELWITZ, 2001).

As razões pelas quais acontecem reações inflamatórias ainda não estão elucidadas, porém o principal efeito crônico adverso desse procedimento são reações alérgicas, onde a cor vermelha se mostra mais problemática, podendo ir de ulceração nas alergias severas até excessiva hiperplasia epidérmica, levando a dermatite interfásica e infiltração de linfócitos T (LAUX et al., 2015).

A tinta reportada como maior risco toxicológico é a vermelha, por possuir grupamentos azo e quinacridonas em seus pigmentos (GAUDRON et al., 2015). A toxicidade pode ser relacionada a reações específicas com as amins aromáticas, as quais são produtos da clivagem dos pigmentos azóicos, porém em estudos histológicos com produtos têxteis essa hipótese também não foi confirmada (LAUX et al., 2015). Juntos, esses estudos apoiam a ideia de que o alérgeno é formado dentro da pele, provavelmente pelo metabolismo, haptênização ou ambos (LAUX et al., 2015).

Para avaliação da toxicidade de um material podem ser utilizados estudos *in vitro* com diferentes tipos celulares, para posterior comparação com estudos *in vivo*. Os testes com células são eticamente mais aceitáveis, sendo menos dispendiosos e mais fáceis de controlar e reproduzir. Para avaliação da citotoxicidade, o controle das condições experimentais é crucial para garantir que a resposta celular corresponda à toxicidade do material adicionado, pois as culturas celulares são sensíveis a mudanças no seu ambiente tais como variações de temperatura, pH, nutrientes e concentração de resíduos (LEWINSKI; COLVIN; DREZEK, 2008).

### **3.4. Regulamentação das tintas de tatuagem**

Nos Estados Unidos as tintas de tatuagem são consideradas cosméticas e a legislação não exige aprovação e revisão pré-mercado. Quando um aditivo de cor se destina a ser injetado, a legislação determina que se deve “Existir provas convincentes que estabeleçam com razoável certeza que nenhum dano resultará do uso pretendido desse pigmento”, todavia, não existe uma lista indicando quais pigmentos são seguros, o que resulta em incerteza. Com o aumento dos eventos adversos, a Food and Drug Administration (FDA) está reconsiderando a abordagem na investigação dos relatos para tomar as medidas apropriadas quando os problemas são identificados e também educar consumidores, indústria e profissionais de saúde sobre as fontes e problemas associados com tintas de tatuagem e maquiagem permanente (LAUX et al., 2015).

As agências reguladoras europeias adotam, principalmente, a resolução ResAP de 2008, a qual fornece instruções gerais sobre composição e rotulagem bem como listas negativas de produtos químicos perigosos que não devem estar presentes em tintas de tatuagem, porém a fiscalização do mercado é um grande desafio. A Suíça tem tido restrições legais para tintas usadas para tatuagens e maquiagem permanente desde 2006. No entanto, uma pesquisa nacional de 2011 mostrou que 37% de 167 tintas e 9% de 23 produtos de maquiagem permanente não estavam em conformidade com a regulamentação vigente (LAUX et al., 2015).

Na Nova Zelândia, onde a tatuagem é uma questão tradicional, sendo tratadas como patrimônio cultural. Os problemas são similares aos dos outros países, sendo as infecções um dos maiores problemas com técnicas tradicionais de tatuagem. Neste país, a preocupação tem sido levantada contra tintas que contém ingredientes muitas vezes

importados através da internet sem restrições e com esterilidade incerta. Todavia pelo contexto especial envolvendo as tintas de tatuagem as autoridades desse país são a favor de uma regulação branda. Estas medidas incluem procedimentos práticos sobre esterilização, lesões e sangramento e gestão de resíduos biológicos e questões de informação e documentação (LAUX et al., 2015).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta a respeito do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos através da RDC 185/2001, sendo as tintas de tatuagem, pertencentes a esse grupo devendo ser comercializadas apenas na sua forma estéril. A tinta de tatuagem segundo essa resolução é considerada um produto médico implantável definido por “Qualquer produto médico projetado para ser totalmente introduzido no corpo humano ou para substituir uma superfície epitelial ou ocular, por meio de intervenção cirúrgica, e destinada a permanecer no local após a intervenção. Também é considerado um produto médico implantável, qualquer produto médico destinado a ser parcialmente introduzido no corpo humano através de intervenção cirúrgica e permanecer após esta intervenção por longo prazo” (ANVISA, 2001). Outra resolução é a RDC 55/2008 que dispõe sobre o registro de produtos utilizados no procedimento de pigmentação artificial permanente da pele, e dá outras providências, definindo pigmentação artificial permanente da pele como “pigmentação exógena implantada na camada dérmica ou na camada subepidérmica da pele com o objetivo de embelezamento ou correção estética” enquadrando os pigmentos, veículos e solventes utilizados para esse fim na regra 8 classe III definida por “produtos de alto risco ao indivíduo e/ou médio risco à saúde pública, sujeitos a registro” (ANVISA, 2008).

Segundo a RDC 55/2008, para a demonstração de segurança e eficácia dos produtos implantáveis deverá ser apresentado relatório de gerenciamento de risco, conforme norma NBR ISO 14971 (ABNT, 2009), a qual analisa o risco para o paciente, operador, outras pessoas e equipamentos relacionados com aquele produto. Também devem ser apresentados relatórios de avaliação biológica e revisão de literatura conforme norma NBR ISO 10993-1 (ABNT, 2013), que propõe uma análise de segurança biológica mais completa, evidenciando a necessidade de testes de citotoxicidade, sensibilização e irritação ou sensibilidade intracutânea para produtos que entram em contato com a pele ou superfície rompida por período prolongado ou permanente.

Os estudos *in vivo* e *in vitro* com tintas de tatuagem têm foco na saúde humana e quase nenhum apresenta resultados sobre os possíveis

danos ambientais causados por tintas de tatuagem, porém os materiais contaminados pelas tintas de tatuagem, como a água utilizada para limpar as agulhas durante o procedimento, embalagens utilizadas, o descarte das tintas após o vencimento e a eliminação de uma quantidade considerável de tinta da pele tatuada no banho após o procedimento podem acarretar na contaminação do meio ambiente. No âmbito ambiental os corantes mais estudados são os alimentícios e têxteis, no caso destes últimos, as legislações exigem tratamento previamente ao lançamento nos corpos de água (JHA; JOBBY; DESAI, 2016; P. RAJAGURU, K. KALAISELVI, K. PALANVELI, 2000).

Neste contexto, estudos epidemiológicos prospectivos de composições de tintas são necessários para identificar o efeito potencial das tintas de tatuagem nas células que estarão em contato com esse material após o procedimento de tatuagem e no meio ambiente. Este estudo determina a composição e o tamanho das partículas de quatro cores das tintas de tatuagem e realiza avaliações toxicológicas *in vivo* e *in vitro*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais utilizados

Foram obtidas tintas de tatuagem estéreis (azul, verde, vermelha e preta) de procedência comercial devidamente registrada na ANVISA. Consta no rótulo das embalagens das tintas que as mesmas são compostas por: água deionizada, surfactantes não iônicos, glicerina vegetal, propileno glicol e pigmentos. A Tabela 1 mostra os pigmentos descritos nos rótulos das embalagens das tintas de acordo com cada cor e as fórmulas moleculares destes componentes podem ser observadas no Anexo A. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental localizado no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Tabela 1. Fórmulas químicas e composições dos pigmentos descritos nos rótulos das embalagens das diferentes cores de tinta de tatuagem

		<b>Pigmento (Color Index)</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Metais descritos</b>
<b>Amostra 1</b>	<b>Tinta azul</b>	CI 77891	TiO <sub>2</sub>	Ti
		CI 51319	C <sub>34</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Amostra 2</b>	<b>Tinta verde</b>	CI 11741	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Cu, Ti
		CI 74260	C <sub>32</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>15</sub> CuN <sub>8</sub>	
		CI 74160	C <sub>32</sub> H <sub>16</sub> CuN <sub>8</sub>	
		CI 77891	TiO <sub>2</sub>	
<b>Amostra 3</b>	<b>Tinta vermelha</b>	CI 12475	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	-
		CI 73915	C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
		CI 51319	C <sub>34</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Amostra 4</b>	<b>Tinta preta</b>	CI 77266	C	-

### 4.2. Caracterização das tintas de tatuagem

#### 4.2.1. Determinação da fração sólida

As tintas de tatuagens apresentam aspecto físico de suspensão viscosa, sendo necessário realizar tratamentos térmicos para determinar as porcentagens de frações de componentes sólidos nas diferentes cores. Esse teste foi realizado em duplicata.

- Determinação dos sólidos totais (ST): A tinta bruta (10 g) foi seca na estufa a 50 °C por 48 h. Depois de seca, a porcentagem

de massa dos ST resultante foi determinada para cada uma das tintas.

- Determinação dos sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF): O T2 consistiu em medir a massa e calcinar as amostras obtidas em ST na mufla a 500 °C por 3 h.

#### **4.2.2. Potencial zeta (PZ) e Diâmetro hidrodinâmico (DH)**

O PZ é relacionado à estabilidade do material em suspensão e a carga superficial do mesmo (MURDOCK et al., 2008) e o diâmetro hidrodinâmico representa o diâmetro efetivo das partículas quando solvatadas com as partículas do meio. As medidas de PZ e DH foram realizadas em suspensões coloidais de tinta de tatuagem previamente diluídas a uma concentração de  $10 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ . As análises foram realizadas no LABTOX – UFSC, utilizando o equipamento Nanobrook 90Plus (Brookhaven, New York, USA). No software do equipamento o modo de operação *Dynamic Light Scattering* (DLS) foi utilizado para determinar o DH e o modo *Phase Analysis Light Scattering* (PALS) para determinar o PZ. Os meios utilizados para determinar esses parâmetros foram água de osmose reversa (OR) com  $0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$  de condutividade, ISO, M4 e DMEM.

#### **4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

A análise de MET consiste na emissão de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10-5 mm Hg e com faixa de magnificação entre 50 a 600.000 vezes. É uma das técnicas mais importantes na caracterização de NM, possibilitando uma resolução capaz de determinar o diâmetro e morfologia dos NM.

A identificação do diâmetro e morfologia dos NM contidos nas tintas de tatuagem foi realizada no LCME da UFSC, no microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL-JEM 1011, com diferença de potencial elétrico de aceleração de 100 kV. As suspensões das amostras de tinta ST e SF foram preparadas através de diluição em OR e sonicadas em ultrassom Q500 Sonicator – Q Sonica 500W, à 150W de potência por 2 min. Após as suspensões foram gotejadas em uma grade de cobre e recobertas com uma filme de carbono.

#### **4.2.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Para obter informações sobre a estrutura química e grupos funcionais presentes nas tintas foi realizada a análise de FTIR. Os espectros de IR das regiões entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  foram obtidos no espectrofotômetro Bruker FT-IR Alpha da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. As amostras de tintas na forma ST foram preparadas em pastilha com KBr por método de transmissão, com exceção da tinta preta, preparada por refletância total atenuada, em contato físico com o cristal ZnSe.

#### **4.2.5. Difração de raios X (DRX)**

Através da análise de DRX são identificadas fases com estruturas cristalinas e amorfas. No caso de materiais cristalinos, os difratogramas permitem identificar os elementos químicos. As análises foram realizadas em um difratômetro de raios X da marca Philips, modelo X'Pert. O ângulo de difração  $2\theta$  é registrado de  $3^\circ$  a  $120^\circ$  em temperatura ambiente. A fonte dos raios X utilizada foi o cobre,  $\text{CuK}\alpha$ , com  $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ . A análise foi realizada no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM), do Departamento de Engenharia Mecânica (EMC) da UFSC.

#### **4.2.6. Microscopia eletrônica de transmissão acoplado a um espectrômetro de energia dispersiva (MEV-EDS)**

A análise de MEV-EDS foi realizada para qualificar os elementos químicos contidos nas tintas. A metodologia de preparação das amostras consistiu em colocar as amostras sobre uma fita dupla face de carbono colada sobre os *stubs*. Posteriormente, as amostras foram recobertas com ouro (para SF) ou carbono (para ST) utilizando o metalizador marca Baltec, modelo CED 030. Para a análise, raios-x são emitidos e recolhidos a 20 kV a uma distância de trabalho de 15 mm e o tempo de aquisição para os espectros foi 30-120 s. Os sinais de raios-x no espectro de EDS foram registrados como picos de energia dos elementos presentes nas tintas. Para isso, foi utilizado o detector EDS-Thermoelectro, aparelho acoplado ao microscópio de varredura modelo MEV JEOL JSM-6390LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) localizado no LCME da UFSC.

#### **4.2.7. Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)**

A análise quantitativa dos elementos contidos nas tintas foi realizada via técnica de espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) no Instituto Oceanográfico da USP através do equipamento da marca Varian modelo 710-ES. Esta técnica analítica é utilizada para determinação de elementos maiores, menores e em níveis de traço baseada nos espectros de emissão óptica dos elementos. Previamente as análises foi realizada a abertura das amostras via digestão ácida, realizada no FIESC – unidade Blumenau 3. A digestão consistiu em adicionar 4 mL  $\text{HNO}_3$  e 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e proceder um gradiente de aquecimento em micro-ondas modelo Ethos-UP de: 5 min a 250 W; 5 min a 400 W; 10 min a 600 W. Após o esfriamento as amostras foram avolumadas para 50 ml. O teste foi realizado em duplicado e a validação do método foi realizada por padrão de referência certificado de solo contaminado SS-1 (EPA, 1992).

### 4.3. Toxicologia geral

#### 4.3.1. Fitotoxicidade em sementes de *Lactuca sativa*

Popularmente conhecida como alface, a *L. sativa* representa os ecossistemas terrestres e as informações geradas a partir dos estudos de fitotoxicidade proporcionam conhecimento a respeito do possível efeito dos contaminantes nas comunidades vegetais das margens dos corpos de água contaminados. A espécie também é interessante por sua importância no setor agrícola, sendo também uma das principais espécies vegetais empregadas na avaliação da germinação, pela facilidade de obtenção das sementes e por oferecer resultados rápidos e fáceis de avaliar (SOBRERO, 2004).

Para avaliar a fitotoxicidade, foram adquiridos pacotes de sementes de alface da espécie *L. sativa* em um único estabelecimento comercial de Florianópolis/SC. As sementes utilizadas foram da marca FELTRIN® com 99,7% de pureza e validade até agosto de 2017. Os testes foram realizados com base nas Regras para análise sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Para *L. sativa*, as condições propostas nas RAS recomendam a realização do teste sobre papel filtro no interior de placas tipo petri, a temperatura variando entre 15 °C e 20 °C. A duração do teste foi de 7 dias.

Os testes foram realizados em placas tipo petri de vidro com dimensões de 15 cm de diâmetro e 2,5 cm de altura. As placas petri foram forradas com dois discos de papel filtro com porosidade 28 µm, sendo dispostas 10 sementes espaçadas igualmente em cada uma delas. Os papéis foram umedecidos com as soluções das tintas em água de OR no início e na metade do teste. A quantidade de amostra (em ml) aplicada, conforme recomendado pela RAS, foi de 2 a 3 vezes o peso do substrato (em mg). A partir de testes preliminares, optou-se por investigar as concentrações 1, 10, 50 e 100 mL L<sup>-1</sup> de cada cor de tinta estudada realizando ao todo 4 réplicas de experimento. O controle negativo foi realizado somente com água de OR. No sétimo dia o tratamento foi finalizado e a quantidade de sementes germinadas, ou seja, que apresentaram emergência no desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião foi avaliada. Ainda, mediu-se o tamanho da radícula (raiz primária da planta) para analisar estatisticamente se ocorreu comprometimento no desenvolvimento.

### 4.3.2. Ensaios de toxicidade com *Daphnia magna* (*D. magna*)

*D. magna* são microcrustáceos planctônicos de água doce pertencentes à subclasse Phyllopoda, amplamente distribuída por todo o hemisfério norte e na África do Sul. Esses organismos são comumente utilizados em estudos evolutivos e ecotoxicológicos, devido o amplo conhecimento sobre seu ciclo de vida e facilidade de cultivo em laboratório.

#### 4.3.2.1. Cultivo do microcrustáceo *D. magna*

A manutenção do cultivo de *D. magna* foi realizada de acordo com a NBR 12713 (ABNT, 2016) e ISO 6341 (ISO, 1996). Grupos de 25-35 animais adultos foram mantidos em recipientes de vidro contendo em média 1,5 L de meio de cultura composto por água destilada reconstituída de nutrientes (M4), em incubadora com temperatura de  $20 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16/8 h claro-escuro. A manutenção do cultivo foi realizada três vezes por semana, na qual os frascos foram limpos e os meios renovados. A alimentação dos lotes consistiu-se de algas verdes *Scenedesmus subspicatus* em uma concentração de  $3,5 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>.

#### 4.3.2.2. Ensaios de toxicidade aguda com *D. magna*

A metodologia para realização dos testes de toxicidade aguda seguiu a norma NBR 12713 (2016). As amostras de tinta de atuação foram avaliadas baseando-se na exposição de neonatos de *D. magna* (filhotes com idade entre 2 e 26 h em diferentes diluições da amostra, por um período de 48 h de exposição a fim de determinar a concentração efetiva (EC<sub>50,48h</sub>) onde 50% do efeito de imobilidade é observado. As diluições foram preparadas em meio ISO descrito na norma ISO 6341 (ISO, 2012), com precisão volumétrica a partir de uma solução mãe com concentração de 1 mL L<sup>-1</sup>. Para cada diluição foram preparadas duas réplicas, contendo 10 indivíduos em cada. Os testes foram realizados na mesma temperatura do cultivo, no escuro e sem alimentação.

#### 4.3.2.3. Ensaio de toxicidade crônica com *D. magna*

A avaliação da toxicidade crônica seguiu a norma ISO 10706 (ISO, 2000), que consiste em expor durante um período de 21 dias neonatos (filhotes com idade entre 2 e 26 h) de *D. magna* a diferentes

diluições da amostra, em meio de cultivo (M4) nas mesmas condições do cultivo (luminosidade, alimentação e troca de meio).

A fim de avaliar os efeitos subletais como longevidade, reprodução, crescimento e alterações morfológicas, foram utilizadas concentrações diferentes para cada amostra de tinta de tatuagem baseando-se na  $CE_{50,48h}$  obtida no ensaio de toxicidade aguda. A concentração mais elevada utilizada nesse ensaio foi de 1/3 da  $CE_{50,48h}$ , seguido por 1/10 posteriormente utilizando o fator de diluição 2. Para cada diluição 10 frascos contendo um organismo em cada foram avaliados. Exceto para a cor preta que em testes preliminares mostrou efeitos aleatórios sem reprodutibilidade, o que influenciou a escolher um fator de diluição maior que nas outras cores.

O parâmetro de reprodução consistiu em contar o número de filhotes de cada réplica ao longo dos 21 dias. O parâmetro de crescimento consistiu em obter imagens de cada indivíduo sobrevivente no teste através de um Estereomicroscópio Olympus SZX16 localizado no LAMEB/UFSC e avaliar o tamanho dos indivíduos através do software Image J. e o parâmetro de longevidade consistiu em analisar a taxa de sobrevivência após 21 dias, estimando a concentração de efeito observado (CEO) e concentração de efeito não observado (CENO) do agente tóxico.

## **4.4. Toxicologia específica**

### **4.4.1. Cultura celular**

A linhagem HaCat (queratinócitos humanos imortalizados) é tida como não-tumorigênica, e se caracteriza por um processo de diferenciação altamente conservado e uma elevada estabilidade genética (BOUKAMP, 1988). Esta linhagem fusiforme cresce aderida na placa de cultivo, e se apresenta como células achatadas quase completamente preenchidas pelo núcleo e formando uma arquitetura epidérmica quase regular (JAEGER et al., 2012).

A linhagem foi cedida pela Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz (CPQBA - UNICAMP) e cultivada em frascos de cultura de 25 ou 75  $cm^2$  em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) enriquecido com 5% Soro Fetal Bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA),  $100 \mu g mL^{-1}$  de penicilina e  $100 \mu g mL^{-1}$  de estreptomomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e mantidos em estufa a  $37^\circ C$  e 5%  $CO_2$  em atmosfera úmida. O

crescimento celular foi monitorado, o meio de cultura trocado de duas a três vezes por semana e as células tripsinizadas quando necessário utilizando uma solução de tripsina a 0,25% EDTA 0,53 mM (Vitrocell) para desprendimento. As células foram utilizadas até a 10ª passagem, e quando necessário se procedia descongelamento de um novo clone.

#### **4.4.2. Quantificação da viabilidade celular através do ensaio de NRU**

Este ensaio baseia-se na capacidade de células viáveis em incorporar o corante NR (Neutral Red - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Esse corante fracamente catiônico penetra nas membranas celulares por difusão passiva não-iônica e concentra-se nos lisossomos, onde se liga através de ligações hidrofóbicas eletrostáticas a ânions e/ou grupos fosfato da matriz lisossomal (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Para este ensaio, células HaCat foram semeadas em placas de 96 poços nas seguintes densidades:  $4 \times 10^4$  cel/poço para o tempo de 24 h,  $2 \times 10^4$  cel/poço para a exposição de 48 h e  $1 \times 10^4$  cel/poço para a exposição de 72 h. As placas foram incubadas a 37 °C com CO<sub>2</sub> a 5% e umidade saturada por um período de 24 h para adesão. Após, o meio foi retirado e procedeu-se a exposição às tintas de tatuagem nas concentrações 1, 10, 100 e 100 µg mL<sup>-1</sup> nos tempos 24, 48 e 72 h. O controle negativo foi exposto ao meio de cultivo. Após a exposição as células foram incubadas com a solução de NR (0,04 mg/mL) por 12 h nas condições de cultivo. Após este período, o NR foi removido e 150 µL de uma solução de ácido acético/etanol/água (1:50:49, v/v/v) foi adicionado para que os cristais criados fossem dissolvidos. Esse ensaio foi analisado espectrofotometricamente em 540 nm UV-visível em leitora de placas (BIOTEC- ILX800) localizado no LABTOX – UFSC utilizando o software Gens5.

#### **4.4.3. Quantificação da viabilidade celular pelo ensaio MTT**

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria por desidrogenases a um produto chamado formazan. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição de um solvente apropriado, neste caso, dimetil sulfoxido (DMSO) (MOSMANN, 1983).

As células HaCat foram semeadas em placas de 96 poços nas seguintes densidades:  $4 \times 10^4$  células / poço para o tempo de 24 h,  $2 \times 10^4$  células / poço para a exposição de 48 h e  $1 \times 10^4$  células / poço para a exposição de 72 h. As placas foram incubadas a 37 °C com CO<sub>2</sub> a 5% e umidade saturada por um período de 24 h para adesão. Após, o meio foi retirado e procedeu-se a exposição às tintas de tatuagem nas concentrações 1, 10, 100 e 100 µg mL<sup>-1</sup> nos tempos 24, 48 e 72 h. O controle negativo foi exposto ao meio de cultivo. Após a exposição, as células foram incubadas com uma solução de MTT 0,5 mg/mL por 2 h nas mesmas condições do cultivo. Após este período, o MTT foi removido e 150 µL de DMSO foi adicionado para que os cristais de formazan criados fossem dissolvidos. Esse ensaio foi analisado espectrofotometricamente em 570 nm UV-visível em leitora de placas (BIOTEC- ILX800) localizado no LABTOX – UFSC utilizando o software Gens5. O teste MTT foi utilizado para encontrar as concentrações adequadas para realizar a análise da indução de EROs, apoptose e ensaio clonogênico (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações utilizadas, com base nos resultados do teste de MTT, nas análises de indução de EROs, apoptose e ensaio clonogênico.

	IC <sub>50,24h/10</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	IC <sub>50,24h</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
<b>Azul</b>	30	300
<b>Verde</b>	29	290
<b>Vermelha</b>	8,4	84
<b>Preta</b>	100	1000

#### 4.4.4. Produção de EROs

A formação de EROs foi quantificada através da sonda 2',7' - diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), a qual permite medir a quantidade de EROs na célula por fluorescência devido a sua oxidação. Para este teste  $4 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 96 poços e após 24 h de fixação as células foram lavadas com PBS e a intoxicação com as tintas nas concentrações IC<sub>50, 24h</sub> e IC<sub>50, 24h/10</sub> (Tabela 2) foi realizada por 3, 6, 12 e 24 h sendo o controle negativo exposto apenas ao meio de cultivo. Após o tratamento as células foram incubadas com DCFH-DA por 30 min para que as enzimas esterases realizem a lise formando a 2',7' - diclorofluoresceína

(DCFH) não fluorescente, que em contato com EROs é oxidado revelando fluorescência (WANG; JOSEPH, 1999). A leitura da fluorescência foi realizada utilizando a multileitora Spectramax Paradigm (480 nm de excitação e 525 nm de emissão) localizado no LAMEB - UFSC.

#### 4.4.5. Coloração IP/LA

Este método baseia-se na revelação diferencial das células por fluorescência, na qual é utilizada coloração pelo iodeto de propídio e laranja de acridina para diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose. O corante laranja de acridina (LA) tem a capacidade de permear todas as células e tornar os núcleos verdes enquanto que o iodeto de propídio (IP) só é absorvido quando a integridade da membrana citoplasmática é perdida, tornando o núcleo vermelho. Dessa maneira, as células viáveis apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. As células em apoptose (membrana ainda íntegra) apresentam manchas verdes brilhantes (condensação da cromatina e fragmentação nuclear) e somente são marcadas por IP na apoptose tardia. As células necróticas possuem núcleos normais, porém vermelhos, devido ao IP (RENVOIZÉ et al., 1998; RIBBLE et al., 2005). Para este teste  $5 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 96 poços e após 24 h de fixação as células foram lavadas com PBS e a intoxicação com as tintas nas concentrações  $IC_{50}$ ,  $24h$  e  $IC_{50, 24h/10}$  (Tabela 2) e controle negativo foi realizada por 24 h. Após o tratamento as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 5' e ressuspensas em 100  $\mu$ L de PBS. Nestas suspensões foram adicionados 10  $\mu$ L da solução LA 100  $\mu$ g/mL e PI 100  $\mu$ g/mL e incubadas por 5'. A análise foi realizada no microscópio Olympus BX31 e um mínimo de 200 células foram avaliadas por amostra. Os corantes IP/LA foram obtidos da Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

#### 4.4.6. Ensaio Clonogênico

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias é um ensaio de sobrevivência celular *in vitro* baseado na capacidade de uma única célula crescer numa colônia de pelo menos 50 células. O ensaio essencialmente testa cada célula na população para a sua capacidade de sofrer divisões “ilimitadas”. Para este teste, duas mil células da linhagem HaCat foram semeadas em placas de 12 poços e após 24 h, com as células aderidas, foram realizados os tratamentos com as tintas

de tatuagem nas concentrações  $IC_{50, 24h}$  e  $IC_{50, 24h/10}$  (Tabela 2) e controle negativo por 7 dias com renovação do meio na metade deste período. Após o tratamento o meio foi descartado, as células lavadas com PBS, fixadas com metanol gelado e coradas com cristal violeta 0,1%. Os poços foram fotografados no Estereomicroscópio Olympus SZX16 localizado no LAMEB/UFSC e as colônias com mais de 50 células foram contabilizadas.

#### 4.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism. Primeiramente, foram realizados testes de normalidade Kolmogorov–Smirnov e para as amostras consideradas normais foram realizadas análises de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey ou ANOVA duas vias seguido pelo teste *post hoc* Newman-Keuls. A porcentagem de germinação da planta *Lactuca sativa*, bem como o teste crônico com *D. magna* foram estatisticamente avaliados através de teste não paramétrico Kruskal-Wallis e o teste agudo com *D. magna* foi analisado através de regressão linear. Os dados foram apresentados como média e erro padrão, utilizando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), 1% ( $p < 0,01$ ) e 0,1% ( $p < 0,001$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização das tintas de tatuagem

#### 5.1.1. Determinação dos sólidos

Após o tratamento térmico mais brando, em que foi removida a umidade das tintas de tatuagem, foram obtidas as porcentagens de massas nomeadas neste trabalho como sólidos totais (ST). Os ST obtidos passaram por um tratamento térmico mais severo que resultou as porcentagens de massas dos sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF) das tintas. Os SV são representados por hidrocarbonetos, polímeros e pigmentos orgânicos. Já os SF representam as massas restantes dos compostos inorgânicos, geralmente de óxidos inorgânicos.

As tintas azul e verde apresentaram as maiores porcentagens de ST, e SF resultantes, indicando maior presença de pigmentos inorgânicos e/ou NP. A tinta preta seguida pela vermelha apresentaram maiores porcentagens de SV. Isto sugere que estas tintas possuem maiores frações de pigmentos orgânicos em relação aos inorgânicos. O mesmo não ocorreu com a tinta azul, que apresentou maior fração de SF do que SV, caracterizando mais pigmentos inorgânicos do que orgânicos nesse material. A tinta preta, que basicamente é composta por carbono, apresentou menos de 1% de SF. Estes poucos SF presentes são representados pelos aditivos inorgânicos adicionados à composição da tinta (Tabela 3). Portanto, nas composições das tintas azul e verde foram obtidas as maiores porcentagens de SF, ou seja, nestas duas tintas existe maior probabilidade de encontrar NP inorgânicas na composição.

Tabela 3. Porcentagem de massas de sólidos totais (ST), umidade, sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF) das tintas de tatuagens após tratamento térmico.

<b>Massa total: 10 g (100%)</b>				
<b>Tinta</b>	<b>ST (%)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>SV (% ST)</b>	<b>SF (% ST)</b>
<b>Azul</b>	51,51	48,49	42,13	57,87
<b>Verde</b>	49,98	50,02	70,35	29,65
<b>Vermelha</b>	35,27	64,73	96,47	3,53
<b>Preta</b>	33,37	66,63	99,14	0,86

### 5.1.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens de MET das tintas de tatuagem nas formas de ST e SF são mostradas na Figura 3 e 4. Nestas imagens foram observadas misturas de nanoestruturas com morfologias variadas, que volatilizaram e/ou sofreram modificações morfológicas. Os ST são compostos por componentes orgânicos (veículos, pigmentos, polímeros) e inorgânicos (NP). Nas imagens dos ST da tinta azul foram identificadas as nanoestruturas orgânicas como sendo as NP de coloração cinza clara, pois estas volatilizaram ou sofreram modificações e desapareceram. As nanoestruturas orgânicas apresentaram morfologias irregulares e diâmetros variados menores que 100 nm. As nanoestruturas inorgânicas também presentes nos ST foram identificadas com sendo as NP de coloração cinza escura ou preta com morfologia tendendo a esférica e diâmetros médios de 200 nm. As imagens dos SF da tinta azul mostraram somente as NP inorgânicas, já visualizadas nas imagens da ST, com diâmetro médio de 179 nm. As imagens da tinta verde também apresentaram as mesmas características descritas para a tinta azul quanto à presença de nanoestruturas orgânicas e inorgânicas nos ST, porém foi observado que as NP inorgânicas representadas pelas cores cinza escura e/ou preta com diâmetro médio de 238 nm, formando domínios aglomerados nos ST da tinta verde, que podem chegar a dimensões micrométricas. Nos SF apareceram somente as NP inorgânicas dispersas com diâmetro médio de 186 nm (Figura 3).

As imagens dos ST da tinta vermelha (Figura 4) mostraram predominantemente nanoestruturas de cor cinza claro, provavelmente dos veículos e pigmentos orgânicos. Estas nanoestruturas possuem diâmetros micrométricos e morfologia irregular, sendo em sua maior parte alongadas formando grandes aglomerados. A quantidade reduzida de NP pretas encontrada dentro dos aglomerados indicou menor quantidade de NP inorgânica na tinta vermelha, essas estruturas possuem diâmetro médio de 68 nm. Isso concorda com a reduzida porcentagem de SF (3,5%). Já nas imagens dos SF da tinta vermelha foram visualizadas NP escuras com diâmetro médio de 262 nm, que representam a pequena porcentagem de NP inorgânicas contido nesta tinta. Foi observado NP menores de cor cinza escuro, contendo 67 nm e maiores com 300 nm.

Nas imagens de MET dos ST da tinta preta (Figura 4) foram visualizadas NP esféricas de carbono, com diâmetro médio de 34 nm, características do único pigmento desta tinta. Não foram visualizadas outras formas de NP, indicando mínima fração de inorgânicos presentes

na composição da tinta. Nas imagens dos SF foi possível verificar formas irregulares com resquícios de partículas esféricas de carbono, provavelmente devido combustão incompleta. A fração de SF da tinta preta, composta basicamente por carbono resultou em uma quantidade muito pequena (0,86%) de resíduo, a qual pode ser atribuída aos aditivos introduzidos na composição da tinta.

Figura 3. Imagens de MET das nanoestruturas das tintas de tatuagem azul e verde na forma de ST e SF.

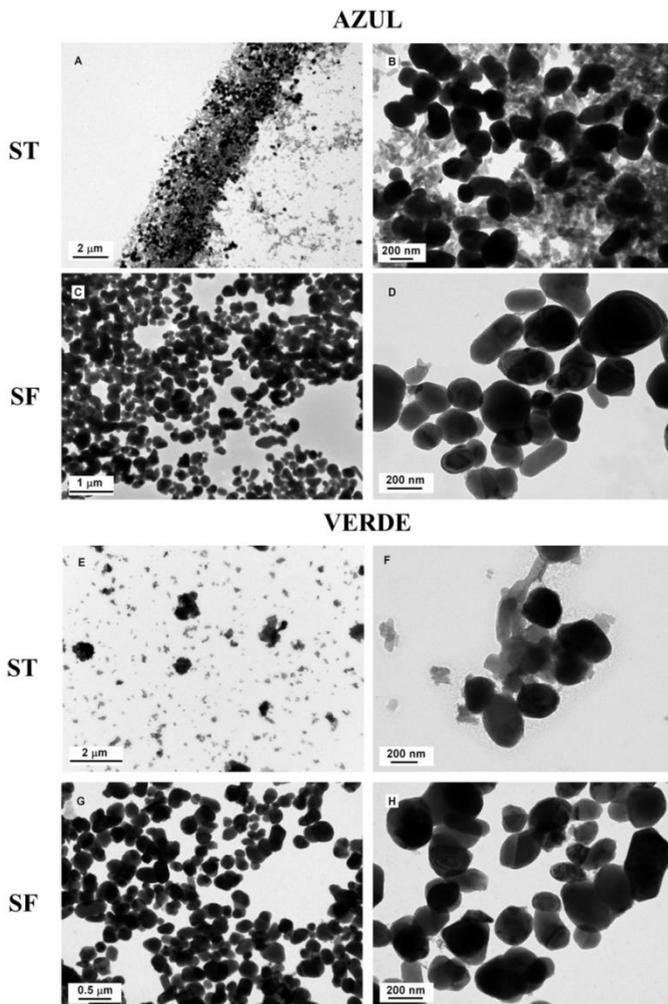
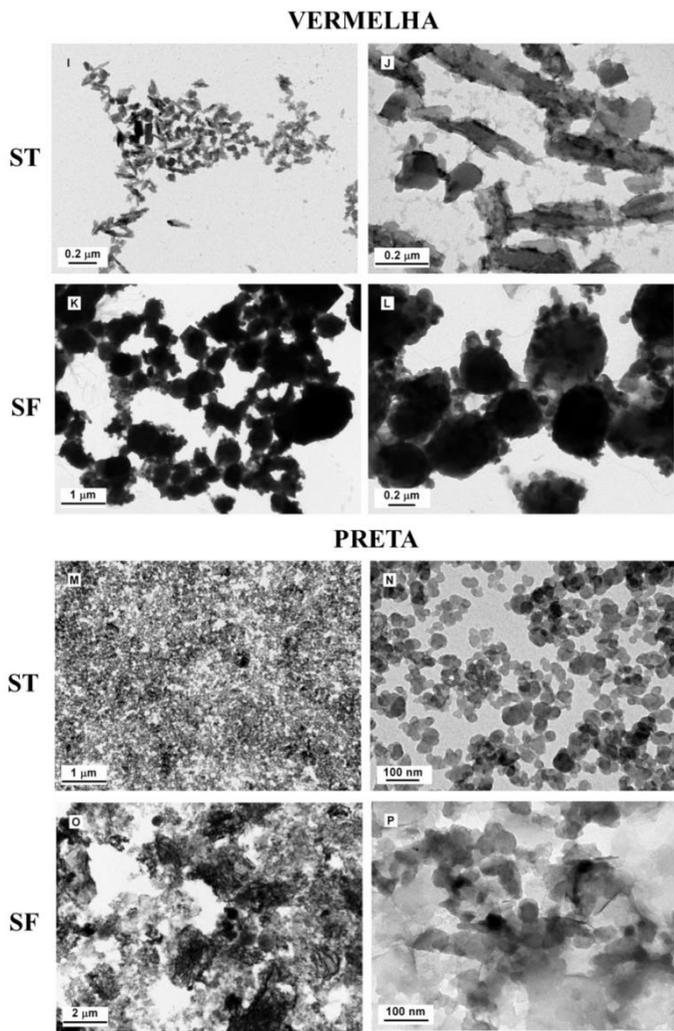


Figura 4. Imagens de MET das nanoestruturas das tintas de tatuagem vermelha e preta na forma de ST e SF.



### 5.1.3. Potencial zeta (PZ) e Diâmetro hidrodinâmico (DH)

As medidas de pH e PZ em água de osmose reversa (OR) mostradas na Tabela 4 indicaram que as partículas suspensas apresentam caráter catiônico devido ao PZ resultar em valores negativos, sugerindo que ânions são atraídos pela carga superficial das partículas. Os pH das suspensões resultaram em valores próximos da neutralidade, porém a tinta verde apresentou pH levemente ácido, ou seja, pH 5. A análise de PZ indicou que a tinta preta apresentou elevada estabilidade em suspensão coloidal devido ao seu menor DH, conforme verificado nas imagens de MET (Figura 3). Para as demais tintas, em água de OR, o PZ ficou entre -24 e -27 mV, indicando menor estabilidade em suspensão comparativamente a tinta preta. A tinta preta pode ser considerada estável de acordo com a teoria, pois segundo a mesma, suspensões com valores acima de -30 mV são consideradas estáveis (JO et al., 2012).

O valor de pH no meio DMEM foi constante para todas as tintas, e os meios ISO e M4 também mostraram essa tendência, porém a tinta azul mostrou-se levemente mais básica que as outras cores. A estabilidade das tintas foi significativamente reduzida nos meios ISO, M4 e DMEM em relação ao meio aquoso, resultando em valores considerados instáveis de acordo com Jo (2012). Adicionalmente, no meio DMEM, foi verificado que as tintas que contêm maior fração de ST e SF são mais instáveis, ou seja, as tintas azul e verde, que contêm a maior fração de NP inorgânicas apresentaram as menores estabilidades.

As tintas azul, verde e vermelha apresentaram DH acima de 200 nm em todos os meios avaliados (Tabela 4). Isso mostra que os componentes destas tintas estão em nanoescala, entretanto apresentam quase o dobro do DH da tinta preta, justificando a menor estabilidade verificada no PZ. A maior estabilidade em suspensão para tinta preta decorre do tamanho reduzido da NP em relação ao tamanho dos componentes das demais tintas.

Tabela 4. pH, potencial zeta (PZ) e diâmetro hidrodinâmico (DH) das tintas de tatuagem em água de osmose reversa (OR), meios de cultivo do microcrustáceo *D. magna* ISO e M4 e meio de cultura celular Dulbecco (DMEM).

Meio analisado	Azul			Verde			Vermelha			Preta		
	pH	PZ (mV)	DH (nm)	pH	PZ (mV)	DH (nm)	pH	PZ (mV)	DH (nm)	pH	PZ (mV)	DH (nm)
<b>OR</b>	6,5	-26,17 ± 1,2	220,13 ± 5,82	5	-24,24 ± 2,94	240,94 ± 5,76	6,4	-24,16 ± 1,6	265,86 ± 3,71	6,6	-31,5 ± 1,67	115,44 ± 3,06
<b>ISO</b>	7,8	-3,6 ± 2,14	232,60 ± 0,88	7,4	-3,63 ± 1,84	256,62 ± 4,62	7,4	-5,16 ± 2,01	318,24 ± 6,61	7,4	-6,96 ± 1,86	205,56 ± 3,59
<b>M4</b>	7,7	-2,4 ± 0,41	231,31 ± 3,18	7,4	-5,93 ± 2,9	262,41 ± 5,11	7,4	-3,74 ± 1,03	341,69 ± 5,38	7,4	-4,2 ± 1,47	168,53 ± 4,88
<b>DMEM</b>	7,7	-4,8 ± 1,46	224,49 ± 29,26	7,7	-6,14 ± 2,4	257,48 ± 8,42	7,7	-10,82 ± 4,91	274,86 ± 13,9	7,7	-10,49 ± 3,92	183,17 ± 29,49

### 5.1.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

No FTIR de todas as tintas de tatuagem com T1 foram identificados os grupos funcionais dos componentes indicados na embalagem como veículos e pigmentos (Anexo A). Os veículos contidos na tinta de tatuagem são constituídos de hidrocarbonetos hidroxilados e, desta forma seus espectros apresentam bandas vibracionais em torno de 3600 a 3200  $\text{cm}^{-1}$  referentes à banda de OH. As bandas em aproximadamente 2870 e 2940  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao alongamento vibracional das ligações de CH alifático, entre 1630 e 1700  $\text{cm}^{-1}$  bandas características de C=O, entre 1470 a 1360  $\text{cm}^{-1}$  são devidas às vibrações da deformação angular das ligações CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, respectivamente. A região próxima a 1050 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  mostram bandas características das vibrações da deformação angular de CO ou CN (Figuras 5 e 6).

No espectro de FTIR da tinta azul (Figura 5) na região compreendida entre 3400 e 3200  $\text{cm}^{-1}$  foram observadas as bandas da hidroxila, as quais estão sobrepostas pelas bandas de amina e amida. Em 3060  $\text{cm}^{-1}$  aparecem às bandas referentes ao -C=CH da dupla ligação (*sp*) dos anéis aromáticos existentes nos pigmentos. As bandas localizadas entre 1590 e 1180  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas às vibrações da deformação angular da ligação NH<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, NH e NC. Em torno de 900  $\text{cm}^{-1}$  a vibração angular se referente à presença de anéis aromáticos. Entre 790 e 730  $\text{cm}^{-1}$  verifica-se a vibração dos grupos etila e propila. Abaixo de 900  $\text{cm}^{-1}$  observam-se algumas deformações angulares que podem ser referentes às ligações metálicas presentes no material.

No caso das ligações metálicas, em FTIR as bandas metálicas geralmente aparecem abaixo de 900  $\text{cm}^{-1}$ , podendo ocorrer nesta região sobreposição das bandas de vibrações da deformação angular de ligações de CH fora do plano, dificultando a identificação das mesmas. Além disso, algumas tintas possuem baixas concentrações de metal, dificultando a identificação das bandas. O óxido de cobre (CuO) apresenta uma banda em 700  $\text{cm}^{-1}$  caracterizada a ligação Cu-O, já para as vibrações Cu-O-H é verificada em torno de 839  $\text{cm}^{-1}$ . Para o TiO<sub>2</sub> na fase cristalina anatase é comum encontrar bandas em 669  $\text{cm}^{-1}$  e para a fase rutilo em aproximadamente em 920  $\text{cm}^{-1}$ . As ligações de Al-O são encontradas na faixa entre 500-700  $\text{cm}^{-1}$ , sendo para o Al puro uma banda localizada em 912  $\text{cm}^{-1}$ . O Fe exibe bandas em aproximadamente 570  $\text{cm}^{-1}$ . As ligações de óxido de silício (SiO<sub>2</sub>), que não é metal,

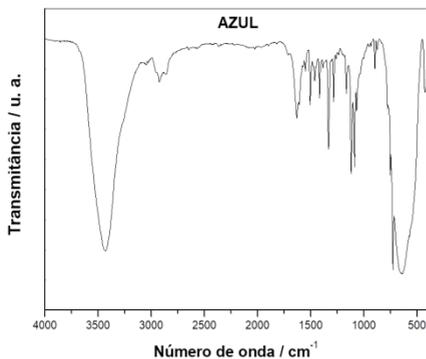
aparecem em  $1100\text{ cm}^{-1}$  para Si-O-Si e em  $900\text{ cm}^{-1}$  para Si-OH (Figura 3).

No espectro de FTIR tinta verde (Figura 5) na região compreendida entre  $3400$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$  foram observadas as bandas à hidroxila e sobrepostas a elas as bandas de amina e amida. Em  $3060\text{ cm}^{-1}$  também aparecem as bandas referentes ao CH de alcenos dos anéis aromáticos. As bandas localizadas entre  $1590$  e  $1180\text{ cm}^{-1}$  foram referentes a vibrações da deformação angular da ligação  $\text{NH}_2$ , NO, NH e NC. A bandas finas localizadas em  $1520$  e  $1505\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas ao composto azo presente no pigmento orgânico. As bandas entre  $900$  e  $710\text{ cm}^{-1}$  também foram observadas e podem ser referentes às vibrações dos anéis aromáticos. Entre  $620$  e  $430\text{ cm}^{-1}$  as bandas vibracionais foram relacionadas às ligações metálicas presentes nesse material.

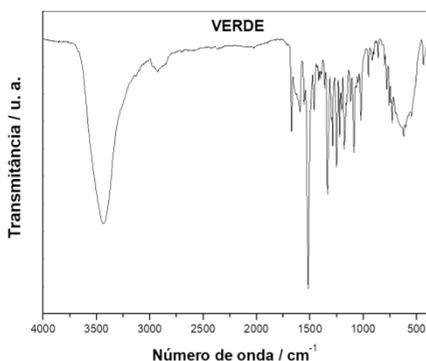
No espectro de FTIR da tinta vermelha (Figura 6) foram identificadas as bandas referentes aos veículos e também dos grupos funcionais dos pigmentos. Na região compreendida entre  $3400$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$  foram observadas as bandas à hidroxila e sobrepostas a elas as bandas de amina e amida. Em  $3060\text{ cm}^{-1}$  aparecem as bandas referentes ao CH de ligação dupla dos anéis aromáticos. Entre  $1675$  e  $1645\text{ cm}^{-1}$  aparece a banda da carbonila,  $\text{C}=\text{C}$ , as bandas localizadas entre  $1590$  e  $1180\text{ cm}^{-1}$  são referentes a vibrações da deformação angular da ligação  $\text{NH}_2$ , NO, NH e NC. As bandas dos compostos azo foram identificadas em aproximadamente  $1520$  e  $1505\text{ cm}^{-1}$ . Em torno de  $800\text{ cm}^{-1}$  também pode-se observar a vibração referente aos anéis aromáticos. As bandas compreendidas entre aproximadamente  $730$  e  $790\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao grupo propila e ligação C-Cl e também na região de  $540$  e  $420\text{ cm}^{-1}$  observam-se algumas deformações angulares que podem ser referentes às ligações metálicas presentes na tinta.

No espectro da tinta preta (Figura 6) foi observado além das bandas em  $2932$  e  $2875\text{ cm}^{-1}$  de CH alifático também foi identificado as bandas intensas características dos grupamentos CO, CN, S=O situados entre  $1040$  a  $1420\text{ cm}^{-1}$ . Dessa forma, esse dado confirma, que observado no EDS, a tinta preta tem em sua composição S. Abaixo de  $900\text{ cm}^{-1}$  são observadas as bandas referentes às deformações angulares características de ligações CH.

Figura 5. Espectros no FTIR e tabelas com as absorções vibracionais dos principais grupos funcionais das tintas de tatuagem azul e verde.

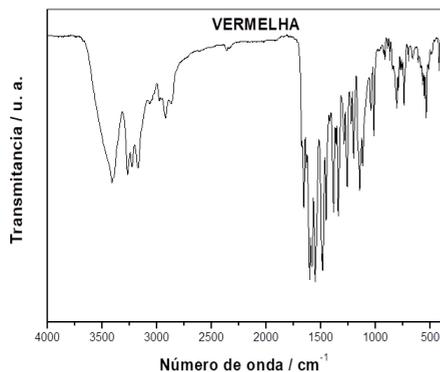


Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
~3438	O-H, N-H amina (sobreposição)
~3023	C-H carbonila
2940 - 2856	C-H alifático
1716	C=O carbonila
1632	C=O e/ou C=C
1549 - 1500	C=C e/ou N-H
1464 - 1421	CH <sub>2</sub>
1382 - 1331	CH <sub>3</sub>
1280 - 1120 - 1080	C-O, C-N
670	Ti-O, Cu-N (sobreposição)
800 - 600	C-Cl (sobreposição)

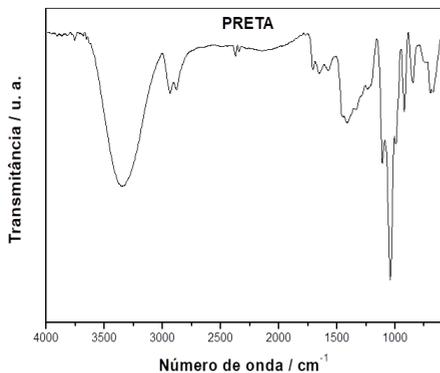


Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
~3412	O-H, N-H amina
3262 - 3225 - 3163	N-H amida
~3058	C-H aromático
2924 - 2862	C-H alifático
1654	C=O carbonila
1600 - 1598	C=C
1582 - 1549	N-H (intensa)
1520 - 1505	N=N (intensa)
1487	CH <sub>2</sub>
1386 - 1331	CH <sub>3</sub>
1259 - 1147 - 1015	C-O, C-N, C-C
~850 a 600	HC=CH e/ou C-Cl
~730 a ~535	Al-O e Ti-O

Figura 6. Espectros no FTIR e tabelas com as absorções vibracionais dos principais grupos funcionais das tintas de tatuagem vermelha e preta.



Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
~3438	O-H , N-H (sobreposição)
~3023	C-H aromático
2940 - 2868	C-H alifático
1671-1638	C=O carbonila
1598	C=C
1553 – 1520	N-H (intensa)
1520 -1505	N=N (intensa)
1460	CH <sub>2</sub>
1340	CH <sub>3</sub>
1250 – 1170 – 1080	C-O, C-N
~625, ~735	Ti-O, Cu-N (sobreposição)
~850 - 600	HC=CH e/ou C-Cl



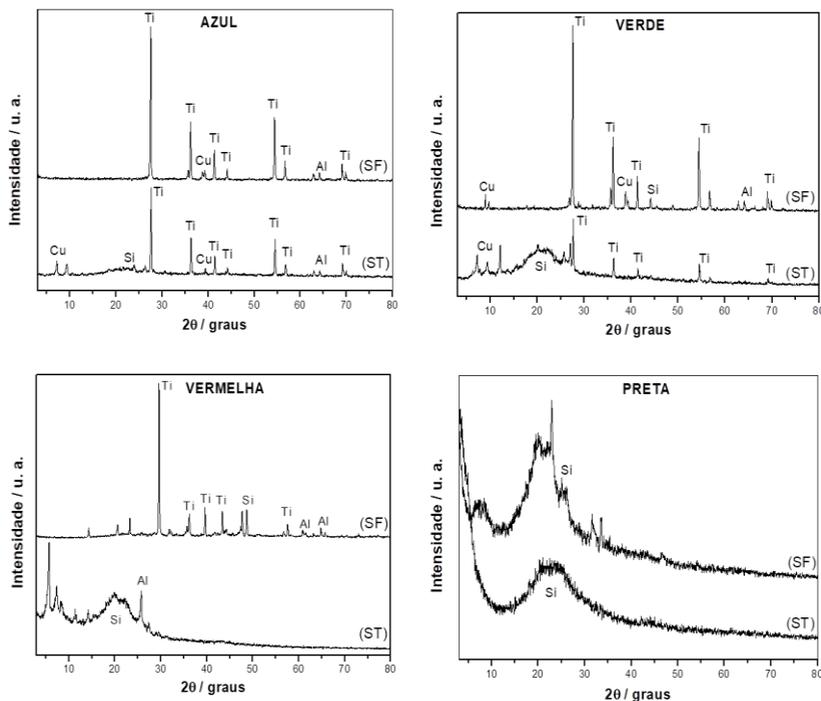
Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
~3355	O-H
2930 - 2881	C-H alifático
1710	C=O carbonila
1644	C=O , C=C, Si-O-H
1568 - 1500	C=C
1454 - 1410	CH <sub>2</sub>
1323	CH <sub>3</sub>
1236 – 1110 - 1040	C-O, Si-O, S=O
926	-HC=CH- e/ouO-H
850	C-H (foram do plano)
~900 e 690	=C-H aromático

#### 5.1.4. Difractometria de raios X (DRX)

Os difratogramas dos ST das tintas (Figura 7) permitiram identificar a presença de fases amorfas e cristalinas. Nos difratogramas dos ST das tintas foi observado um halo amorfo em  $2\theta$  entre  $20^\circ$  e  $30^\circ$  atribuído a presença de hidrocarbonetos, polímeros e pigmentos orgânicos. Importante ressaltar que, estes resultados confirmam o que foi verificado nos resultados de determinação dos sólidos (Tabela 3), onde a tinta preta possui a maior porcentagem de SV, ou seja, carbono. Isso é indicativo de que o difratograma deveria mostrar um halo amorfo característico de carbono, exatamente como o evidenciado no difratograma da tinta preta. A tinta azul mostrou o menor halo amorfo no DRX dos ST e isso também confirma o observado na Tabela 3 dos sólidos. Nesta tabela, a tinta azul apresentou a menor porcentagem de SV e maior porcentagem de SF. No difratograma dos ST da tinta azul foi verificada além da presença do halo amorfo o dos picos cristalinos das NP inorgânicas de Ti e Cu. As tintas vermelha e verde também mostraram que em suas composições estão presentes materiais nas fases amorfas e cristalinas, sendo os cristalinos NP inorgânicas, principalmente, de Ti, Cu e Al.

Nos DRX dos SF (Figura 7) foram observados somente picos cristalinos dos sólidos cristalinos (Ti, Cu e Si) para as tintas azul, verde e vermelha. O difratograma da tinta preta continuou mostrando o halo amorfo do carbono com alguns picos da fase de Si cristalino. Estes resultados indicam que o tratamento térmico realmente removeu a parte orgânica das tintas azul, verde e vermelha, restando apenas os sólidos inorgânicos.

Figura 7 DRX dos sólidos totais (ST) e sólidos fixos (SF) presentes nas tintas tatuagem.

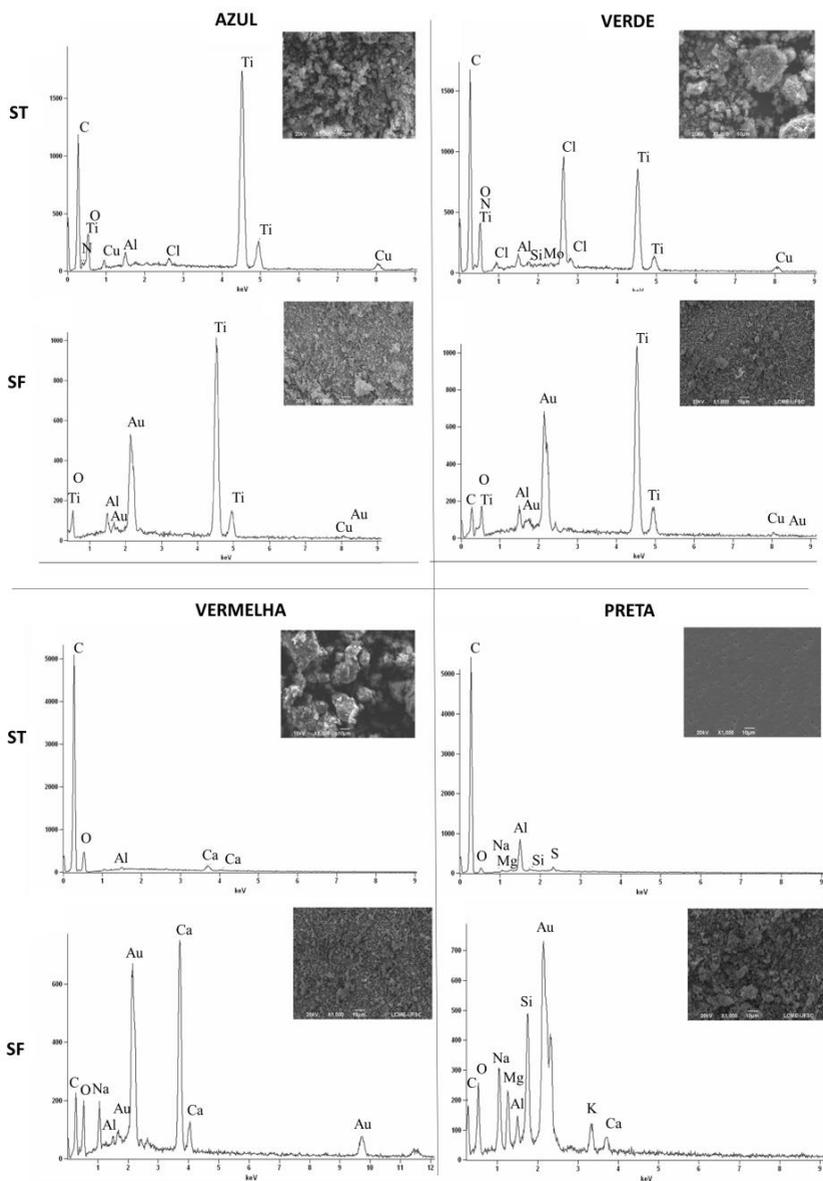


### 5.1.5. Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV- EDS)

A identificação qualitativa dos elementos químicos presentes na composição das tintas foi realizada através de MEV-EDS (Figura 8). Para as tintas de tatuagem os rótulos das embalagens comerciais citam além dos componentes orgânicos, somente a presença de Ti na tinta azul e Ti e Cu na composição da tinta verde. Nas tintas vermelha e preta não consta elementos inorgânicos no rótulo, entretanto, segundo a análise EDS, a tinta azul também contém os elementos inorgânicos Cu, Al e silício (Si) nos ST, que não estão descritos no rótulo. Já a tinta verde também identificou também Al, molibdênio (Mo), Fe e Si nos ST. Na análise de EDS dos SF para a tinta azul foi verificado somente a presença de Ti e Cu. Nos SF da tinta verde restou Al, Ti, Si e Cu.

Apesar das tintas vermelha e preta apresentarem o menor percentual de elementos inorgânicos, a análise de EDS identificou a presença desses elementos em ST e SF. Na tinta vermelha foram identificados Al e cálcio (Ca) nos dois tratamentos, e acrescidos de sódio (Na) e C pela combustão incompleta da amostra. No ST da tinta preta aparecem os elementos Na, magnésio (Mg), Al, Si e enxofre (S) e, em SF com exceção do S, foram encontrados esses mesmos elementos acrescidos de Ca e potássio (K). Uma possível explicação para justificar a presença destes elementos nas tintas está no fato destes componentes serem introduzidos em pequenas quantidades como aditivos para melhorar as propriedades das tintas. Vale ressaltar que na análise de DRX também foram identificados alguns dos elementos encontrados na análise de EDS.

Figura 8. Identificação qualitativa dos elementos químicos presentes na composição das tintas de tatuagem através de MEV-EDS para as cores azul, verde vermelha e preta em ST e SF.



### 5.1.6. Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

Os elementos químicos presentes nas tintas de tatuagem, após um tratamento de digestão ácida, foram identificados qualitativamente e quantitativamente pela técnica de ICP-OES (Tabela 5). Esta identificação confirmou a presença dos elementos identificados pelas técnicas de DRX e EDS. O diferencial dessa técnica é a quantificação dos elementos, que permitiu verificar que todos os elementos avaliados estão presentes nas quatro cores avaliadas, porém em quantidades diferentes. Essa técnica constatou que todos os elementos se encontram em percentual abaixo de 5%, o que pode caracterizá-los como aditivos, quando não declarada a utilização como pigmento (LAUX et al., 2015). É importante destacar que os elementos quantificados através dessa técnica tem por base o encontrado no DRX e MEV-EDS e que os únicos elementos avaliados que estavam descritos nos rótulos das tintas são: Ti na azul e Cu e Ti na verde (Tabela 1).

As tintas azul e verde apresentaram elevadas frações inorgânicas na composição, com destaque para as elevadas massas de Al, Si, Ti e Cu e as tintas vermelha e preta apresentaram quantidades reduzidas dos elementos inorgânicos, confirmando o encontrado no tratamento térmico (Tabela 3). A presença desses elementos metálicos em tintas de tatuagem já foi constatada em outros estudos (JACOBSEN et al., 2012; TIMKO et al., 2001), e entre eles destacaram-se o Si, Al, Ti e Fe (Tabela 5), que adicionados em baixos percentuais podem ser derivados da adição de aditivos para controlar a viscosidade do produto, reduzir a transparência da formulação ou conferir brilho (ANGHINETTI, 2012; JACOBSEN et al., 2012; RAJ et al., 2012).

Destaca-se ainda a quantidade superior de Al em relação a de Ti, que é indicado como pigmento nas embalagens das tintas azul e verde e a mesma quantidade de Cu para as tintas azul e verde, e não é descrito na embalagem da tinta azul. Neste estudo não foi reportado a presença de metais alergênicos como Ni, Cr e Co reportados por Forte e colaboradores (2009) em tintas de tatuagem, porém é importante ressaltar que a técnica de ICP-MS (espectroscopia de massa por plasma acoplado indutivamente) utilizada para este caso é mais sensível que a técnica de ICP-OES, que tomou como base para a quantificação elementos encontrados nas técnicas que qualificaram esse material, listados na Tabela 5. Ainda de acordo com o estudo de Forte e colaboradores (2009) foram encontradas altas concentrações de Al, Fe e Cu, reportados como principais componentes das tintas de tatuagem de diversas cores e marcas estudadas.

Tabela 5. Quantificação dos elementos químicos presentes nas amostras através de ICP-OES. Os resultados são expressos como média e desvio médio.

<b>Elementos químicos</b>	<b>Tinta azul (µg/g)</b>	<b>Tinta verde (µg/g)</b>	<b>Tinta vermelha (µg/g)</b>	<b>Tinta preta (µg/g)</b>
<b>Al</b>	2660,16 ± 53,69	1323,54 ± 4,62	13,07 ± 1,04	13,16 ± 6,75
<b>Ti</b>	564 ± 16,97	230,12 ± 2,63	59,41 ± 2,87	274,11 ± 9,02
<b>Fe</b>	20,97 ± 2,86	17,74 ± 6,44	15,79 ± 1,84	9,29 ± 0,19
<b>Cu</b>	658,03 ± 42,85	724,45 ± 383,09	0,35 ± 0,11	0,71 ± 0,002
<b>Si</b>	638,84 ± 9,39	295,17 ± 0,75	0,041 ± 0,05	0,3 ± 0,05
<b>K</b>	15,7 ± 0,82	26,68 ± 2,16	20,56 ± 3,77	49,49 ± 3,42
<b>Mg</b>	25,57 ± 0,48	39,91 ± 2,05	45,47 ± 0,09	167,09 ± 0,73
<b>Na</b>	539,28 ± 10,9	471,54 ± 9,16	566,97 ± 7,48	241,5 ± 5,07
<b>Ca</b>	143,8 ± 12,72	136,18 ± 73,84	1490,25 ± 8,27	63,58 ± 8,99

## 5.2. Ensaio toxicológicos

### 5.2.1. Toxicologia geral

#### 5.2.1.1. Ensaio de fitotoxicidade em *L. sativa*

Conforme descrito na Regra de análise de sementes (RAS), plântulas anormais são aquelas que não mostram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais, mesmo crescendo em condições favoráveis. Taxas de germinação superiores a 90% caracterizaram a integridade das sementes descartando a possibilidade das mesmas serem consideradas duras moles ou dormentes nesse estudo (Tabela 6).

Na tabela 6 é possível observar que com exceção da tinta azul, que não apresentou diferença nas taxas de germinação nas concentrações testadas, as tintas verde, vermelha e preta apresentaram diferença significativa nesse parâmetro quando expostas a maior concentração (100 mL L<sup>-1</sup>).

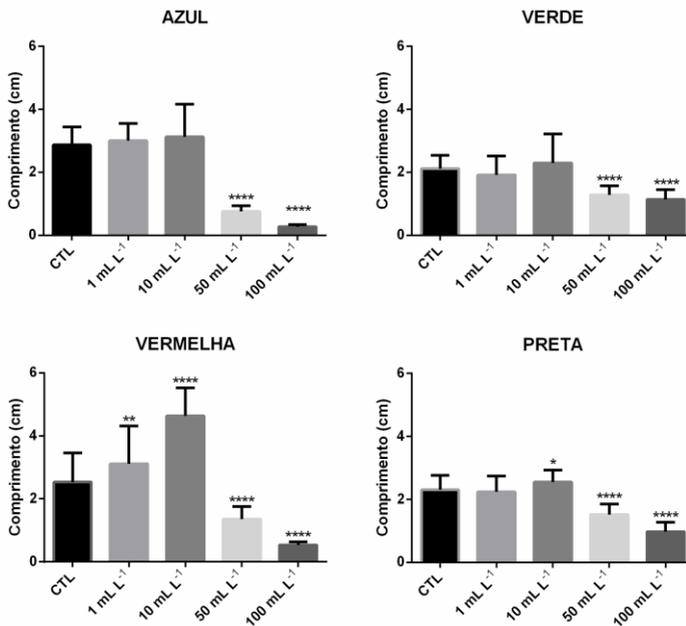
Tabela 6. Germinação (%) de *L. sativa* expostas às tintas de tatuagem analisadas através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis (n = 40). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são representadas por \*\*\* p <0.001.

Concentração (ml L <sup>-1</sup> )	Germinação (%)			
	Azul	Verde	Vermelha	Preta
Controle	90	100	100	97,5
1	90	100	100	92,5
10	77,5	97,5	97,5	95
50	80	95	95	95
100	77,5	67,5 ***	65 ***	72,5 ***

O comprimento total das plântulas (Figura 9) foi afetada independentemente da cor avaliada nas maiores concentrações (50 - 100 mL L<sup>-1</sup>), talvez pelo fato da forte coloração promovida pelos pigmentos afetar a quantidade de luz incidente nos fotossistemas ou à presença de NP de TiO<sub>2</sub>, que afeta a transferência de elétrons e a absorção de água e luz, consequentemente impactando o processo fotossintético (ZUVERZA-MENA et al., 2017). Quando expostos às concentrações mais baixas das tintas preta e vermelha, as radículas apresentam indução de crescimento em relação ao controle, o que de fato pode acontecer

visto que as soluções de tinta apresentam elementos que atuam como nutrientes para plantas. Isso pode estar sendo inibido nas tintas azul e verde pela alta concentração de Al e Cu, considerados inibidores do crescimento radicular (HONG et al., 2015; SUN et al., 2010).

Figura 9. Comprimento total das plântulas de *L. sativa* após exposição as tintas de tatuagem. Os resultados estão expressos como média e erro padrão médio (n=30-40). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey. Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

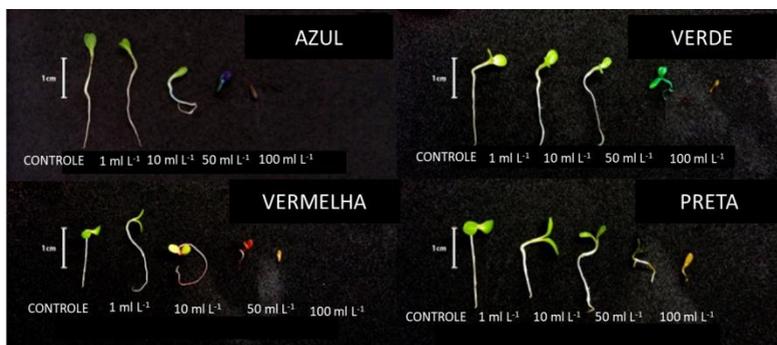


Dessa forma, os constituintes podem estar interferindo na osmorregulação e nos fotossistemas, acarretando em anormalidades físicas nas plântulas expostas a tintas de tatuagem conforme o aumento da concentração (Figura 10). A partir da concentração de 10 mL L<sup>-1</sup> foram observadas algumas deformações, de modo que a radícula forma estruturas curvadas e resultando em plântulas retorcidas como em uma espiral. Já nas duas maiores concentrações (50 e 100 mL L<sup>-1</sup>) as tintas de tatuagem tornaram as plântulas mais finas, fracas, de cor hialina, caracterizando o atrofiamento das radículas. Na maior

concentração as plântulas rompem o tegumento, mas não conseguem se desenvolver, impossibilitando inclusive o reconhecimento morfológico das estruturas. Estas alterações na plântula *L. sativa* expostas às tintas de tatuagem são descritas na RAS como deformidades abrangendo o desenvolvimento fraco das plântulas, distúrbios fisiológicos e estruturas essenciais deformadas, ou desproporcionais (BRASIL, 2009).

O grau de germinação de certas espécies sensíveis e seu desenvolvimento inicial na presença de contaminantes potencialmente tóxicos são parâmetros comumente utilizados como indicadores de toxicidade de contaminantes. Os efeitos de inibição observados em *L. sativa* ocorrem apenas nas duas maiores concentrações (10 e 100 mL L<sup>-1</sup>), as quais produzem uma forte pigmentação e, não são encontradas no meio ambiente. Entretanto, se o descarte das tintas de tatuagem for realizado incorretamente, levando a uma forte contaminação da água utilizada pelas plantas, o processo germinativo será ameaçado.

Figura 10. Foto das plântulas de *L. sativa* após 7 dias de exposição as tintas de tatuagem.



### 5.2.1.2. Ensaios toxicológicos com *D. magna*

A toxicidade aguda das tintas de tatuagem para *D. magna* pode ser observada na Tabela 7. A exposição à tinta de tatuagem vermelha mostrou maior toxicidade entre as quatro cores estudadas seguida pela azul e verde. A tinta preta não apresentou toxicidade aguda para esse organismo nas concentrações testadas. A tinta vermelha destacou-se como a mais tóxica por apresentar aproximadamente quatro vezes mais toxicidade do que a tinta azul e sete vezes mais do que a tinta verde. A tinta azul apresentou aproximadamente 1,8 vezes mais tóxica do que a tinta verde.

Tabela 7. Toxicidade aguda das tintas de tatuagem para o microcrustáceo *D. magna* avaliada através do método estatístico de regressão linear (n =3).

Tinta	CE <sub>50,48h</sub> (mL L <sup>-1</sup> )
Azul	0,5605
Verde	1,075
Vermelha	0,1402
Preta	Não calculável

Após a definição da CE<sub>50,48h</sub> para cada uma das tintas, foi realizado o teste crônico (Tabela 8), partindo a princípio de uma concentração de 1/3 da CE<sub>50,48 h</sub> exceto para a verde, onde as concentrações tiveram que ser reduzidas. No tratamento com a tinta azul não foi observado efeito na reprodução e tamanho, porém quando observada a longevidade na maior concentração (187 µL L<sup>-1</sup>), apenas 30% dos organismos permaneceram vivos após os 21 dias. A tinta verde apresentou maior efeito crônico proporcional ao valor da CE<sub>50,48 h</sub> comparado com as outras cores testadas, pois apresentou redução na longevidade até mesmo na menor concentração testada (13,3 µL L<sup>-1</sup>) onde apenas 50% dos organismos permaneceram vivos. Os efeitos na reprodução puderam ser observados na concentração de 53,5 µL L<sup>-1</sup>, na qual não houveram filhotes durante todo o teste. Devido à alta mortalidade nessa cor o tamanho após 21 dias não pode ser avaliado em todas as concentrações.

A tinta vermelha, em relação à concentração com efeito foi a segunda tinta com maior toxicidade para esse organismo, apresentando efeito na longevidade na concentração de 14 µL L<sup>-1</sup>, próxima a resposta desse mesmo parâmetro na tinta verde. Na reprodução, a tinta vermelha apresentou efeito significativo em três das concentrações testadas (3,5

$\mu\text{L L}^{-1}$ ,  $14 \mu\text{L L}^{-1}$ ,  $46 \mu\text{L L}^{-1}$ ), chegando a aproximadamente quatro vezes menos filhotes do que o controle na maior concentração ( $46 \mu\text{L L}^{-1}$ ). Vale ressaltar ainda, que essa concentração na tinta vermelha foi a única a apresentar efeito significativo no tamanho das *D. magna* sobreviventes após 21 dias (Tabela 8).

As tintas verde e vermelha foram testadas em níveis relativamente baixos no teste crônico (Tabela 8), sem coloração aparente no meio M4 e promoveu toxicidade não relacionada aos níveis dos elementos químicos avaliados através da técnica de ICP-OES (Tabela 5), se assemelhando apenas a fração orgânica de pigmentos, onde são encontrados compostos azo. Nos ecossistemas aquáticos esses compostos são de difícil degradação em condições aeróbias (P. RAJAGURU, K. KALAISELVI, K. PALANVELI, 2000) e tem tendência a produzir respostas mais tardias que podem ser caracterizadas em estudos crônicos (PARROTT; BARTLETT; BALAKRISHNAN, 2016).

Tabela 8. Toxicidade crônica das tintas de tatuagem para o microcrustáceo *D. magna* avaliada através do método estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis.

Tinta	Concentração ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	Longevidade: sobreviventes (%)	Reprodução: total de filhotes por fêmea	Tamanho (cm)
Azul	Controle	100	$12,67 \pm 2,92$	$0,63 \pm 0,021$
	7	80	$12,88 \pm 6,08$	$0,61 \pm 0,026$
	14	60	$10,5 \pm 3,94$	$0,64 \pm 0,023$
	28	50	$14,86 \pm 7,13$	$0,64 \pm 0,013$
	56	60	$8,5 \pm 5,89$	$0,6 \pm 0,028$
	187	30 **	$6 \pm 4,83$	$0,59 \pm 0,013$
<b>CEO</b>		$187 \mu\text{L L}^{-1}$	ns	ns
<b>CENO</b>		$56 \mu\text{L L}^{-1}$	ns	ns
Verde	Controle	90	$10,38 \pm 3,99$	$0,55 \pm 0,056$
	13,3	50 *	$9,6 \pm 3,85$	$0,61 \pm 0,039$
	26,7	10 ***	$3,33 \pm 4,93$	$0,46 \pm 0,081$
	53,5	0 ****	0 *	0,58
	107	0 ****	-	-
	358	0 ****	-	-
<b>CEO</b>		$13,3 \mu\text{L L}^{-1}$	$53,5 \mu\text{L L}^{-1}$	ns
<b>CENO</b>		$< 13,3 \mu\text{L L}^{-1}$	$26,7 \mu\text{L L}^{-1}$	ns
Vermelha	Controle	100	$13,89 \pm 3,44$	$0,6 \pm 0,035$
	1,75	90	$11,33 \pm 4,33$	$0,6 \pm 0,069$
	3,5	80	$7,14 \pm 2,67 *$	$0,59 \pm 0,061$
	7	90	$9,43 \pm 2,89$	$0,56 \pm 0,059$
	14	50 *	$6,29 \pm 2,81 **$	$0,57 \pm 0,038$
	46	80	$3,5 \pm 2,65 ***$	$0,48 \pm 0,064 **$
<b>CEO</b>		$14 \mu\text{L L}^{-1}$	$3,5 \mu\text{L L}^{-1}$	$46 \mu\text{L L}^{-1}$
<b>CENO</b>		$46 \mu\text{L L}^{-1}$	$7 \mu\text{L L}^{-1}$	$14 \mu\text{L L}^{-1}$
Preta	Controle	100	$8,7 \pm 4,08$	$0,54 \pm 0,045$
	1,66	90	$8,78 \pm 2,22$	$0,56 \pm 0,028$
	3,32	90	$7,89 \pm 2,76$	$0,56 \pm 0,03$
	6,65	90	$6,44 \pm 3,05$	$0,57 \pm 0,028$
	13,3	80	$5,75 \pm 2,91$	$0,58 \pm 0,036$
	26,7	80	$4,62 \pm 2,77$	$0,58 \pm 0,036$
<b>CEO</b>		ns	ns	ns
<b>CENO</b>		ns	ns	ns

As imagens das *D. magna* sobreviventes após os vinte um dias de exposição as tintas de tatuagem podem ser observadas na Figura 11. Nas imagens é possível observar as partículas de tinta no tubo digestivo e adsorvidas no exoesqueleto das *D. magna*. A alta presença de partículas adsorvidas na carapaça pode limitar as atividades físicas como natação e filtração. Na tentativa de eliminar os materiais aderidos ao seu exoesqueleto, as *D. magna* podem aumentar seu comportamento de

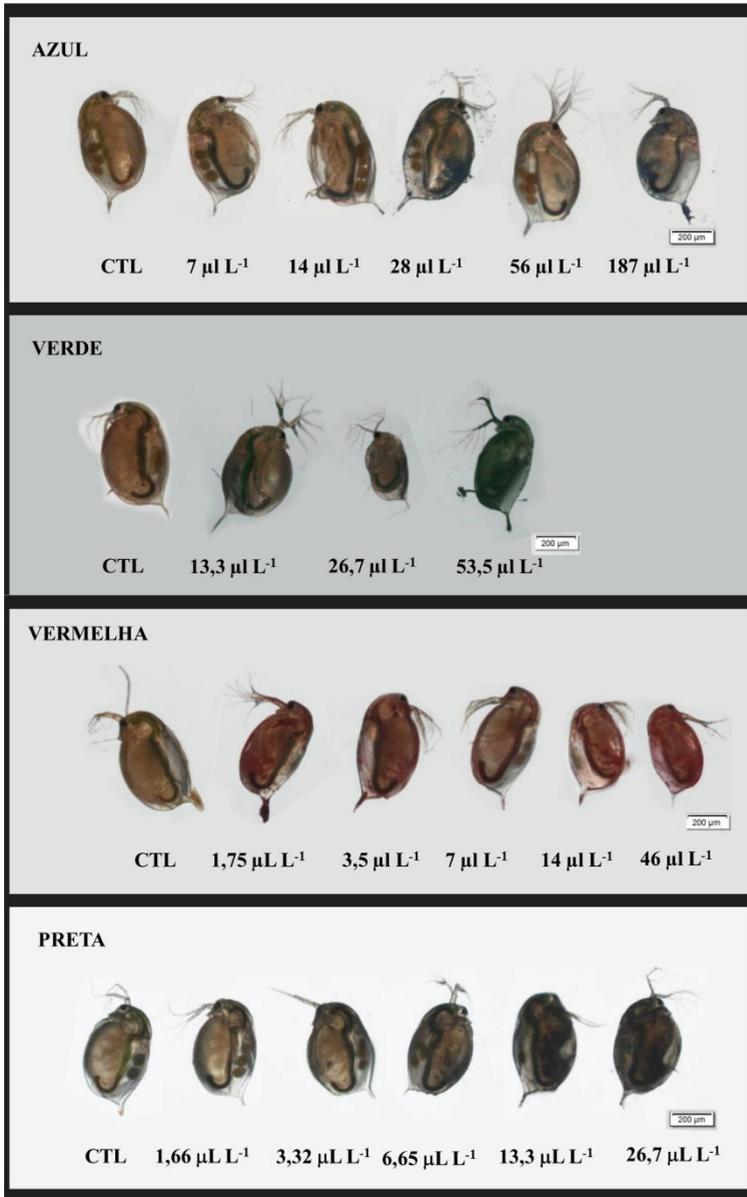
muda, o que tem alto custo energético e como consequência acarretar em inibição do crescimento e reprodução (BOZICH et al., 2014; FAN et al., 2016).

Além disso, a ingestão das partículas de tinta via filtração também pode levar a toxicidade e baixas energéticas. Com o objetivo de obter alimento, as *D. magna* ingerem elementos químicos e NP contidos no meio e a metabolização desses materiais podem gerar compostos potencialmente tóxicos como a liberação de íons metálicos, aminas e consequentemente produção excessiva de EROs, capaz de causar mortalidade (FAN et al., 2016; NASSER et al., 2016)

Em geral, em um contexto ambiental pouco se sabe a respeito do carreamento e lixiviação de pigmentos de tintas de tatuagem para o meio ambiente, porém a utilização de pigmentos e compostos sintéticos em tintas para diversos usos levanta a problemática dos poluentes emergentes, definidos como qualquer substância química que não foi incluída em programas de monitoramento, nem em legislação pertinente a qualidade ambiental, mas estão constantemente sendo introduzidas no ambiente devido às atividades antrópicas (HORVAT et al., 2012). Os efluentes mais conhecidos que possuem alta concentração de pigmentos são os efluentes têxteis para o qual existem algumas técnicas eficientes na remoção de corantes do meio aquoso são: métodos químicos de tratamento como a ozonização, fotodegradação (FARAH et al., 2007), métodos físicos por fluxo subcrítico (HOSSEINI et al., 2010) e métodos biológicos de adsorção (MENDES et al., 2015), e biodegradação (PRIYA et al., 2015), comumente utilizados nas indústrias têxteis.

Dessa forma ressalta-se a importância de contextualizar e relacionar os segmentos que utilizam pigmentos e cromóforos para que no caso de um desastre ambiental, em que tintas de tatuagem ou utilizadas em usos diversos contaminem as águas, existam procedimentos que possam ser aplicados. Os testes *in vivo* com *D. magna* e *L. sativa*, confirmam que as tintas de tatuagem podem acarretar em efeitos tóxicos para esses organismos, o que se refere principalmente à necessidade de regular o tratamento e disposição das tintas de tatuagem, uma vez que contém em sua composição uma mistura de materiais contendo NP e pigmentos azo.

Figura 11. Imagens de estereomicroscopia de indivíduos sobreviventes de *D. magna* após os 21 dias de teste crônico com as tintas de tatuagem.

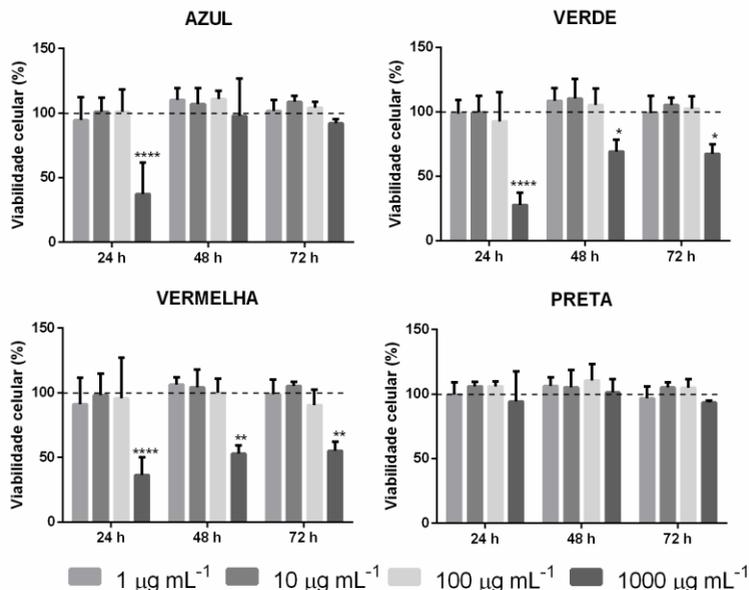


### 5.2.2. Toxicologia específica em células HaCat

Com o objetivo de definir o grau de toxicidade, bem como as concentrações e tempos de exposição a serem utilizados, foram realizados inicialmente ensaios de viabilidade celular em células epidérmicas imortalizadas da linhagem HaCat à nível mitocondrial (redução do MTT) e lisossomal (teste de retenção do (NRU em inglês “*neutral red uptake*”).

Após a exposição a tintas de tatuagem, observou-se uma redução significativa da capacidade de retenção do corante pelo lisossomo, para as tintas azul, verde e vermelha expostas a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  em 24 h (Figura 12), que com exceção da tinta azul, persiste em 48 e 72 h nas tintas vermelha e verde. Não houve diferenças significativas na exposição à tinta preta. É importante destacar que os danos lisossomais ocorrem apenas nas maiores concentrações, principalmente nas tintas vermelha e verde, que apresentam pigmentos azo na sua composição.

Figura 12 Viabilidade celular através do teste NRU, representando integridade da membrana lisossomal de células HaCat expostas às tintas de tatuagem por 24, 48 e 72 h. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle, representado pela linha pontilhada (100%) como média e erro padrão médio (n = 4). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey. Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,001$ .

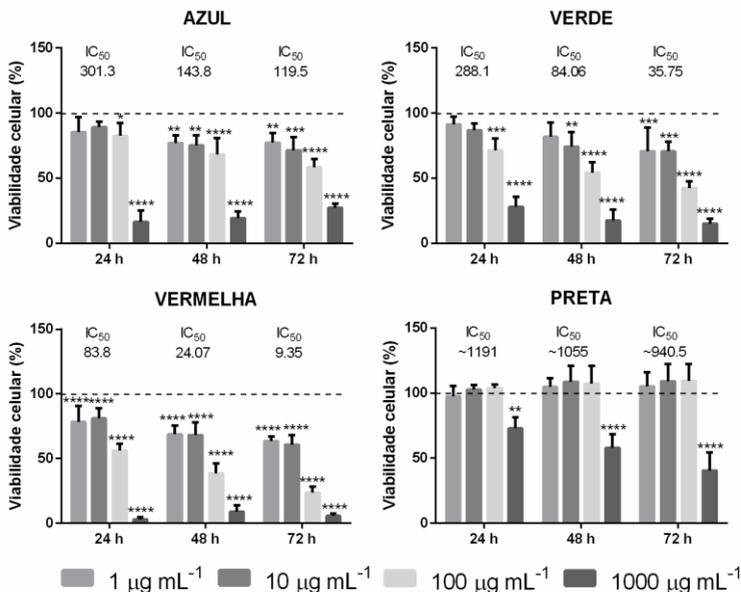


Em oposição ao baixo dano lisossomal, a viabilidade mitocondrial (Figura 13) foi fortemente afetada pelas tintas de tatuagem, com exceção das células expostas a tinta preta. A tinta vermelha apresentou a maior toxicidade, pois afetou a atividade mitocondrial em todas as concentrações (1-1000 µg mL<sup>-1</sup>) e tempos (24-72 h). As tintas azul e verde obtiveram inibições similares, onde nas duas menores concentrações (1 e 10 µg mL<sup>-1</sup>) no tempo de 24 h não ocorreu diminuição significativa na atividade mitocondrial. Entretanto em 48 h a tinta azul se diferiu da verde por apresentar uma redução significativa na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup>. No maior tempo de exposição 72 h todas as concentrações foram tóxicas para ambas as tintas. Para a tinta preta, nos três tempos avaliados, a perda de viabilidade celular foi constatada apenas na maior concentração (1000 µg mL<sup>-1</sup>).

As mitocôndrias fornecem energia celular, geram e regulam a formação de EROs, atuam no tamponamento de cálcio citosólico e regulam a apoptose através do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (WALLACE; FAN; PROCACCIO, 2010) e em geral produzem uma resposta precoce em relação aos lisossomos. A tinta vermelha, que apresentou maior toxicidade, possui além da presença de Ti, os mais altos níveis de Ca entre as outras tintas que podem exercer efeito sobre este sistema, desestabilizando a membrana mitocondrial e iniciando a apoptose. A perda da viabilidade celular pode estar relacionada com a presença de NP de  $TiO_2$ , o que já foi demonstrado em células HaCat (LOPES et al., 2016). Outros estudos ainda confirmam a maior maior perda de viabilidade, através do ensaio de MTT, em células de pulmão para as NP de Cu, Al, Ti respectivamente (SCHRAND et al., 2010). É importante ressaltar que é provável que as NP metálicas encontradas nesse trabalho podem ser referentes aos metais encontrados nas fases cristalinas do DRX (Figura 7), porém a fase e estado de oxidação desses materiais não foram comprovadas, o que impossibilita inferir quais das NP encontradas foram as causadoras destes distúrbios e dificulta a comparação com outros trabalhos, visto que as tintas de tatuagem são formadas por misturas de NP com outros materiais.

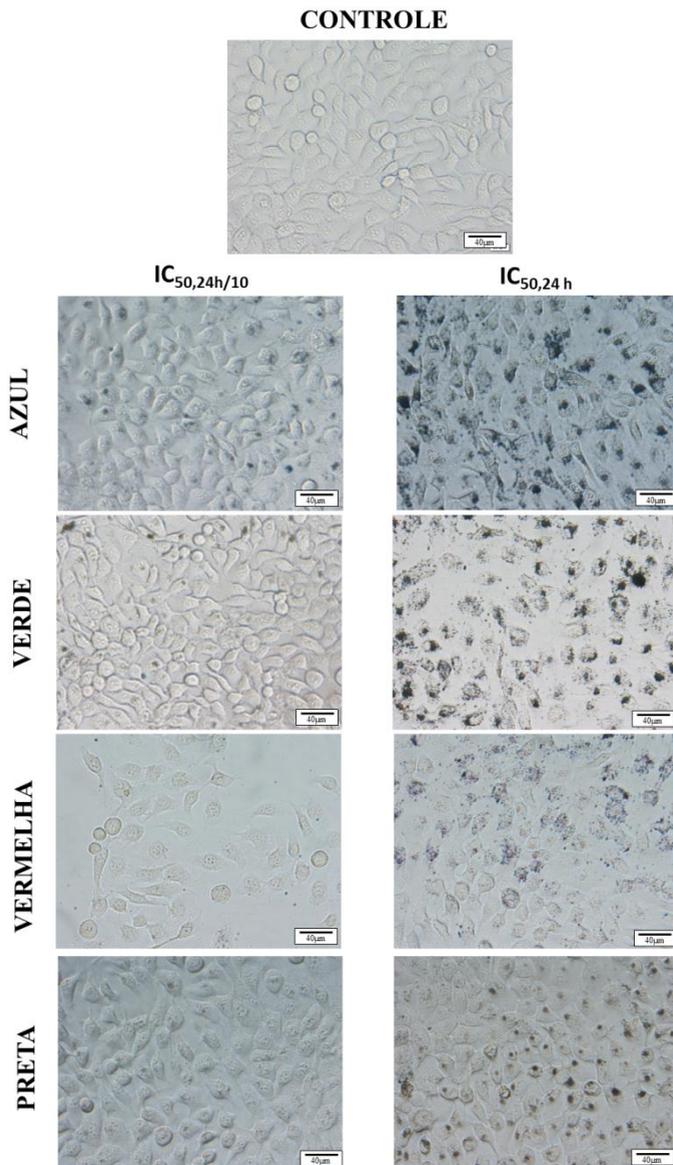
Após a exposição às tintas de tatuagem durante 24 h, as células foram visualizadas por microscopia (Figura 14). As partículas de tinta aparecem ligadas à membrana ou dentro das células em diferentes níveis, dependendo da concentração do material. A morfologia e integridade das células foram afetadas nas concentrações de  $IC_{50,24h}$ . As imagens confirmaram que, apesar dos danos mitocondriais as células permanecem vivas e fixadas nas placas, permitindo a realização dos demais testes em segurança.

Figura 13 Viabilidade celular através do ensaio de MTT, indicando atividade mitocondrial de células HaCat expostas às tintas de tatuagem por 24, 48 e 72 h. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle, representado pela linha pontilhada (100%) como média e erro padrão médio (n = 4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey. Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Os valores de  $IC_{50}$  foram analisados através de regressão não linear e os valores apresentados em  $\mu\text{g mL}^{-1}$



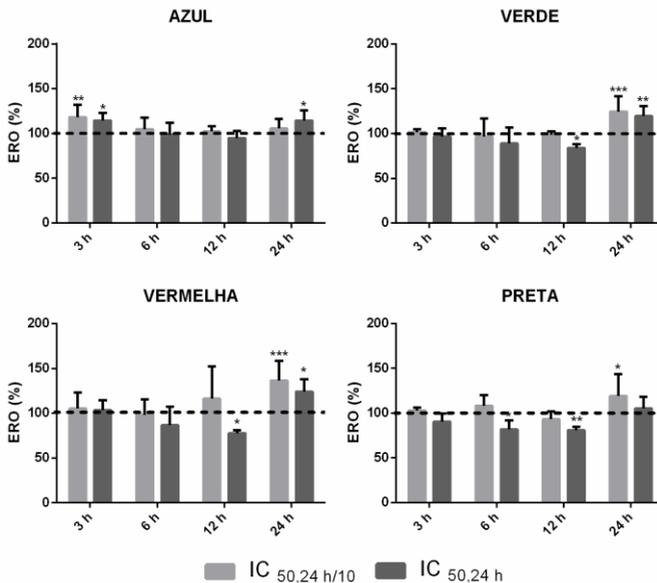
Na presença de soro utilizado no meio de cultura das células, assim como no meio biológico de um tecido num sistema biológico, a carga superficial do NP é coberta rapidamente por uma coroa de múltiplas proteínas que representam a "verdadeira identidade" das células (NGUYEN; LEE, 2017). Entende-se que as partículas têm afinidade para as células através das imagens demonstradas neste estudo (Figura 12) e que a incorporação delas pode estar ocorrendo. Se os componentes das tintas de tatuagem forem internalizados e metabolizados pelas células, alguns elementos como metais ou produtos de redução azo podem vir a estar disponíveis no citosol, determinando a diferente toxicidade entre diferentes cores de tinta relacionadas à constituição.

Figura 14. Imagens de microscopia de luz das células HaCat expostas por 24 h às tintas de tatuagem.



A indução de EROs (Figura 15) ocorreu principalmente em 24 h de exposição a tintas de tatuagem. A tinta azul foi a única que mostrou indução primeiro tempo testado (3 h), seguido por uma recuperação (6 e 12 h) e uma segunda indução em 24 h. As tintas azul, verde e preta apresentaram redução nos níveis de EROs nas respectivas concentrações de  $IC_{50,24h}$  após 12 h de exposição, seguido pelo aumento nas duas concentrações testadas em 24 h na verde e vermelha. A tinta preta induziu a produção de EROs apenas em 24 h na concentração  $IC_{50,24 h/10}$ .

Figura 15. Indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) através do método de DCFH-DA em células Hacat expostas a tinta de tatuagem por 3, 6, 12 e 24 h. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle, representado pela linha pontilhada (100%), como média e desvio padrão médio (n= 6). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey. Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .



A cinética de indução de EROs (Figura 15) sugere que a indução em 24 h, pode estar relacionada à presença de pigmentos azo (RAWAT; MISHRA; SHARMA, 2016), NP amorfas de Si (NABESHI et al., 2011) e óxidos de Ti, Al e Cu conforme demonstrado em outros estudos (KROLL et al., 2011). Podem ocorrer cinéticas diferentes devido às composições distintas de cada cor avaliada, correspondentes a misturas entre pigmentos inorgânicos e orgânicos com os veículos, gerando características importantes como, por exemplo, carga superficial das partículas, que podem influenciar nas características físico-químicas e consequentemente na avaliação toxicológica.

Com a atividade relacionada às características dos materiais, as defesas antioxidantes podem estar neutralizando a superprodução de EROs nos tempos precoces de contaminação (Figura 15), na tentativa de evitar o “burst” oxidativo e consequentemente a apoptose (EISENBRAND et al., 2002), porém quando o mecanismo antioxidante das células não é suficiente para neutralizar a superprodução de EROs, pode acarretar danos oxidativos a biomoléculas, tais como, peroxidação de lípidos, proteínas e DNA, e muitas vezes uma perturbação geral do equilíbrio redox celular (XIA et al., 2014).

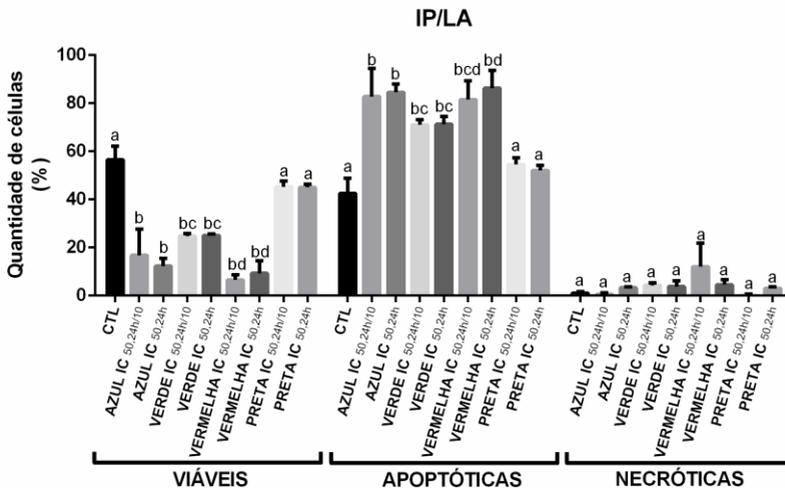
Através da coloração IP/LA (Figura 16) foi observado que o tratamento com tintas de tatuagem diminuiu significativamente a quantidade de células viáveis nas tintas azul, verde e vermelha quando comparadas ao grupo controle em ambas as concentrações testadas, aumentando consequentemente a quantidade de células apoptóticas, mas não de necróticas, isso tem relação com o tipo de exposição, isso indica que células não romperam acidentalmente (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 1998) durante a exposição por algum fator externo, tal como acontece quando utilizada a agulha para inserção dos pigmentos como no procedimento de tatuagem em pele humana.

A tinta preta não apresentou diferenças consideráveis em relação ao controle. A disfunção mitocondrial pode ocasionar a ativação de proteases apoptóticas específicas (caspases) por proteínas mitocondriais que escapam para o citosol (citocromo c, fator indutor de apoptose) com ativação da endonuclease secundária (apoptose). A taxa relativa destes dois processos (catástrofe bioenergética versus protease e ativação da endonuclease) determina se uma célula será submetida a necrose primária ou apoptose (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 1998). Além da disfunção mitocondrial citada anteriormente, as NP metálicas de Al, Si e Ti também podem induzir a apoptose

(SCHRAND et al., 2010). As imagens das células coradas com IP/LA podem ser observadas na Figura 17.

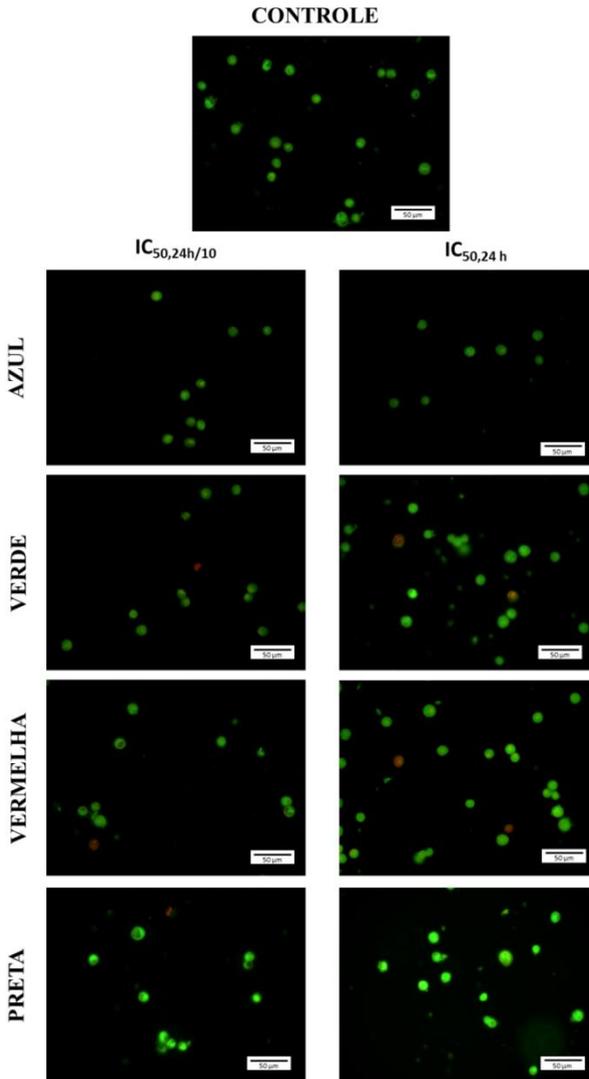
A superprodução de EROs nas tintas vermelha e verde no tempo 24h (Figura 13) em ambas as concentrações testadas (Tabela 2), pode estar iniciando apoptose e a inflamação, devido essas moléculas influenciarem o estado de fosforilação de tirosina, envolvida na regulação de apoptose (GHIAZZA et al., 2014). É importante notar que a tinta vermelha apresenta uma maior indução de apoptose estatisticamente, porém é importante levar em consideração as reduzidas concentrações utilizadas nos testes, o que remete a maior toxicidade desta tinta.

Figura 16. Apoptose e necrose avaliadas através do ensaio IP/LA em células HaCat expostas durante 24 h às tintas de tatuagem. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA de duas vias seguido do teste post hoc de Newman-Keuls ( $n = 3$ ). As diferenças estatísticas são representadas por letras diferentes para cada grupo em que as células foram enquadradas.



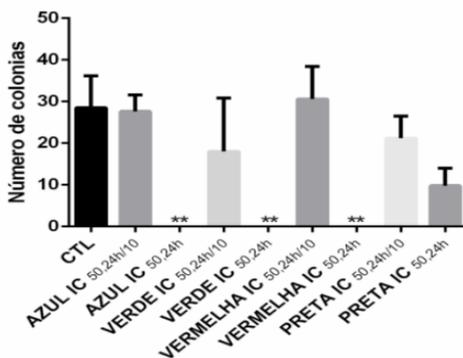
A maior toxicidade da tinta vermelha se relaciona a outros estudos, nos quais a exposição de células HaCat à pigmento azoico vermelho, mostrou a indução de EROs, apoptose e também genotoxicidade (ZANONI et al., 2014) bem como diminuição na atividade proliferativa nessas mesmas células (JHA; JOBBY; DESAI, 2016). É importante verificar que existem inúmeros pigmentos azoicos no mercado, e que apesar dos efeitos serem dependentes das características físico-químicas dessas moléculas, os pigmentos azoicos são amplamente conhecidos por causar toxicidade (GAUDRON et al., 2015).

Figura 17. Imagens de microscopia de fluorescência das células HaCat expostas durante 24 h às tintas de tatuagem marcadas pela coloração IP/LA.



Além disso, células expostas as tintas azul, verde e vermelha as suas respectivas concentrações de  $IC_{50,24h}$  (Tabela 2) durante 7 dias não formam colônias (Figura 18), todavia as células tratadas nas concentrações de  $IC_{50,24h/10}$  (Tabela 2) mantiveram essa capacidade. Apenas a tinta preta retém essa capacidade em ambas as concentrações testadas, confirmando a ausência de toxicidade crônica para esta tinta. Um estudo que avaliou a toxicidade de diferentes NP de óxido metálico em células de pulmão mostrou que a exposição a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NP de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e  $\text{TiO}_2$  demonstraram menores efeitos adversos na viabilidade e proliferação do que nas células expostas a ZnO. Todavia as células expostas a  $\text{TiO}_2$  tiveram indução de EROs de maneira tempo dependente e, as NP de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  foi considerada a mais segura toxicologicamente para estas células (KIM; BAEK; CHOI, 2010). Isso se relaciona ao encontrado as tintas de tatuagem, porém pouco se sabe a respeito da mistura entre NP metálicas e pigmentos azo.

Figura 18. Ensaio clonogênico em células HaCat expostas a tinta de tatuagem por 7 dias. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Dunnet. Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são representadas como  $**p < 0,01$ .



O foco deste estudo foi relacionar a composição inorgânica das tintas com a toxicidade, no entanto, a toxicidade mais alta das tintas verde e vermelha para células *D. magna* e células HaCat, pode estar relacionada com a presença de pigmentos orgânicos azo e não com a composição metálica. Os pigmentos azoicos são relatados na literatura como agentes cancerígenos a longo prazo, e sua toxicidade é principalmente relacionada à redução do grupamento azo, liberando aminas aromáticas (RAWAT; MISHRA; SHARMA, 2016). A tinta preta é a tinta mais utilizada e estudada (HØGSBERG et al., 2013;

KLUGER; KOLJONEN, 2012; NEALE et al., 2015; REGENSBURGER et al., 2010), porém esse estudo demonstra que potencialmente essa cor é mais segura do que a azul, verde e vermelha. Apesar da complexidade da composição das tintas de tatuagem, este estudo fornece dados que precisam de investigações mais aprofundadas, em que devem ser avaliados os efeitos dos componentes isolados e também da interação dos componentes na mistura, para chegar à conclusões sobre a incorporação e metabolização de diferentes cores das tintas de tatuagem *in vitro* e a toxicidade ambiental deste material *in vivo*.

## 6. CONCLUSÕES

Nas tintas de tatuagem foram identificados os componentes orgânicos e inorgânicos, partículas com diâmetros nanométricos e elementos químicos não descritos nas embalagens dos produtos em baixos percentuais, com exceção do Al, que se encontra em concentrações superiores as de Ti nas tintas azul e verde, e o Cu na tinta azul, em concentração semelhante à da tinta verde, apesar de ambos não estarem descritos no rótulo como pigmentos.

Os efeitos tóxicos das tintas de tatuagem incluíram inibição de germinação e crescimento, bem como deformações morfológicas na planta *L. sativa* para todas as cores estudadas. No microcrustáceo *D. magna* as tintas de tatuagem, com exceção da preta, causaram toxicidade aguda, na qual a tinta vermelha apresentou-se mais tóxica e as tintas azul e verde se assemelharam, porém quando avaliada a toxicidade crônica a tinta verde se assemelhou a vermelha, indicando maior toxicidade para estas cores a longo prazo. Em células HaCat as tintas de tatuagem causaram danos mitocondriais, induziram a produção de EROs e apoptose, bem como inibiram a formação de colônias (com exceção da tinta preta).

Em geral, a tinta azul apresentou a maior fração de NP inorgânicas, porém sua toxicidade é menor que às das tintas verde e vermelha, atribuindo a maior toxicidade a presença de pigmentos azo. A tinta preta apresentou a menor toxicidade nos parâmetros testados, sendo considerada a mais segura toxicologicamente. Os resultados desse trabalho evidenciam a necessidade de novos estudos para relacionar e elucidar a composição, metabolismo e toxicidade das tintas de tatuagem.

## 7. RECOMENDAÇÕES

- Avaliar outras marcas de tintas de tatuagem para verificar se a composição e toxicidade é padrão: 3 marcas tem registro na ANVISA no Brasil;
- Caracterizar os pigmentos orgânicos;
- Estudar o mecanismo de toxicidade dos pigmentos isolados e das misturas;
- Verificar a relação do sistema antioxidante com a produção de EROs;
- Testar a toxicidade em outras linhagens celulares.

## REFERÊNCIAS

- ABNT, NBR. **12.713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea)**. 2016.
- ABNT, NBR ISO. **14971: Produtos para a saúde — Aplicação de gerenciamento de risco a produtos para a saúde**. 2009
- ABNT, NBR ISO. **10993-1: Avaliação biológica de produtos para a saúde. Parte 1: Avaliação e ensaio dentro de um processo de gerenciamento de risco**. 2013
- ANGUINETTI; IZABEL CRISTINA BARBOSA ANGHINETTI. **Tintas, suas propriedades e aplicações imobiliárias**. p. 1–65, 2012.
- ANVISA. **Resolução RDC 185: Regulamento técnico que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos**. 2001
- ANVISA. **Resolução RDC 55: Dispõe sobre o registro de produtos utilizados no procedimento de pigmentação artificial permanente da pele, e dá outras providências**. 2008
- BASSI, A. et al. Tattoo-associated skin reaction: the importance of an early diagnosis and proper treatment. **BioMed research international**, v. 2014, p. 354608, jan. 2014.
- BENTLIN, F. R. S.; POZEBON, D.; DEPOI, F. DOS S. Estudo comparativo de métodos de preparo de amostras de tinta para a determinação de metais e metalóides por técnicas de espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 884–890, 2009.
- BEUTE, T. C. et al. In Vitro Spectral Analysis of Tattoo Pigments. **Dermatologic Surgery**, v. 34, n. 4, p. 508–516, abr. 2008.
- BOROWSKA, S.; BRZÓSKA, M. M. Metals in cosmetics: Implications for human health. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 551–572, 2015.
- BOUKAMP, P. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 3, p. 761–771, 1 mar. 1988.
- BOURDON, J. A. et al. Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver. **Particle and fibre toxicology**, v. 9, p. 5, jan. 2012.
- BOZICH, J. S. et al. Surface chemistry, charge and ligand type impact the toxicity of gold nanoparticles to *Daphnia magna*. **Environ. Sci.: Nano**, v. 1, n. 3, p. 260–270, 19 maio 2014.
- BRASIL, Ministério da Agricultura do. **Regras para análise de sementes**. Departamento Nacional de Produção Vegetal., 365 p. 2009.
- BRUNNER, T. J. et al. In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles:

Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility †. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 14, p. 4374–4381, 11 jul. 2006.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17, 2007.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 67, n. 1, p. 1–27, 2008.

DAVE, N.; JOSHI, T. A Concise Review on Surfactants and Its Significance. **International Journal of Applied Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 663–672, 2017.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2–3, p. 193–236, fev. 2002.

ENGEL, E. et al. Modern tattoos cause high concentrations of hazardous pigments in skin. **Contact Dermatitis**, v. 58, n. 4, p. 228–233, 2008.

ENGEL, E. et al. Tattooing of skin results in transportation and light-induced decomposition of tattoo pigments--a first quantification in vivo using a mouse model. **Experimental dermatology**, v. 19, n. 1, p. 54–60, jan. 2010.

FAN, W. et al. The mechanism of chronic toxicity to *Daphnia magna* induced by graphene suspended in a water column. **Environ. Sci.: Nano**, v. 3, n. 6, p. 1405–1415, 2016.

FARAH, J. Y.; EL-GENDY, N. S.; FARAHAT, L. A. Biosorption of astrazone blue basic dye from an aqueous solution using dried biomass of Baker's yeast. *Journal of Hazardous Materials*, v. 148, p. 402–408, 2007.

FORTE, G. et al. Market survey on toxic metals contained in tattoo inks. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 23, p. 5997–6002, 15 nov. 2009.

GAUDRON, S. et al. Azo pigments and quinacridones induce delayed hypersensitivity in red tattoos. **Contact Dermatitis**, v. 72, n. 2, p. 97–105, 1 fev. 2015.

GHIAZZA, M. et al. Inhibition of the ROS-mediated cytotoxicity and genotoxicity of nano-TiO<sub>2</sub> toward human keratinocyte cells by iron doping. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 2, p. 2263, 23 fev. 2014.

GOPEE, N. V. et al. Response of mouse skin to tattooing: Use of SKH-1 mice as a surrogate model for human tattooing. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 209, n. 2, p. 145–158, 2005.

GRANT, C. A. et al. Tattoo ink nanoparticles in skin tissue and

- fibroblasts. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1183–1191, 20 maio 2015.
- HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1, p. 1–15, 2009.
- HØGSBERG, T. et al. Tattoo inks in general usage contain nanoparticles. **The British journal of dermatology**, v. 165, n. 6, p. 1210–8, dez. 2011.
- HØGSBERG, T. et al. Black tattoo inks induce reactive oxygen species production correlating with aggregation of pigment nanoparticles and product brand but not with the polycyclic aromatic hydrocarbon content. **Experimental dermatology**, v. 22, n. 7, p. 464–9, jul. 2013.
- HONG, J. et al. Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 17, n. 1, p. 177–185, 2015.
- HORVAT, A. J. M.; PETROVIC, M.; BABIC, S.; PAVLOVIC, D. M.; ASPERGER, D.; PELKO, S.; MANCE, A. D.; KASTELAN-MACAN, M. Analysis, occurrence and fate anthelmintics and their transformation products in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 61–24, 2012.
- HOSSEINI, S. D.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Decomposition and discoloration of synthetic dyes using hot/liquid (subcritical) water. **Water Research**, v.44, p.1900-1908, 2010.
- ISLAM, P. S. et al. Medical Complications of Tattoos: A Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 50, n. 2, p. 273–286, 3 abr. 2016.
- ISO. **6341: Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Stratus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test**. International Organization for Standardization. 2012
- ISO/TR. **11360: Nanotechnologies- Methodology for the classification and categorization of nanomaterials**. International Organization for Standardization/Technical report. 2010.
- JACOBSEN, E. et al. **Chemical Substances in Tattoo Ink**. [s.l.: s.n.].
- JAEGER, A. et al. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. **Toxicology**, v. 296, n. 1–3, p. 27–36, 2012.
- JHA, P.; JOBBY, R.; DESAI, N. . Remediation of textile azo dye acid red 114 by hairy roots of *Ipomoea carnea* Jacq. and assessment of degraded dye toxicity with human keratinocyte cell line. **Journal of Hazardous Materials**, v. 311, p. 158–167, 5 jul. 2016.
- JO, H. J. et al. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions

against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. **Journal of Hazardous Materials**, v. 227, p. 301–308, 2012.

KHAN, S. H.; FULEKAR, M. H.; PATHAK, B. Nanotoxicology - Health and Environmental Impacts: A Review. **Journal of Environmental Nanotechnology**, v. 4, n. 3, p. 55–73. 2015.

KIM, I.-S.; BAEK, M.; CHOI, S.-J. Comparative Cytotoxicity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CeO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticles to Human Lung Cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 3453–3458. 2010.

KIST, C. 1º Censo de tatuagem do Brasil. **Revista Super Interessante**, ed. 330. 2014.

KLUGER, N.; KOLJONEN, V. Tattoos, inks, and cancer. **The Lancet. Oncology**, v. 13, n. 4, p. e161-8. 2012.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, n. 1, p. 619–642, 28 out. 1998.

KROLL, A. et al. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 9, 23. 2011.

LAUX, P. et al. A medical-toxicological view of tattooing. **Lancet (London, England)**. 2015.

LEHNER, K. et al. Black tattoos entail substantial uptake of genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in human skin and regional lymph nodes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3. 2014.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 4, n. 1, p. 26–49. 2008.

LOPES, V. R. et al. Dose-dependent autophagic effect of titanium dioxide nanoparticles in human HaCaT cells at non-cytotoxic levels. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 22. 2016.

MENDES, C. R.; DILARRI, G.; PELEGRINI, R. T. Aplicação da biomassa *Saccharomyces cerevisiae* como agente adsorvente do corante Direct Orange 2GL e os possíveis mecanismos de interações adsorbato/adsorvente. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 20, n. 4, p. 898-908, 2015.

MURDOCK, R. C. et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 239–253. 2008.

NABESHI, H. et al. Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes.

**Particle and fibre toxicology**, v. 8. 2011.

NASSER, F. et al. Shape and Charge of Gold Nanomaterials Influence Survivorship, Oxidative Stress and Moulting of *Daphnia magna*. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 12. 2016.

NEALE, P. A. et al. Bioanalytical evidence that chemicals in tattoo ink can induce adaptive stress responses. **Journal of Hazardous Materials**, v. 296, p. 192–200. 2015.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. February 2006, p. 622–627, mar. 2006.

NGUYEN, V. H.; LEE, B.-J. Protein corona: a new approach for nanomedicine design. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 3137–3151. 2017.

P. RAJAGURU, K. KALAISELVI, K. PALANVELI, M. S. Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic - aerobic system. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 54, p. 268–273. 2000.

PARROTT, J. L.; BARTLETT, A. J.; BALAKRISHNAN, V. K. Chronic toxicity of azo and anthracenedione dyes to embryo-larval fathead minnow. **Environmental Pollution**, v. 210, p. 40–47. 2016.

PRIYA, E. S.; SELVAN, P. S.; UMayAL, A. N. Biodegradation studies on dye effluents and selective remazol dyes by indigenous bacterial species through spectral characterization. **Desalination and Water Treatment**, v. 55, p. 241–251, 2015.

RAJAGURU, P.; KALAISELVI, K.; PALANVELI, M. S. Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic - aerobic system. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 54, p. 268–273, 2000.

RAJ, S. et al. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 4, n. 3, p. 186–93, jul. 2012.

RAWAT, D.; MISHRA, V.; SHARMA, R. S. Detoxification of azo dyes in the context of environmental processes. **Chemosphere**, v. 155, p. 591–605. 2016.

REGENSBURGER, J. et al. Tattoo inks contain polycyclic aromatic hydrocarbons that additionally generate deleterious singlet oxygen. **Experimental dermatology**, v. 19, n. 8, p. e275-81. 2010.

RENVOIZÉ, C. et al. Apoptosis: Identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 111–120. 1998.

RIBBLE, D. et al. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 12. 2005.

SCHRAND, A. M. et al. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and**

**Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 544–568, set. 2010.

SOBRERO, Maria Cecilia; RONCO, Alicia. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA**. Canadá, Capítulo, v. 4, p. 71-79. 2004.

SOUZA, E. F. DE; PERES, M. R.; MORAES, S. B. DE. Avaliação do desempenho de surfactantes para a solubilização de fases líquidas não aquosas em meio aquoso. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 532–538. 2010.

STERN, S. T.; ADISESHAIHAH, P. P.; CRIST, R. M. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 9, n. 1, p. 20., 2012.

SUN, P. et al. Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 2, p. 347–56. 2010.

TIMKO, A. L. et al. In Vitro Quantitative Chemical Analysis of Tattoo Pigments. **Archives of Dermatology**, v. 137, n. 2, p. 143–147, 1 fev. 2001.

WALLACE, D. C.; FAN, W.; PROCACCIO, V. Mitochondrial energetics and therapeutics. **Annual review of pathology**, v. 5, p. 297–348. 2010.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5, p. 612–616. 1999.

XIA, Q. et al. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 64–75. 2014.

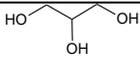
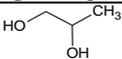
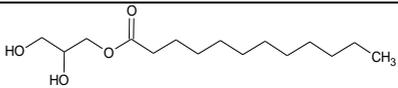
ZANONI, T. B. et al. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). **Toxicology Letters**, v. 227, n. 2, p. 139–149. 2014.

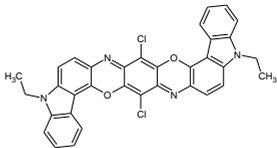
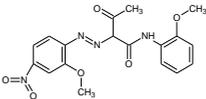
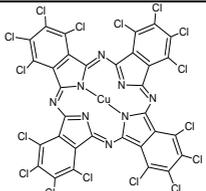
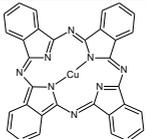
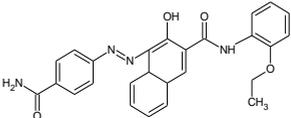
ZHANG, H. et al. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. **ACS nano**, v. 6, n. 5, p. 4349–68. 2012.

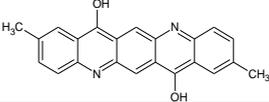
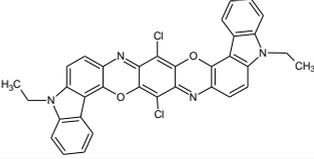
ZIRKIN, H. J.; AVINOACH, I.; EDELWITZ, P. A tattoo and localized lymphadenopathy: a case report. **Cutis**, v. 67, n. 6, p. 471–2, jun. 2001.

ZUVERZA-MENA, N. et al. Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses-A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 110, p. 236–264. 2017.

**ANEXO A. Fórmulas moleculares dos constituintes descritos nas embalagens das tintas de tatuagem azul, verde, vermelha e preta.**

<b>Fórmula molecular dos veículos</b>		
<b>Glicerina</b>	<b>Propilenoglicol</b>	<b>Surfactante não iônico</b>
		

<b>Fórmula molecular dos pigmentos</b>		
<b>Tinta</b>	<b>Pigmentos</b>	<b>Fórmula molecular</b>
<b>Azul</b>	CI 77891	TiO <sub>2</sub>
	CI 51319	
<b>Verde</b>	CI 11741	
	CI 74260	
	CI 74160	
	CI 77891	TiO <sub>2</sub>
<b>Vermelha</b>	CI 12475	

	CI 73915	
	CI 51319	
<b>Preta</b>	CI 77266	Estruturas compostas basicamente por Carbono

