



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DATAÇÃO DE LANÇAMENTOS GRÁFICOS POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS E ANÁLISE DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO NATURAL DE CORANTES**

KARINA FERRAZ FERRO COSTA

ORIENTADOR: Dr. JORGE JARDIM ZACCA

Brasília, DF

2016



Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DATAÇÃO DE LANÇAMENTOS GRÁFICOS POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS E ANÁLISE DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO NATURAL DE CORANTES**

KARINA FERRAZ FERRO COSTA

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Química, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Jorge Jardim Zacca

Brasília, DF

2016

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Karina Ferraz Ferro Costa**, matrícula nº **14/0106162**, intitulada “***Datação de Lançamentos gráficos por Espectrometria de Massas e análise do perfil de degradação natural de corantes***”, apresentada no (a) Salão Nobre do Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal da Universidade de Brasília (UnB) em 25 de outubro de 2016.

Dr. Jorge Jardim Zacca
Presidente de Banca (INC/DPF)

Prof.^a Dra. Ingrid Távora Weber
Membro Titular (IQ/ UnB)

Prof. Dr. André Filipe dos Ramos Martins Braz
Membro Titular (UFPE)

Prof. Adriano Otávio Maldaner
Membro Suplente (INC/PF)

Em 22 de novembro de 2016.

Agradecimentos

Agradeço à Deus pelo direcionamento e proteção.

À minha família, pelos conselhos e incentivos nos momentos difíceis.

Ao meu querido marido Leandro Oliveira, pela sua dedicação, paciência e por entender minha ausência durante a execução deste trabalho.

À UnB e ao INC/DPF pela oportunidade de realização deste trabalho.

À FINEP pelo financiamento para a aquisição do equipamento LC-MS/MS utilizado nesse trabalho.

Ao Instituto de Criminalística da Polícia Civil do DF, em especial ao perito criminal Dr. Luciano, por permitir o uso do equipamento QTOF para os ensaios de validação.

Ao chefe do SEPLAB/INC Élvio Dias Botelho por possibilitar a realização desse trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Jorge Jardim Zacca, pela oportunidade, paciência, atenção e sabedoria na orientação desse trabalho.

Aos servidores do DPF Alessandro de Jesus Pimenta e Fernanda, por possibilitarem as longas e frequentes visitas ao arquivo do INC. Agradeço também a toda equipe do SEPLAB/INC, em especial ao perito Maurício Leite pelo apoio, sugestões e disponibilidade em ajudar, à Talita pelo suporte no laboratório e a estagiária Millena pela contribuição na etapa de validação do método.

Em especial, agradeço ao Professor Dr. Jez Willian Batista Braga, meu co-orientador não oficializado, pelas horas dedicadas às discussões e desenvolvimento deste trabalho e ao Professor Dr. Guilherme Brand pela disponibilidade e colaboração.

À equipe do Laboratório Central da CAESB-DF, que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à Tatiane Grobério, Erislene Almeida, Dina da Silva e Adrianne Fontinele pelos conselhos, amizade e incentivo.

À banca examinadora pelas sugestões para o melhoramento deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que não foram citadas, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

1	Introdução e Objetivos	2
1.1	Introdução	2
1.2	Objetivos	3
2	Revisão Bibliográfica	5
2.1	Tintas de caneta.....	5
2.1.1	Composição Química.....	5
2.1.2	Principais tipos de caneta.....	8
2.2	Análise Química de tintas de canetas.....	10
2.2.1	Técnicas instrumentais para análise de tintas	10
2.2.2	Datação de tintas de canetas	18
2.2.3	Métodos para datação de tintas de canetas esferográficas.....	21
3	Espectrometria de massas.....	32
3.1	Fonte de ionização por <i>electrospray</i> (ESI)	34
3.2	Analisador de massa de tempo de voo (TOF).....	36
3.3	Detector do tipo <i>Microchannel plate</i>	39
4	Ferramentas Quimiométricas	41
4.1	Comparação entre amostras	41
4.1.1	Função Cosseno	42
4.1.2	Cálculo do dendrograma.....	44
4.1.3	Correlações intra e interclasses.....	45
4.1.4	Construção dos histogramas de amostras ligadas e não ligadas	46
4.1.5	ROC – <i>Receiving Operating Characteristics</i>	47
5	Materiais e métodos	52
5.1	Amostras	52

5.2	Equipamentos.....	56
5.3	Reagentes	57
5.4	Procedimento experimental	57
5.4.1	Preparo das amostras	57
5.4.2	Preparo do padrão de tinta para controle	59
5.4.3	Preparo da fases móveis.....	59
5.5	Parâmetros do método do TOF-MS.....	59
5.6	Figuras de mérito do método do TOF-MS.....	60
5.6.1	Repetitividade	61
5.6.2	Precisão intermediária.....	62
5.6.3	Reprodutibilidade.....	62
5.6.4	Seletividade.....	62
5.7	Análise dos dados obtidos por MS.....	63
5.8	Análise Quimiométrica	65
6	Resultados	67
6.1	Figuras de mérito do método do TOF-MS.....	67
6.1.1	Repetitividade	67
6.1.2	Precisão intermediária.....	70
6.1.3	Reprodutibilidade.....	72
6.1.4	Seletividade.....	74
6.2	Amostras de tinta de laudos do INC	74
6.2.1	Panorama das amostras.....	74
6.2.2	Perfis de degradação dos corantes com o decorrer do tempo.....	81
6.3	Correlações entre amostras de tinta de laudos	88
6.3.1	Correlação entre amostras – por corante.....	88

6.3.2	Correlação entre amostras – por formulação	96
6.4	Estudos de caso	107
6.4.1	Estudo de caso 1 - Ano 1976	107
6.4.2	Estudo de caso 2 – Ano 2012.....	114
7	Conclusão	120
8	Perspectivas Futuras	123
9	Referências Bibliográficas	125
10	Anexos.....	130
10.1	Anexo 1 – Razão isotópica para amostras de validação	130
10.2	Anexo 2 – Espectros de massa obtidos para as amostras de validação	135
10.3	Anexo 3 – Tabelas para escolha do número de classes contendo nclass, AUC, ρ_{NL} e ρ_L para cada corante/ formulação	137
10.4	Anexo 4 – Histogramas obtidos para – 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (G por corante) e para a formulação 1,3- dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC)	143

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais trabalhos sobre análise de tintas aplicadas à Ciência Forense utilizando espectrometria de massas.....	15
Tabela 2 - Resultados obtidos a partir de nclass definido	50
Tabela 3 - Total de amostras coletadas por ano e por cor de tinta de canetas.....	53
Tabela 4 - Locais de realização dos experimentos	56
Tabela 5 – Principais características dos equipamentos utilizados neste trabalho.....	56
Tabela 6 - Parâmetros do método conforme o laboratório/equipamento	60
Tabela 7 - Canetas escolhidas para os ensaios de precisão	61
Tabela 8 - Razão m/z dos íons moleculares observados para cada corante.....	64
Tabela 9 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Violeta Cristal – INC.....	68
Tabela 10 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Basic Blue 7 – INC ¹	68
Tabela 11 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Victoria Blue B – INC ¹	68
Tabela 12 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Violeta Cristal – UnB.....	69
Tabela 13 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Basic Blue 7 – UnB ²	69
Tabela 14- Resultados dos ensaios de repetitividade para o Victoria Blue B – UnB ²	69
Tabela 15 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 2 - INC.....	70
Tabela 16 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a caneta 5 - INC.....	71
Tabela 17 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 6 - INC ⁴	71
Tabela 18 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 2 – UnB ⁴	71
Tabela 19 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 5 – UnB.....	72
Tabela 20 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 6 – UnB ⁵	72
Tabela 21 - Resultados dos ensaios de reprodutibilidade para a caneta 2.....	73
Tabela 22 - Resultados dos ensaios de reprodutibilidade para a caneta 5 ⁶	73
Tabela 23 - Resultados dos ensaios de reprodutibilidade para a caneta 6 ⁶	73

Tabela 24 - Total de amostras excluídas do banco de dados pela presença de m/z 240 isolado e da sequência m/z 268, 240 e 212 e a distribuição dessas amostras, por década.....	77
Tabela 25 - Distribuição das formulações de canetas azuis por década.....	79
Tabela 26 - Distribuição das formulações de canetas pretas por década.....	79
Tabela 27 - Resultados obtidos para cada corante, independente da formulação	95
Tabela 28 - Resultados obtidos para cada formulação	106
Tabela 29 - Valores de $\rho > \rho_{NL}$ para laudos correlacionados com algumas tintas dos documentos questionados no estudo de caso 1 ($\rho_{NL} = 0,9956$)	113
Tabela 30 - Valores de $\rho > \rho_{NL}$ para laudos correlacionados com as tintas das regiões 1 a 5 do documento questionado - estudo de caso 2 ($\rho_{NL} = 0.9956$)	118

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura de alguns solventes utilizados na formulação de tintas de canetas	5
Figura 2 - Exemplos de colorantes empregados em formulações de tinta de caneta	7
Figura 3 - Esfera metálica presente na ponta das canetas esferográficas	8
Figura 4 - Algumas características do traçado de caneta esferográfica.....	9
Figura 5 - Espectro de massa obtido experimentalmente e estruturas químicas do corante Violeta Cristal e de alguns de seus produtos de degradação	25
Figura 6 - Espectro de massa obtido experimentalmente e estruturas químicas do corante Basic Blue B e um de seus produtos de degradação	26
Figura 7 - Estruturas das guanidinas e espectro de massas obtido experimentalmente contendo os possíveis picos referentes aos produtos de degradação	27
Figura 8 - Componentes básicos de um espectrômetro de massas	33
Figura 9 - Representação esquemática de uma fonte de ionização ESI. Adaptado ⁶⁷	34
Figura 10 - Efeito do potencial ESI na gota localizada na ponta do capilar ⁶⁵	35
Figura 11- Princípio da separação de massas por TOF. Íons com valores altos de m/z são representados pelas esferas grandes e íons de pequena razão m/z por esferas menores ⁶⁷	36
Figura 12 - Esquema de funcionamento de um analisador TOF. Adaptado ⁷¹	37
Figura 13 - Esquema da aceleração ortogonal no analisador de massas TOF utilizando injeção quadrupolo (Q-TOF) ⁷¹	38
Figura 14 - (a) Construção dos vetores a partir do espectro de massas (b) Comparação dos vetores para cálculo do quadrado da função cosseno	43
Figura 15 - Exemplo de um dendrograma, onde pode-se observar a distinção de 5 e 10 classes	44
Figura 16 - (a) Correlação de amostras intraclasse e (b) correlação de amostras interclasses .	45
Figura 17 – Histogramas de correlação típicos envolvendo amostras ligadas (preenchido com círculos pretos) e não ligadas (hachurado). Detalhe: ampliação da zona de sobreposição	46

Figura 18 - Curvas ROC para histogramas com diferentes zonas de sobreposição	47
Figura 19 - AUC em uma curva ROC.	48
Figura 20 - Histogramas e curvas ROC para três casos possíveis: (a) Histogramas totalmente separados; (b) Histogramas totalmente sobrepostos; (c) Histogramas parcialmente separados. L = histograma das amostras ligadas; NL = histograma das amostras não ligadas.	49
Figura 21 - Exemplo de escolha do nclass de acordo com o método ULT.	50
Figura 22 - Procedimento para cálculo da razão isotópica. Detalhe: ilustração do cálculo da r.i. para o corante Violeta Cristal.	55
Figura 23 - Procedimento experimental para análise de tintas de canetas em documentos	58
Figura 24 - Espectro de massa obtido para uma amostra produzida no ano de 1985.....	64
Figura 25 – Espectro de massas de uma amostra que contém o íon m/z 240 isolado e a possível estrutura desse composto	75
Figura 26 - Espectro de massas de uma amostra com íons m/z 268, 240 e 212 Th.	76
Figura 27 - Estrutura do composto 1,3-dietil-1,3-difenilguanidina.....	76
Figura 28 - Distribuição das cores das amostras de tinta de caneta obtidas dos laudos.....	77
Figura 29 - Proporção de todas as formulações de tintas detectadas, onde G=1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, C=Violeta Cristal, V = Victoria Blue B, B=Basic Blue 7 e R= Rodamina ..	78
Figura 30 - Emprego das formulações de tintas mais representativas durante as décadas.....	80
Figura 31 - Presença de corantes nas tintas extraídas dos laudos.....	81
Figura 32 - Espectros de massas: A) Amostra de tinta em documento de 1986; B) Amostra de tinta em documento de 2012.....	82
Figura 33 - Espectros de massas: A) Amostra de tinta em laudo de 1962; B) Amostra de tinta em laudo de 2002.....	83
Figura 34 - Espectros de massas: A) Amostra de tinta em laudo de 1964; B) Amostra de tinta em laudo de 2004.....	84
Figura 35 - Espectros de massas: A) Amostra de tinta extraída de um laudo de 1962; B) Amostra de tinta em laudo de 2014.....	85

Figura 36 - Espectro de massas: A) Amostra de tinta em laudo de 1962; B) Amostra de tinta em laudo de 2014.....	87
Figura 37 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante – Violeta Cristal (C). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 1138 e 6% respectivamente.....	89
Figura 38 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante – 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (G). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 1167 e 19% respectivamente.	90
Figura 39 - Idade (anos) das amostras correlacionadas e erros de datação - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (por corante)	91
Figura 40 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante - Victoria Blue B (V). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 1375 e 19% respectivamente.	92
Figura 41 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante - Basic Blue 7 (B). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 11340 e 97% respectivamente.....	92
Figura 42 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante - Rodamina (R). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 4005 e >98% respectivamente.....	93
Figura 43 - Histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 645 e >23% respectivamente.	97
Figura 44 - Idades (anos) das amostras correlacionadas e erros de datação – 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC)	98
Figura 45 - Histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) - Violeta Cristal e Victoria Blue B (CV). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 52 e >8% respectivamente.	99
Figura 46 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rodamina e Basic Blue 7 (GRB). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 1988 e >95% respectivamente.....	100
Figura 47 – Idade (anos) das amostras correlacionadas e erros de datação - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rodamina e Basic Blue 7 (GRB).	101

Figura 48 - Histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina na formulação GRB (“G de GRB”). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 190 e >46% respectivamente.....	102
Figura 49 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por formulação - Basic Blue 7 (B). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 819 e >95% respectivamente.	103
Figura 50 - Histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por formulação - Violeta Cristal (C). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 58 e >48% respectivamente.....	104
Figura 51 – Idade (anos) das amostras correlacionadas e erros de datação por formulação – Violeta Cristal (C)	104
Figura 52 - Histograma das amostras correlacionadas($\rho > \rho_{NL}$) - Violeta Cristal e Basic Blue 7 (CB). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 122 e >74% respectivamente.	105
Figura 53 - Frente do documento 1 (Comunicação Interna)	108
Figura 54 - Verso do documento 1 (Comunicação interna)	108
Figura 55 - Documento 2 (Aviso prévio)	108
Figura 56 - Documento 3 (Registro de empregados)	109
Figura 57 - Espectro de massas da região 1 do documento 1	109
Figura 58 - Espectro de massas da região 2 do documento 1 (verso)	110
Figura 59 - Espectro de massas da região 3 do documento 2.....	110
Figura 60 - Espectro de massas da região 4 do documento 2.....	111
Figura 61 - Espectro de massas da região 5 documento 3.....	111
Figura 62 - Espectro de massas de uma tinta extraída de um laudo de 1976	112
Figura 63 - Documento questionado com regiões analisada por TOF/MS em destaque - Estudo de caso 2	114
Figura 64 - Espectro de massas da região 1 do documento questionado - Estudo de caso 2 .	115
Figura 65 - Espectro de massas da região 2 do documento questionado - Estudo de caso 2 .	115
Figura 66 - Espectro de massas da região 3 do documento questionado - Estudo de caso 2 .	116
Figura 67 - Espectro de massas da região 4 do documento questionado - Estudo de caso 2 .	116

Figura 68 - Espectro de massas da região 5 do documento questionado - Estudo de caso 2. 116

Figura 69 - Espectro de massas de um lançamento presente em um laudo de 2012. 117

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

APCI: Ionização química à pressão atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

AUC: Área sob curva ROC (do inglês, *Area Under the Curve*)

CI: Ionização química (do inglês, *Chemical Ionization*)

CV: Coeficiente de variação

DART-MS: Espectrometria de massas por análise direta em tempo real (do inglês, *Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry*)

DESI-MS: Espectrometria de massas com ionização por dessorção com *electrospray* (do inglês, *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry*)

DRIFTS: Espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*)

EI: Ionização por elétrons (do inglês, *Electron Ionization*)

EASI-MS: Espectrometria de massas assistida por ionização com spray de solvente em condições ambientais (do inglês, *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry*)

ESI: Ionização por *electrospray* (do inglês, *Electrospray Ionization*)

FN: Taxa de falsos negativos

FP: Taxa de falsos positivos

FTIR: Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (do inglês, *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*)

HCA: Análise hierárquica de agrupamentos (do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*)

HPCE: Eletroforese capilar de alta eficiência (do inglês, *High Performance Capillary Electrophoresis*)

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

HS: do inglês, *headspace*

ICP-MS: Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

IC/PCDF: Instituto de Criminalística/ Polícia Civil do Distrito Federal

INC: Instituto Nacional de Criminalística

IR: Infravermelho (do inglês, *infrared*)

LDA: Análise linear de discriminantes (do inglês, *Linear Discriminant Analysis*)

LDI-MS: Espectrometria de massas assistida por dessorção/ionização a laser (do inglês, *Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*)

LD-MS: Espectrometria de massas assistida por dessorção a laser (do inglês, *Laser Desorption Mass Spectrometry*)

MALDI-MS: Espectrometria de massas com ionização/dessorção a laser assistido por matriz (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry*)

MHS-SPME: Microextração em fase sólida em modo *multiple headspace* (do inglês, *Multiple Headspace-solid-phase Microextraction*)

PCA: Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Componentes Analysis*)

PSI: Ionização por *paper spray* (do inglês, *Paper Spray Ionization*)

ROC: do inglês *Receiving Operating Characteristic*.

TLC: Cromatografia em camada delgada (do inglês, *Thin Layer Chromatography*)

TOF-SIMS: Espectrometria de massas por íons secundários com detector por tempo de voo (do inglês, *Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry*)

UHPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

UnB: Universidade de Brasília

UV: Ultravioleta

VSC: Comparador Espectral de Vídeo (do inglês, *Video Spectral Comparison*)

Resumo

Presentes em várias transações cotidianas, os diversos tipos de documentos como contratos, certidões de nascimento e carteiras de trabalho são alvo frequente de falsificações e adulterações. Desta forma, é comum que esse tipo de material seja encaminhado para exame pericial. As técnicas de análise química de documentos, juntamente com as técnicas documentoscópicas clássicas, vêm se mostrando promissoras na resolução de problemas como datação de tintas e falsificações de documentos. Este trabalho visou desenvolver um método que permitisse uma análise simples, rápida e confiável de tintas de canetas esferográficas presentes em documentos com o intuito de estimar a data em que elas foram lançadas no suporte. A validação do método restringiu-se a determinação da precisão, por tratar-se de um método qualitativo em que não era necessária a quantificação dos corantes analisados. As figuras de mérito analisadas atenderam aos critérios definidos pelo Setor de Perícias de Laboratório da Polícia Federal (SEPLAB/INC/PF). Com o objetivo de verificar os padrões de degradação dos corantes ao longo do tempo, foi realizada uma amostragem de manuscritos presentes em laudos periciais, produzidos entre os anos de 1962 a 2014, que se encontravam armazenados no arquivo do Instituto Nacional de Criminalística do Departamento de Polícia Federal (INC/PF). As 505 amostras de tinta de caneta foram analisadas por espectrometria de massas, com ionização ESI, e, a partir dos dados obtidos, foi realizado um levantamento sobre as formulações presentes nas tintas e os corantes que apresentavam degradação com o tempo. Foram avaliados os corantes 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Violeta Cristal, Rodamina, Basic Blue 7 e Victoria Blue B. Com os valores de área dos picos normalizados, foi aplicado o método ULT, desenvolvido para comparação de amostras de sal de cocaína, para o cálculo dos coeficientes de correlação entre pares de amostras de tintas utilizando a métrica do quadrado da função cosseno. Esse estudo estatístico possibilitou a definição de valores limites de correlação e os intervalos de confiança de datação para cada formulação detectada. Foi possível observar que alguns corantes, como a Rodamina e o Basic Blue 7, são bastante estáveis mesmo com o decorrer de décadas, ao passo que os demais corantes estudados exibem um processo de degradação mais acentuado, caracterizado pela perda de grupos metila, com o passar do tempo. O método desenvolvido nesse trabalho não requer o conhecimento prévio sobre as condições de armazenamento dos documentos nem sobre a formulação inicial das tintas estudadas.

Palavras-chave: Datação de tintas, canetas esferográficas, corantes, espectrometria de massas, método ULT.

Abstract

Present in daily transactions, several types of documents such as contracts, birth certificates and work permits are often target of counterfeiting and tampering. Thus, it is common for this type of material to be sent to expert examination. The techniques of chemical analysis of documents along with the classic documentoscopic techniques have shown to be promising in solving problems like dating inks and document forgery. This study aimed to develop a method that allows a simple, fast and reliable analysis of ballpoint pens inks present documents in order to estimate the date on which they were launched in support. The method validation was limited to determining the accuracy for this is a qualitative method wherein it was not necessary to quantify the analyzed dyes. The merit figures analyzed met the criteria established by Forensic Chemistry Service of the Brazilian Federal Police (SEPLAB/INC/PF). In order to check the colors degradation patterns over time, a sampling of manuscripts expert reports was performed, produced between 1962-2014, which were stored in the file Criminology National Institute of the Federal Police Department (INC/PF). The 505 samples of ink pen were analyzed by mass spectrometry, with ESI ionization, and from the obtained data, a survey of the formulations present in the inks and dyes degraded over time was performed. The evaluated dyes were 1,3-dimethyl-1,3-ditolyguanidine, Crystal Violet, Rhodamine, Basic Blue 7 and Victoria Blue B. From the area values of normalized peaks, ULT method, developed for comparing cocaine salt samples, was applied for the calculation of correlation coefficients between pairs of samples using the metric cosine squared function. This statistical study allowed the definition of limits of correlation values and confidence intervals for each formulation. From this study it was observed that some dyes, such as Rhodamine and Basic Blue 7, are quite stable even over the course of decades, whereas the other dyes studied show a more pronounced degradation process, characterizes by the loss of methyl groups as time went on. The developed method in this work does not require prior knowledge about the storage conditions of the documents as well as initial formulation of studied dyes.

Keywords: ink dating, ballpoint pens, dyes, mass spectrometry, ULT method.

Introdução e Objetivos

1 Introdução e Objetivos

1.1 Introdução

Em linhas gerais, documento é todo suporte material (papel, plástico, etc.) contendo informação útil (manuscritos, imagens, dados, etc.). Presentes em várias transações do cotidiano, os diversos tipos de documentos como passaportes, contratos, certidões de nascimento e carteiras de trabalho são alvos frequentes de falsificações e adulterações. Desta forma, é comum que esse tipo de material seja encaminhado para exame pericial.¹

A Documentoscopia é a parte da criminalística que tem como objetivo atestar a autenticidade e a autoria dos documentos. No âmbito policial, ela se caracteriza por não se satisfazer somente com a comprovação da legitimidade ou não de um documento, mas também procura determinar a autoria, os meios empregados para sua produção e sua integridade.²

O objeto de estudo da Documentoscopia é chamado documento questionado, que é aquele suspeito de ser fraudulento ou no qual se busquem esclarecimentos quanto à sua origem ou história. É importante que, durante o exame documentoscópico, o documento seja bem preservado, devendo ser tomada uma série de precauções, como proteção ao calor, luz e umidade, etc.³

O exame documentoscópico pode ser realizado em alguns aspectos específicos do documento, como, por exemplo, seu substrato (natural, como o papel, ou sintético, como polímeros), as matérias-primas empregadas na sua produção (como as tintas e pigmentos), e a existência de alterações (como rasuras e montagens), de marcas latentes e de eventuais danos (como derramamento de líquidos e rasgos).

Novos métodos vêm sendo desenvolvidos buscando a resolução de problemas como datação de tintas, falsificação de documentos e cruzamento de traços.² Em combinação com outros métodos físicos, a análise química de tintas em documentos vem sendo bastante utilizada para estabelecer se documentos questionados são autênticos ou fraudulentos, para prever a idade de lançamentos de tinta e sua procedência (autoria e origem da tinta).^{4,5}

A inserção sistemática da química na análise de documentos em perícia criminal vem crescendo a cada dia, sendo de 1907 um dos primeiros trabalhos relevantes no estudo de tintas de caneta.⁶ As análises físico-químicas, juntamente com os exames documentoscópicos clássicos, permitem solucionar problemas até então sem respostas pela abordagem tradicional.⁷

Em levantamento feito em 2014, aproximadamente um em cada cinco laudos (22%) emitidos pela Perícia Criminal Federal é proveniente de exames documentoscópicos.⁸ Nesse sentido, a resolução de questionamentos técnico-científicos a respeito de documentos legalmente apreendidos é de suma importância para o trabalho pericial da Polícia Federal.

1.2 Objetivos

- Desenvolvimento e validação de um novo método de análise química de corantes de tintas de canetas por espectrometria de massas;
- Aplicação do método à análise de corantes provenientes de lançamentos em documentos com data de elaboração conhecida, com o intuito de verificar padrões naturais de degradação ao longo do tempo para os corantes mais comumente utilizados em canetas esferográficas;
- Utilização de ferramentas estatísticas para estabelecer uma correlação entre os padrões de degradação de corantes e a data de elaboração de documentos;
- Verificar a aplicabilidade do método utilizando amostras de documentos provenientes de casos reais recebidos pelo Instituto Nacional de Criminalística (INC) da Polícia Federal (PF).

Revisão Bibliográfica

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Tintas de caneta

2.1.1 Composição Química

Atualmente, existe uma grande variedade de formulações para tintas de canetas, mas, de uma maneira geral, elas são compostas por veículos, colorantes, resinas e aditivos.⁹

Os veículos são utilizados para dissolver ou dispersar alguns componentes da tinta, proporcionando mais homogeneidade e fluidez. São constituídos basicamente por solventes, sendo muito utilizados solventes orgânicos de secagem rápida e/ou água na formulação das tintas. Os veículos proporcionam viscosidade adequada para a aplicação da tinta no suporte, nivelam o filme de tinta, controlam a taxa de evaporação e influenciam parâmetros da aparência final, tais como brilho.¹⁰

Solventes à base de glicol são os mais utilizados em canetas esferográficas, no entanto, álcoois benzílicos têm sido também comumente utilizados.¹¹ Dentre os solventes orgânicos mais empregados atualmente estão o propilenoglicol, álcool benzílico, 2-fenoxietanol e o 2-(2-fenoxietoxi)etanol.^{1,9} Suas estruturas podem ser visualizadas na Figura 1.

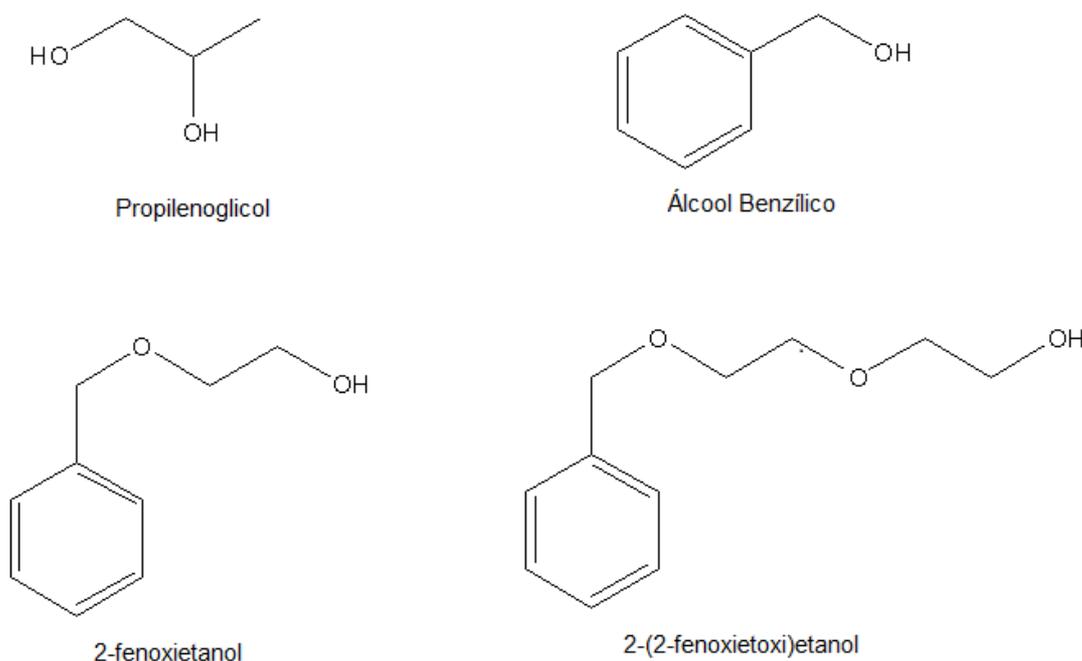


Figura 1 - Estrutura de alguns solventes utilizados na formulação de tintas de canetas

Colorante é o termo genérico empregado na denominação de compostos químicos, responsáveis pelo estabelecimento da cor em uma tinta, dotados de grupos funcionais (cromóforos) capazes de absorver e transmitir determinadas faixas de comprimento de onda do espectro da luz visível. Em função de sua solubilidade no(s) veículo(s), os colorantes são classificados em corantes (solúveis) e pigmentos (insolúveis, normalmente presentes em suspensão).

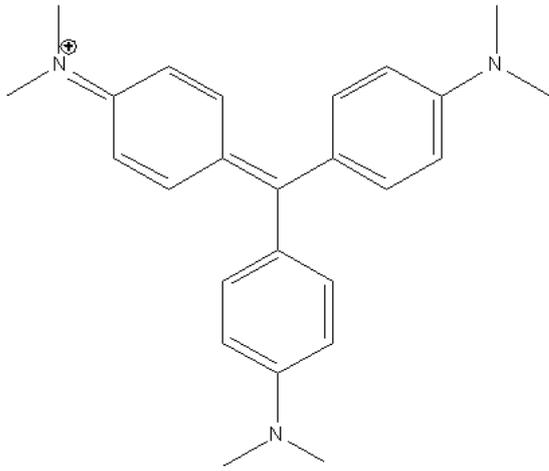
As tintas de caneta podem conter exclusivamente corantes, exclusivamente pigmentos, ou conter os dois tipos de colorantes.¹ As tintas de caneta esferográfica mais comuns utilizam principalmente corantes sintéticos solubilizados em veículos (solventes). No caso de canetas esferográficas, o teor de colorantes atinge tipicamente até um quarto (25%) da composição total da tinta.¹²

Brunelle e Crawford¹¹ definem quatro classes principais de corantes que são de interesse no estudo de tintas: arilmetanos, que são derivados do metano, com hidrogênios substituídos por anéis aril; corantes azo, que contêm o grupo cromóforo N=N; ftalocianinas, que são complexos de metal, baseados em um núcleo tetrabenzoporfirazina; e, por último, nigrosinas, que são corantes ácidos, das classes químicas azina (piridina) ou anilina (aminobenzeno).

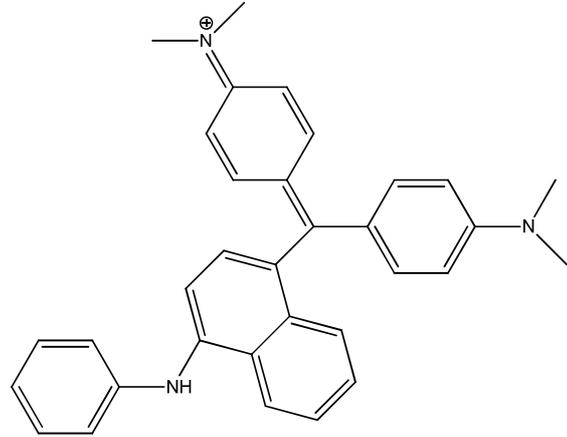
Dentre os corantes mais empregados, da classe dos arilmetanos estão o Basic Violet 3 (Violeta Cristal), Basic Blue 26 (Victoria Blue B) e Basic Blue 7 (Victoria Pure Blue BO). O Basic Violet 10 (Rodamina B) e o Basic Red 1 (Rodamina 6G), também bastante comuns na formulação de tintas de caneta, são considerados xantenos, classificação não utilizada por Brunelle e Crawford¹¹. As estruturas desses compostos são mostradas na Figura 2.

As resinas são consideradas a parte não volátil da tinta, de alto peso molecular, solúveis em solventes orgânicos e geralmente não solúveis em água. Podem ser de origem natural, ou sintéticas, produzidas a partir da polimerização de uma série de monômeros. Elas são utilizadas para ajustar a viscosidade das tintas de caneta esferográfica, aumentar a adesão do filme de tinta no suporte e melhorar a qualidade de lubrificação da esfera metálica na ponta da caneta. Dentre as resinas mais utilizadas estão a resina fenólica, acetato de polivinila, sulfonamida e resinas cetônicas.^{9, 11}

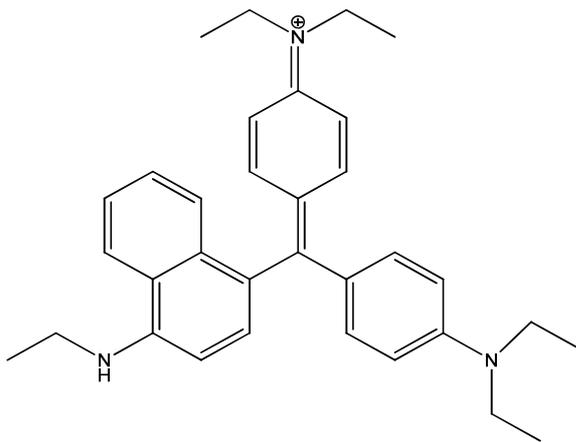
Os aditivos são componentes presentes em menor quantidade nas tintas com o intuito de modificar suas características. Dentre os exemplos de aditivos utilizados temos os agentes secantes, plastificantes, surfactantes, lubrificantes, biocidas e inibidores de corrosão.¹³



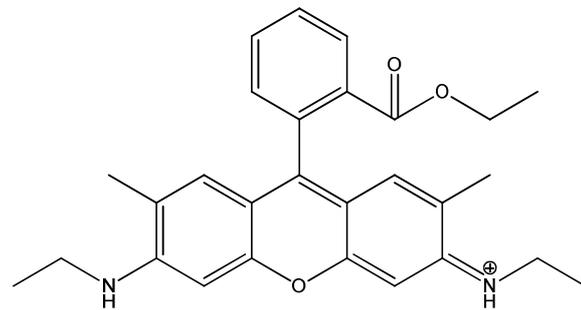
Basic Violet 3 (Violeta Cristal)



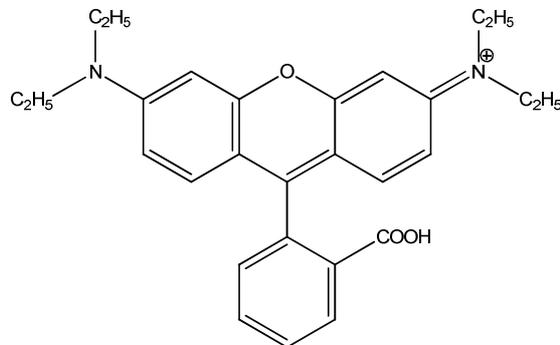
Basic Blue 26 (Victoria Blue B)



Basic Blue 7 (Victoria Pure Blue BO)



Basic Red 1 (Rodamina 6G)



Basic Violet 10 (Rodamina B)

Figura 2 - Exemplos de colorantes empregados em formulações de tinta de caneta

2.1.2 Principais tipos de caneta

Atualmente, os tipos de caneta que estão disponíveis no mercado podem ser divididos, em função da sua composição química, em dois grupos: 1) canetas esferográficas: os colorantes utilizados são corantes e sua tinta é viscosa; 2) canetas não esferográficas: tintas à base de água e os colorantes podem ser corantes, pigmentos, ou ambos. Dentro desse último grupo incluem-se as canetas tinteiro, *rollerball* e gel.⁹

A caneta esferográfica foi criada em 1939, por László József Biró, mas só a partir de 1945 elas começaram a ser comercializadas nos Estados Unidos. As primeiras canetas esferográficas utilizavam como solventes: óleo mineral, óleo de linhaça e óleo de mamona. Por volta de 1950, as tintas de caneta esferográfica passaram a ser produzidas à base de glicol. Outra mudança ocorreu na sua formulação em 1955, quando começaram a ser utilizados corantes quelados metalizados, como a ftalocianina de cobre.¹⁴

As canetas tipo esferográficas são constituídas basicamente de corantes (dissolvidos em um ou mais veículos), resinas e alguns componentes aditivos. Sua tinta é insolúvel ou pouco solúvel em água. Ela apresenta em sua ponta uma esfera metálica (Figura 3), geralmente de aço ou tungstênio, que gira durante a escrita para depositar de maneira controlada a tinta sobre o papel. A esfera se mantém no lugar apropriado por um encaixe que, embora justo, permite que a esfera role enquanto se escreve. Além dessa função, a esfera também impede que a tinta contida dentro do reservatório entre em contato com o ar e seque.^{9, 15}

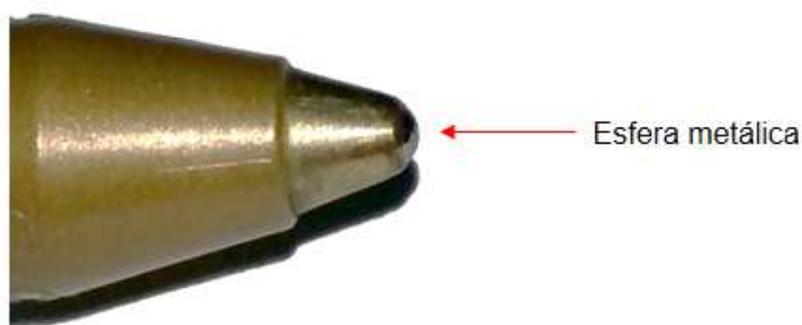


Figura 3 - Esfera metálica presente na ponta das canetas esferográficas

As esferográficas possuem características específicas de traçado, o que permite diferenciá-las de outros tipos de caneta. Dentre essas características, pode-se citar: a sulcagem, que é uma pequena depressão produzida pela esfera metálica da ponta da caneta no papel; as estrias, que são riscas sem tinta decorrentes do movimento da esfera metálica e contidas dentro do traço principal; os brancos microscópicos, que são as pequenas falhas de entintamento no traço; e as esquirolas, que são pequenos derrames de tintas no traçado. A Figura 4 traz algumas dessas características visualizadas com auxílio de um equipamento Comparador espectral de vídeo VSC® 6000. No traçado da caneta esferográfica, não se observa difusão lateral da tinta através das fibras do papel.⁹

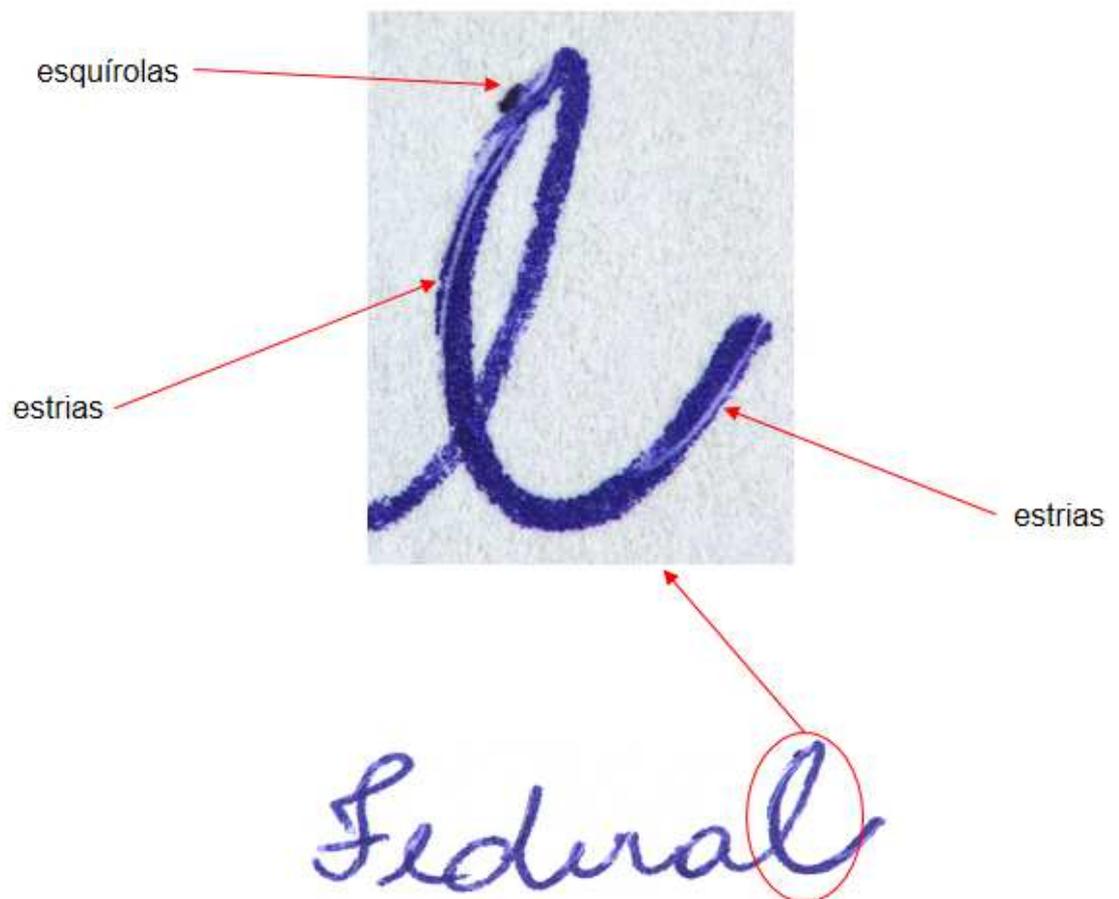


Figura 4 - Algumas características do traçado de caneta esferográfica

O tipo mais comum de tinta de caneta analisada em investigações forenses é a esferográfica. Estima-se que em torno de 80% dos documentos questionados enviados para análise de tintas contêm tinta de caneta esferográfica.¹⁶

Por outro lado, o tipo de caneta menos utilizado atualmente é a caneta-tinteiro. Elas foram criadas no passado em uma tentativa de melhorar o processo de escrita, que antes era realizada com penas de animais. Os modelos modernos possuem um reservatório recarregável de tinta, que contém um corante azul que se torna preto após lançamento no papel, devido à oxidação.¹⁷ Seu uso é mais comum em assinaturas de documentos importantes. Sua formulação é basicamente água (91 a 96%), 1-5% de corantes sintéticos e outros aditivos.¹¹ A caneta-tinteiro exige menos pressão sobre o papel para escrever, permitindo uma escrita estilizada e dotada de uma cor brilhante.

A caneta *rollerball* foi introduzida no mercado por volta do ano de 1970. Esse tipo de caneta usualmente contém tintas à base de água, sendo as características de seu traçado difíceis de distinguir em comparação com outras canetas que empregam tinta fluída, como, por exemplo, a caneta tinteiro.¹⁴ Ela caracteriza-se por empregar uma tinta aquosa dosada por uma esfera em sua extremidade. Uma característica comum nessas tintas é a presença de regiões com maior difusão de tintas, principalmente no final dos traçados no papel.

Outro tipo de caneta que vem ganhando importância no mercado é a caneta gel, principalmente por apresentar menor custo e ser “ambientalmente correta”, já que não contém em sua formulação compostos orgânicos voláteis nem resinas tóxicas. A caneta gel foi desenvolvida no Japão, em 1984, pela empresa Sakura Color Products Corporation.¹⁸ A principal característica que a diferencia com relação à caneta *rollerball* e à esferográfica é sua tinta de alta viscosidade denominada de gel.⁷ As tintas de caneta gel são constituídas basicamente de água, pigmentos (normalmente a ftalocianina de cobre em canetas azuis) assim como solventes, resinas e aditivos.^{18,19} Algumas formulações atuais empregam misturas de pigmento e corante como colorantes.

2.2 Análise Química de tintas de canetas

2.2.1 Técnicas instrumentais para análise de tintas

Os exames periciais tradicionais em Documentoscopia têm o foco de preservar o máximo possível a integridade dos documentos envolvidos. Consistem essencialmente na

inspeção das informações disponíveis (busca por inconsistências, anacronismos) e na análise dos manuscritos (forma, traçado etc.) e impressões existentes. Utilizam recursos de iluminação (exposição à luz visível, infravermelho, ultravioleta, fluorescência etc.) e de ampliação de imagens por intermédio de lupas, microscópios e comparadores espectrais de vídeo (VSCs®).

Exames químicos mais elaborados e que acarretam algum tipo de alteração documental, por mínima que seja, tornam-se necessários na medida em que é preciso responder a questionamentos técnico-científicos de maior complexidade e de suma importância à resolução de crimes, tais como a verificação da composição das tintas, a comparação da idade de elaboração de manuscritos e a determinação da sequência de lançamentos em cruzamentos de traços.

Quando um documento é recebido para perícia, inicialmente é feita uma inspeção dos dados e das informações contidas, com o intuito de revelar inconsistências ou anacronismos (incompatibilidades entre as informações apresentadas e a suposta data do documento) que indiquem inautenticidade. É verificado o aspecto geral do suporte, como rasuras, descolorações, manchas, cortes, etc., assim como a aparência (forma e características de traçado) dos lançamentos manuscritos presentes no documento.^{1,7}

As técnicas de análise química de tintas disponíveis na literatura podem ser classificadas em destrutivas e minimamente destrutivas. No caso das técnicas destrutivas, faz-se necessário que uma porção do suporte do documento seja removida juntamente com a tinta. Esse é o caso do método de extração direta seguida por espectrometria de massas apresentado neste trabalho. A experiência prática adquirida no laboratório de química forense do INC da Polícia Federal demonstra que medições mais robustas, precisas e consistentes com os padrões forenses são obtidas com essa técnica, quando comparadas a métodos que acarretam menor incursão nos documentos analisados.

As técnicas minimamente destrutivas utilizam tanto métodos espectroscópicos (ex: FTIR, Raman^{18,20,21}) como métodos de espectrometria de massas assistida por ionização ambiental diretamente sobre a superfície do documentos^{22,23}. Métodos minimamente destrutivos apresentam a importante vantagem de evitar perfurações e cortes nos documentos questionados. No entanto, métodos espectroscópicos raramente propiciam o poder de discriminação requerido na resolução de casos forenses. Por sua vez, métodos baseados em espectrometria de massas com ionização ambiental apresentam maior aplicabilidade em análises de cunho qualitativo.

Um dos primeiros métodos a ser utilizado na análise de tintas foi a cromatografia em camada delgada (TLC), que começou a ser utilizada na Documentoscopia no ano de 1962, e, partir dos anos 80, tornou-se bastante difundida.⁹ Seu uso é justificado por sua relativa simplicidade e eficácia na determinação qualitativa da composição de corantes presentes nas tintas.

No trabalho de Aginsky²⁴, datado de 1993, foram analisados em torno de 120 pigmentos e corantes sintéticos utilizados em diversos tipos de tintas por cromatografia em camada delgada. Foram utilizados como eluentes, sucessivamente, o clorofórmio e uma mistura de acetato de etila/ isopropanol/ água/ ácido acético 30:15:10:1. Após a eluição descrita, caso fossem observadas zonas coloridas na linha onde foi aplicada a amostra, a placa era submetida à eluição com ácido sulfúrico concentrado, para que assim os pigmentos orgânicos menos solúveis nos eluentes anteriores e as ftalocianinas fossem bem separados.

Em 2005, Jasuja²⁵ conduziu uma série de técnicas físicas minimamente destrutivas, seguidas de TLC, para análises de tinta de noventa e oito diferentes canetas gel, de treze cores distintas, coletadas na Índia, Europa e Estados Unidos. Foram realizados testes de solubilidade das tintas das canetas selecionadas, sendo possível observar que o metanol e a acetona foram os melhores solventes para 27 e 25 tintas, respectivamente. Foram testados treze diferentes tipos de solventes para eluição das placas. A melhor separação dos compostos foi obtida com a combinação de butanol/ etanol/ água/ ácido acético (60:20:20:0,5) e butanol/ etanol/ água (50:25:25). Seu estudo permitiu diferenciar mais de 35% das canetas analisadas.

Dentro do universo das técnicas cromatográficas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) apresenta maior sensibilidade e melhor resolução quando comparada à TLC. Em 1982, Lyter²⁶ examinou dez diferentes formulações de canetas esferográficas por HPLC com fase reversa. As resinas e os ácidos orgânicos não foram detectados nas concentrações correspondentes às encontradas nas tintas de canetas esferográficas, porém os corantes foram detectados e diferenciados por essa técnica, inclusive sendo possível determinar diferenças entre lotes de uma mesma formulação de caneta.

Em 1998, Whiting²⁷ utilizou a eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE) e a HPLC para analisar amostras de canetas esferográficas pretas. As duas técnicas apresentaram boas separações e diferenciações entre as tintas, todavia o autor pontua que a HPCE possui vantagens quanto ao custo da técnica, à quantidade de amostra necessária e ao volume de resíduo gerado.

Outro trabalho de Aginsky¹², publicado em 2006, utilizou duas técnicas cromatográficas em conjunto, a TLC e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), para comparar e identificar 9 diferentes tipos de canetas esferográficas vermelhas de 4 fabricantes distintos, produzidas entre 1998 a 2003. Foi observado que tintas produzidas pelo mesmo fabricante, mas de diferentes anos de fabricação, apresentaram formulações totalmente distintas com relação aos corantes utilizados. A análise por GC-MS permitiu identificar os solventes presentes nas tintas, e, em conjunto com os resultados de corantes obtidos por TLC, foi possível diferenciar lotes de fabricação de tintas de uma mesma marca. O autor cita o uso das duas técnicas em conjunto para resolução de dois casos reais.

Já em 2013, Halim e colaboradores²⁸ analisaram 13 tipos de canetas esferográficas pretas, de 3 grandes marcas disponíveis no mercado malaio, por meio da HPLC e aplicaram técnicas quimiométricas (PCA, do inglês *Principal Component Analysis* e HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) para avaliar a diferença entre suas composições químicas. A combinação dessa técnica com métodos quimiométricos possibilitou uma interpretação mais objetiva da análise de tintas de canetas com propósitos forenses.

Técnicas espectroscópicas como espectroscopia de infravermelho e de ultravioleta também são utilizadas para analisar a composição de tintas de canetas. Em 1992, Merrill²⁹ utilizou espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS) para analisar 184 amostras de tintas de canetas esferográficas. Foram analisadas tanto a tinta pura, presente dentro do cartucho das canetas, quanto a depositada em lançamentos gráficos. Com esses dados, foi criada uma biblioteca espectral. O método permitiu a triagem de diversos compostos presentes na formulação das tintas, como corantes, resinas e aditivos.

Wang e colaboradores³⁰, em 2001, aplicaram a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em 108 amostras de tintas de canetas esferográficas azuis, possibilitando determinar componentes da tinta. Além disso, foi desenvolvida uma classificação baseada em um sistema de reconhecimento de padrões, utilizando inteligência artificial. Essa tecnologia permite a identificação das tintas automaticamente e digitalmente, demonstrando assim ser um método rápido, preciso e minimamente destrutivo. Além disso, os autores realizaram estudos sobre o efeito do aquecimento durante um intervalo de tempo de 24 minutos. Foi observado que com o aumento do tempo e da temperatura de exposição, as bandas de absorvâncias em 1294, 1296, 1245 e 1055 cm^{-1} diminuíram, devido a mudanças na resina epóxi e volatilização dos solventes na tinta.

Em 2006, Kher e colaboradores³¹ testaram duas técnicas, a HPLC e a espectroscopia de infravermelho (IR), em conjunto com métodos quimiométricos, para diferenciar 48 canetas esferográficas azuis, seis de cada marca selecionada. A melhor resolução foi obtida por HPLC, diferenciando com sucesso 96,4% dos pares de caneta com o uso do PCA e 97,9% amostras de caneta por análise de discriminantes linear (LDA). Os resultados das análises LDA e PCA indicam que, apesar da técnica de IR não possibilitar a diferenciação de todas as classes de tinta de caneta, ela fornece uma discriminação razoável, que pode ser reforçada com a melhora na resolução dos espectros obtidos.

Causin e seus colaboradores³² (2008) estudaram as técnicas de espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis), TLC e DRIFTS para diferenciação de 21 canetas pretas e 12 canetas azuis esferográficas. Foi possível avaliar o potencial de discriminação de tintas que cada técnica oferece, além da possibilidade de integração de todas elas em busca de melhores resultados. Foi demonstrado que a espectroscopia DRIFTS é particularmente interessante como uma técnica complementar à TLC e UV-Vis, pois permite analisar as resinas e os solventes presentes na tinta.

De uma forma geral, pode-se dizer que o uso de técnicas cromatográficas em fase líquida é complexo, exigindo otimizações delicadas do sistema de eluição para obtenção de separações adequadas dos compostos presentes na tinta. Algumas técnicas alternativas vêm permitindo um grande avanço na análise forense de tintas de caneta, como é o caso da espectrometria de massas (MS). Essa técnica permite a elucidação de estruturas químicas e a identificação de colorantes, veículos e aditivos presentes nas tintas. Muitas publicações trazem o uso da MS, diferindo essencialmente quanto à fonte de ionização empregada:

- *spray* de solvente assistido ou não por potencial elétrico (*Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry* – DESI-MS e *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry* – EASI-MS);
- *laser* assistido ou não por *electrospray* (*Laser Desorption Mass Spectrometry* – LD-MS e *Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry* – LDI-MS);
- *laser* assistido por matriz e sob vácuo (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry* – MALDI-MS);
- gás hélio ou nitrogênio ionizado e aquecido (*Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry* – DART-MS);

- feixe pulsado de íons (*Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry* - TOF-SIMS);
- plasma indutivamente acoplado (*Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry* – ICP-MS).
- ionização por *paper spray* (*Paper Spray Ionization* - PSI)

A tabela 1 traz uma relação com ano de publicação, autor e técnica de alguns dos principais trabalhos sobre análise de tintas utilizando espectrometria de massas.

Em 1994, Pachuta e Staral³³ analisaram um total de 20 tintas de canetas utilizando TOF-SIMS. A maioria das canetas selecionadas era esferográficas, mas também foram analisadas canetas tinteiro, canetas de ponta de fibra e canetas tipo apagável. Os espectros foram obtidos diretamente de traços realizados no papel, sem destruição da amostra. Nos casos em que a espécie era muito grande para caber no instrumento, uma fibra do papel era removida e analisada. Também foi relatada a análise TOF-SIMS dos componentes de extratos obtidos de impressos separados por cromatografia em camada delgada. A técnica TOF-SIMS permite uma rápida diferenciação dos colorantes e fornece a identificação de alguns componentes.

Tabela 1 - Principais trabalhos sobre análise de tintas aplicadas à Ciência Forense utilizando espectrometria de massas.

Ano	Autores	Técnica
1994	Pachuta e Staral ³³	TOF-SIMS
2002	Ng, Lafontaine, Brazeau ⁵	ESI-MS
2006	Jones, Cody e McClelland ⁴	DART-MS
2007	Dunn e Allison ³⁴	LD-MS e MALDI-MS
2007	Weyermann e colaboradores ³⁵	LDI-MS
2007	Ifa e colaboradores ²³	DESI-MS
2009	Williams e colaboradores ³⁶	ESI-MS
2009	Coumbaros e colaboradores ³⁷	TOF-SIMS
2010	Lalli e colaboradores ²²	EASI-MS
2013	Jones e McClelland ³⁸	DART-MS
2015	Ferreira e colaboradores ³⁹	PSI-MS

Um método baseado no perfil de corantes obtido por ESI-MS foi desenvolvido em 2002 por Ng, Lafontaine e Brazeau⁵ para caracterização de 44 tintas de canetas esferográficas

azuis, 23 pretas e 10 vermelhas. Foram avaliados os efeitos do tipo de papel e do envelhecimento natural da tinta na ausência de luz. Os espectros de massa dessas tintas foram utilizados para estabelecer uma biblioteca de pesquisa, que, combinada com a análise ESI-MS, permite uma rápida triagem das tintas presentes em documentos questionados. O uso da fonte de ionização ESI vem trazendo bons resultados para análise de corantes, pois, por ser uma ionização branda, gera pouca fragmentação desses compostos presentes nas tintas de caneta.

Jones, Cody e McClelland⁴ reportaram um estudo preliminar sobre um método usando DART-MS para a diferenciação e identificação de tintas de canetas esferográficas e não-esferográficas. Foram utilizadas 43 canetas (13 canetas esferográficas pretas, 10 esferográficas azuis, 10 canetas fluidas pretas e 10 canetas pretas gel). Os autores salientaram que, importante cuidado deve ser tomado com relação ao posicionamento das amostras para análise, pois o espectro de massas obtido usando DART depende da posição da amostra e, com isso, podem ocorrer algumas variações de um espectro para o outro, obtidos para uma mesma amostra. Foram gerados dois espectros de massas para cada uma das 43 tintas analisadas. Os dados foram incluídos em uma biblioteca. Os íons produzidos pelas tintas fluidas e gel foram geralmente menos intensos que os das esferográficas. Espectrometria de massas usando amostragem DART se mostrou ser um método rápido e minimamente destrutivo para analisar tintas de documentos questionados.

Em 2007, Dunn e Allison³⁴ testaram LD-MS e MALDI-MS para a análise de corantes comumente presentes em tintas de canetas. Foram utilizadas duas canetas, uma esferográfica de cor preta e outra *rollerball* de cor azul. Quando não houve uma resposta positiva da presença de corantes nos espectros obtidos por LD-MS, foi utilizada a técnica MALDI-MS com o emprego de diferentes matrizes, com e sem o uso de aditivos. A utilização de aditivos permitiu que vários corantes poliônicos, não observados nos espectros por LD-MS, fossem detectados usando MALDI-MS.

Weyermann e colaboradores³⁵ verificaram a possibilidade de utilizar LDI-MS para suplementar a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) na análise de diferenciação de tintas de canetas esferográficas azuis. Nesse estudo, foram utilizadas 31 canetas esferográficas azuis. Uma análise inicial qualitativa, permitiu a diferenciação de 19 dessas canetas. Ao todo somente quatro pares de canetas não puderam ser discriminados em nenhum dos dois métodos. Com base nos resultados obtidos por HPTLC, oito classes de canetas puderam ser distinguidas, utilizando critérios qualitativos como tempo de retenção, teste de

mancha, etc. Os autores concluíram que a maior vantagem de LDI-MS sobre HPTLC é a mínima preparação e destruição da amostra, já que, no caso de LDI-MS, a análise é realizada diretamente sobre papel.

Em 2007, Ifa e colaboradores²³ aplicaram DESI-MS com obtenção de imagens bidimensionais para a análise de tintas de canetas. Os autores testaram DESI em diferentes canetas esferográficas azuis e amostras de documentos envelhecidos naturalmente. Também foram simuladas alterações de um documento com adições de escrita no texto, usando diferentes canetas. A influência de diferentes papéis também foi testada, de forma a verificar sua interferência sobre os espectros. O método não necessita de preparo de amostras, não é destrutivo, e permitiu análises confiáveis de documentos questionados.

Williams e colaboradores³⁶ utilizaram ESI-MS para a identificação de veículos e corantes de tinta de 18 tipos de canetas pretas (seis esferográficas, seis gel e seis *rollerball*). Foram testadas as influências do papel na análise e a eficácia de diversos solventes para extração da tinta. Os autores também realizaram um estudo preliminar sobre o efeito do envelhecimento das tintas sobre o método. Usando ESI-MS foi possível observar a presença de produtos de degradação nas tintas, demonstrando que essa técnica também pode ser utilizada em documentos envelhecidos. Os autores concluíram que o método provoca mínimos danos ao documento, pois são retiradas pequenas fibras de papel com tinta, não perceptíveis ao olho humano, e que ESI-MS forneceu bons resultados para a análise de tintas.

Em 2009, Coumbaros e colaboradores³⁷, aplicaram TOF-SIMS para identificar e diferenciar 13 tintas de canetas esferográficas de cor azul. Os espectros foram adquiridos nos modos positivo e negativo, mas o artigo apenas considerou os resultados no modo positivo, já que não se obteve dados adicionais no modo negativo. Os resultados demonstraram que as tintas de diferentes marcas são claramente distinguíveis com base em seus perfis espectrais. Em alguns casos, o perfil foi similar, mas diferiram nas intensidades dos sinais.

Lalli e colaboradores²² utilizaram EASI-MS para a identificação de tintas de canetas esferográficas azuis e vermelhas diretamente sobre papel. Foi possível detectar cinco corantes comumente usados em canetas esferográficas de cor azul e um em tintas de canetas vermelhas. Para verificar a capacidade da técnica em detectar a presença de mais uma camada de tinta em uma única linha, foram feitos testes com superposição de escritas. O spray EASI foi capaz de penetrar profundamente na linha de tinta dupla e revelou claramente o uso de duas camadas de tintas superpostas.

Um trabalho mais recente de Jones e McClelland³⁸ mostrou o uso de DART-MS para a identificação e discriminação de cento e sessenta e seis tintas de canetas de diferentes tipos (esferográficas, gel e fluidas). Mínimas alterações foram feitas no documento, já que a técnica é aplicada diretamente sobre o papel, sendo possível assim identificar corretamente todos os tipos de canetas testados. Os autores realizaram outros dois estudos: a interferência do papel sobre os espectros, onde foram testados 16 tipos diferentes de papéis, e os efeitos do envelhecimento natural sobre as tintas. O estudo com diferentes papéis demonstrou que a interferência do papel não é significativa para as esferográficas, mas tem significativa interferência para as tintas fluidas. Com relação ao envelhecimento da tinta, foi observado que durante os primeiros meses após o lançamento da tinta no papel, o espectro DART muda conforme há perda de componentes voláteis da tinta. Após um ano, essas mudanças são geralmente atenuadas.

Em 2015, Ferreira e colaboradores³⁹ realizaram um estudo de um conjunto distinto de canetas esferográficas por ionização por *paper spray* acoplada à espectrometria de massas (PSI-MS). Primeiramente foram traçados os perfis típicos das tintas de 9 marcas de canetas esferográficas e 3 canetas sem marca, recebidas de cortesia em eventos. Todas as canetas analisadas apresentaram o corante Basic Violet 3 (Violeta Cristal) e seus homólogos demetilados, e além desse corante, foram observados o Victoria Blue B (Basic Blue 26), Basic Blue 7, ftalocianina de níquel e compostos de aril-guanidinas. Para melhor discriminação entre as canetas, os autores utilizaram o conceito de intensidade relativa do íon, que corresponde a proporção de um determinado íon em relação a seus compostos correlacionados. Além disso, as mudanças na composição de lançamentos de tinta expostos à luz também foram monitoradas por PSI-MS, e alguns testes de caracterização de documentos com simulação de falsificação foram realizados. Os resultados dos experimentos indicam que a técnica é útil para o estudo do comportamento de degradação das tintas, a diferenciação de lançamentos em um documento, e, conseqüentemente, a caracterização de linhas sobrepostas em documentos falsificados.

2.2.2 Datação de tintas de canetas

No campo da análise forense de documentos questionados, a legitimidade de um lançamento de tinta é muitas vezes uma questão essencial, e a possibilidade de estimar a idade de um traço de tinta ajuda bastante a resolver esse problema.⁴⁰

Para se iniciar um estudo sobre a datação de tintas, é preciso levar em consideração os diversos processos de envelhecimento que ocorrem a partir do momento que uma tinta é depositada no papel. Daí em diante, tanto a composição química da tinta quanto a interface papel/tinta começam a sofrer mudanças. A evaporação de solvente(s) ocasiona o ressecamento da tinta. A polimerização progressiva da(s) resina(s) acarreta o endurecimento do lançamento gráfico e a sua fixação no substrato (papel). A degradação dos colorantes resulta em uma descoloração gradual da tinta no documento.⁴¹

Além da complexidade desses processos que ocorrem após o lançamento da tinta no papel, existem outros fatores que dificultam a datação de tintas. Dentre eles estão a variedade de tintas de escrever disponíveis no mercado, a influência de fatores ambientais como umidade, temperatura e exposição à luz, e a necessidade frequente de amostras-padrão de comparação. Particularmente, o armazenamento sob condições drasticamente diferentes de exposição à luz pode causar alterações significativas nas propriedades ópticas (cor, luminescência, etc.) das tintas, assim como diferenças em composição química.^{3,42}

Anteriormente ao surgimento das canetas esferográficas, três procedimentos principais eram empregados no sentido de determinar a idade relativa de tintas de canetas-tinteiro: medir a mudança de cor, monitorar a migração de íons cloreto e sulfato e realizar a extração da tinta com um solvente. Mitchell foi um dos pioneiros nesse trabalho com canetas-tinteiro, lançando um livro sobre o assunto em 1907.^{43,6}

Até a década de 1960, os métodos desenvolvidos para análise de tintas tinham o intuito apenas de comparar amostras de documentos questionados com lançamentos de tinta conhecidos. A datação de tintas era limitada ao conhecimento das modificações nas formulações das tintas.

Um dos primeiros trabalhos de datação de tintas foi realizado no início dos anos 60 por Werner Hofmann, do Laboratório do *Zurich Cantonal Police*, na Suíça. Ele utilizou uma coleção de padrões de referência de tintas e, a partir de testes minimamente destrutivos e técnicas analíticas como cromatografia em papel, TLC e espectrofotometria, identificou corantes e os comparou com tintas de documentos questionados. Um dos maiores problemas é que não se conseguiam amostras-padrão de todas as tintas disponíveis no mercado.^{14,7}

A partir de 1968, foi estabelecido por Richard Brunelle¹⁷, do *Internal Revenue Service*, uma biblioteca de padrões de tinta. Todos os fabricantes de canetas dos Estados Unidos

forneciam amostras de suas diferentes formulações de tinta, e assim foi formado um banco de dados contendo amostras de tinta com data de produção e fabricantes conhecidos.

Na década de 1970, vários fabricantes, voluntariamente, começaram a adicionar marcadores químicos à base de terras raras e branqueadores óticos na formulação de suas tintas. Esse programa foi promovido pela agência ATF (*Bureau of Alcohol, Tobacco and Fire*), e possibilitava identificar a origem e o ano de produção de uma determinada tinta, já que os marcadores eram modificados anualmente. Várias agências federais americanas utilizaram essas informações para detecção de documentos fraudulentos. Esse programa foi descontinuado em junho de 1994, pois havia discordância por parte dos fabricantes, pois esses marcadores encareciam o processo de produção das tintas.^{7, 17}

Em 1987, Cantu⁴⁴ desenvolveu um procedimento para estimar a idade de lançamentos de tintas de caneta esferográfica baseado na relação entre a idade da tinta com sua taxa de extração no papel. A ideia era basicamente que, quanto mais antigo fosse o lançamento, mais lento seria o processo de extração.

Desde os primeiros estudos sobre datação de tintas, foi assumido que as tintas no interior do tubo das canetas poderiam ser consideradas um “sistema fechado”, não ocorrendo processos de envelhecimento no seu interior. Já no caso de estarem em contato com papel, considera-se um “sistema aberto”, estando expostas às condições ambientais.¹³

Alguns autores demonstraram que não há indícios de envelhecimento em termos da composição da tinta dentro do cartucho de uma caneta esferográfica usada regularmente. Entretanto, foi detectado um envelhecimento considerável na ponta de canetas que não haviam sido utilizadas durante alguns anos, tanto em termos de evaporação de solvente quanto de degradação de corantes.^{45,46}

Existem três abordagens principais nos estudos de datação de tintas. A primeira pode ser considerada a abordagem mais antiga e mais clássica e é conhecida como abordagem estática. Ela é baseada na análise da presença de componentes estáveis da tinta que não variem consideravelmente com o tempo. Uma das desvantagens dessa forma de avaliação é a impossibilidade de se afirmar que duas tintas são iguais quando apresentam perfis estáticos idênticos.^{7,47}

Ezcurra¹³ descreve o que se pode determinar utilizando esse perfil estático:

- Diferenças entre a composição de duas tintas comparando os perfis estáticos;

- A exclusão ou identificação da origem de uma tinta quando comparada aos perfis de padrões reunidos em uma biblioteca de banco de dados de tintas.
- Detecção de anacronismos através de um banco de dados que contenha informações de várias tintas, incluindo seus componentes, seus marcadores e o ano de fabricação.

A segunda abordagem é chamada de dinâmica absoluta. Ela é baseada na avaliação de certos componentes da tinta que mudam ao longo do tempo e como eles são relacionados com uma suposta data de produção do documento. Existem diversos fatores que podem acelerar ou retardar o envelhecimento de uma tinta. Esses fatores são: a composição inicial da tinta dentro do cartucho, as propriedades químicas e físicas do substrato e as condições de armazenamento. Normalmente não há informações sobre esses fatores, tornando assim a tarefa da datação absoluta de um lançamento de tinta muito árdua.^{47,48}

A terceira e última abordagem é conhecida como dinâmica relativa. Difere um pouco da segunda, porque nessa abordagem busca-se determinar a sequência cronológica de lançamentos de tinta em um suporte. Para isso, é necessário que as tintas tenham a mesma formulação, mesma forma de armazenamento e que estejam em um mesmo suporte. A única diferença entre elas seria o momento em que foram colocadas no papel.⁴⁷

Apesar de todos os métodos desenvolvidos e testados, o envelhecimento da tinta ainda é um fenômeno que não é totalmente compreendido, sendo a datação absoluta de um lançamento de tinta um objetivo ainda a ser atingido pelos laboratórios forenses.⁴⁰

2.2.3 Métodos para datação de tintas de canetas esferográficas

2.2.3.1 Datação de tintas por intermédio de compostos voláteis

Conforme reportado por vários autores, a perda de componentes voláteis das tintas de caneta pode ser usada para referenciar a idade de um dado lançamento gráfico. Um dos solventes mais utilizados para o estudo de datação de tintas de caneta é o 2-fenoxietanol, por estar presente na maioria das formulações das canetas esferográficas. Em 2004, LaPorte e colaboradores⁴⁹ utilizaram GC-MS para identificar o 2-fenoxietanol em canetas esferográficas. Das 633 canetas analisadas, foi identificado que 85% das canetas pretas e 83% das canetas azuis continham 2-fenoxietanol em sua formulação.

Nesse mesmo ano, Lociciro e colaboradores⁵⁰ monitoraram, com o uso de GC-MS, a evaporação desse solvente em função do tempo, com o intuito de testar se esse método poderia ser utilizado para datação de documentos questionados. Foram feitos estudos de reprodutibilidade e repetitividade do sistema de GC-MS. Segundo os autores, houve uma perda de 98% de solvente nos primeiros dois minutos, e os resultados indicaram que não seria possível datar amostras de tinta de canetas esferográficas com o método proposto.

Em 2007, Weyermann e seus colaboradores⁵¹ desenvolveram um estudo sobre o processo de secagem de tintas de canetas esferográficas lançadas em papel. Foram levados em consideração tanto o fenômeno da evaporação quanto a difusão de solventes no papel. O método experimental envolveu extração e análise por GC-MS. Das 31 canetas esferográficas azuis que foram analisadas, 94% continham 2-fenoxietanol e em 61% foi encontrado o 2-(2-fenoxietoxi)etanol em sua composição. Foram observadas perdas de mais de 75% dos solventes em alguns segundos, mas a diminuição da concentração de dipropilenoglicol, 2-fenoxietanol e 2-(2-fenoxietoxi)etanol estabilizou consideravelmente após duas semanas. Foi concluído que para a análise quantitativa dos solventes com o intuito de datação, é necessário retirar do papel não só o lançamento de tinta, mas alguns milímetros adjacentes, pois alguns solventes se difundem pelo papel, aumentando a taxa e a superfície de evaporação.

Berger-Karin⁵² e colaboradores, em 2008, utilizaram dois equipamentos distintos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), com diferentes sistemas de dessorção térmica, para avaliar a evaporação de compostos voláteis causada pelo envelhecimento de tintas de canetas esferográficas. Inicialmente, foi realizada uma triagem desses compostos, no intuito de criar um critério de diferenciação entre as tintas. O procedimento de estimativa de idade das tintas foi baseado na variação dos teores de 2-fenoxietanol, 2-(2-fenoxietoxi)etanol, éster de ácido ftálico e anidrido ftálico. Além disso, foi desenvolvido um estudo comparativo entre o envelhecimento natural e artificial das tintas a partir da diminuição da concentração de 2-fenoxietanol. Os resultados indicam que o estudo da variação de vários constituintes da tinta pode fornecer informações adicionais sobre o envelhecimento da mesma.

No mesmo ano, Bügler e colaboradores⁵³ também utilizaram a técnica de GC-MS com dessorção térmica para avaliar o envelhecimento de 85 diferentes tipos de tinta de caneta com idades entre uma semana a um ano e meio. Os resultados obtidos pelo autor indicam que o comportamento do envelhecimento de algumas tintas de caneta esferográfica depende do tipo

de resina e da composição do papel. Algumas tintas apresentaram um decréscimo significativo na concentração de solventes até a idade de alguns meses. Entretanto, em outras tintas, o parâmetro idade-dependente proposto pelos autores diminuiu muito rapidamente (em alguns dias) até valores praticamente constantes, dificultando assim sua aplicabilidade prática.

Em 2015, Koenig, Magnolon e Weyermann⁵⁴ estudaram por GC-MS a diminuição ao longo do tempo da concentração de solventes presentes em lançamentos gráficos provenientes de canetas esferográficas. Quatro parâmetros de envelhecimento foram comparados: a quantidade de 2-fenoxietanol em um lançamento; a taxa de perda de solvente; a área relativa do pico do solvente no espectro de massas, normalizada em relação a compostos estáveis presentes na formulação da tinta; e uma versão modificada da taxa de perda de solvente, calculada a partir da área relativa desse pico. Lançamentos gráficos de três esferográficas foram estudados por um período de um ano, por meio de GC-MS. Foram feitas análises de amostras submetidas ao envelhecimento natural e artificial. Alguns critérios de validação foram avaliados, como sensibilidade, repetitividade e reprodutibilidade, além de influência de alguns fatores no envelhecimento, como condições de armazenamento, composição das tintas e pressão ao escrever. Os resultados obtidos indicaram que a composição das tintas foi influenciada por todos os fatores testados. O parâmetro de envelhecimento que apresentou melhores resultados foi o cálculo da área relativa do pico do solvente 2-fenoxietanol.

Nesse mesmo ano, Koenig e colaboradores⁵⁵ avaliaram a implementação do método proposto por Bügler, Buchner e Dallmayer⁵³ em outro laboratório que continha o mesmo instrumento ora utilizado, localizado em Lausanne. Após otimização e validação do método, o comportamento do envelhecimento de tintas foi estudado e comparado em dois laboratórios diferentes (em Wiesbaden e em Lausanne). Também foi avaliada a repetitividade das curvas de envelhecimento de uma tinta em diferentes condições de armazenagem. Foi observado que a curva obtida no laboratório de Wiesbaden estabilizou após 30 dias, enquanto que a curva das amostras analisadas em Lausanne estabilizou depois de 100 dias. Essa diferença foi explicada principalmente pelas distintas condições de armazenagem, já que diferentes papéis e diferentes cartuchos de tinta de caneta não interferiram significativamente nos resultados. Esse estudo reforça a ideia de que curvas de envelhecimento devem ser comparadas para amostras da mesma tinta e armazenadas nas mesmas condições.

Outro trabalho publicado em 2015, elaborado por Róman e colaboradores⁵⁶, utilizou a microextração em fase sólida no modo *multiple headspace* (MHS-SPME) acoplada a GC-MS

para monitorar a evaporação de componentes voláteis da tinta de quatro diferentes canetas BIC® lançadas em documentos, e assim estimar sua idade absoluta. O parâmetro β em função do tempo foi determinado no intuito de estabelecer uma curva de envelhecimento para os solventes voláteis hexilenoglicol, benzaldeído, fenol, álcool benzílico e 2-fenoxietanol. Esse parâmetro diz respeito à fração restante do analito no sistema após sucessivas extrações. Os estudos preliminares desse método permitiram a discriminação entre tintas frescas (lançamentos entre alguns meses a dois anos) e antigas (lançamentos há mais de dois anos). Forneceram uma data aproximada do lançamento de tinta, com um erro relativo médio de 21%, incluindo tintas de formulações desconhecidas. Segundo os autores, a fim de que o método proposto possa ser utilizado de modo mais efetivo, fazem-se necessários estudos adicionais sobre a relação do parâmetro β com a idade da tinta, e a aplicabilidade do método a tintas de diferentes marcas.

2.2.3.2 Datação de tintas por intermédio de corantes

Colorantes são sempre um dos focos da análise de tintas devido a suas propriedades de absorção e emissão, que podem ser determinadas por vários métodos analíticos empregando esquemas de detecção óptica.⁵⁷ Alguns corantes presentes nas formulações das tintas de canetas sofrem degradação com o tempo, fato esse muito considerado quando se deseja iniciar um estudo sobre datação de documentos.

A diferença entre o perfil de degradação de corantes de tintas frescas e envelhecidas natural ou artificialmente, observada a partir de informações obtidas por espectros de massa, já foi relatada por alguns autores.^{58,42,40} Observa-se, com o passar do tempo, para alguns corantes presentes na formulação de canetas, a diminuição do pico base característico do corante e o aumento dos picos referentes aos seus produtos de degradação. Em geral, a exposição à luz e ao ar ocasiona fotodegradação oxidativa em corantes contendo grupos metila e etila, e, como resultado, a distribuição desses íons homólogos é modificada.⁵

A degradação do Violeta Cristal, corante catiônico bastante presente em tintas de canetas, é caracterizada pela progressiva demetilação oxidativa, com a perda do grupo $-\text{CH}_3$, que é substituído por um átomo de hidrogênio, ocorrendo assim a diminuição de massa de 14 Da. A Figura 5 traz a estrutura do Violeta Cristal, que apresenta a relação massa/carga (m/z) igual a 372 Th, e dos seus produtos de degradação Violeta de metila (m/z 358 Th) e Tetrametil para-rosanilina (m/z 344 Th). Para esse composto, seis produtos de degradação podem ser

formados, pois possui seis grupos metila ligados aos nitrogênios da molécula, que podem ser substituídos por átomos de H.

Um comportamento de degradação similar ao do Violeta Cristal é verificado para o corante Victoria Blue B (Basic Blue 26). Sua sequência de degradação é resultado de demetilações seguidas de substituições por hidrogênio. Dessa forma pode ser formada a sequência de degradações sucessivas correspondentes a m/z 470, 456 e 442 Th. No caso desse composto, quatro produtos de degradação podem ser formados, pois possui quatro grupos metila ligados aos nitrogênios da molécula, que podem ser substituídos por átomos de H.

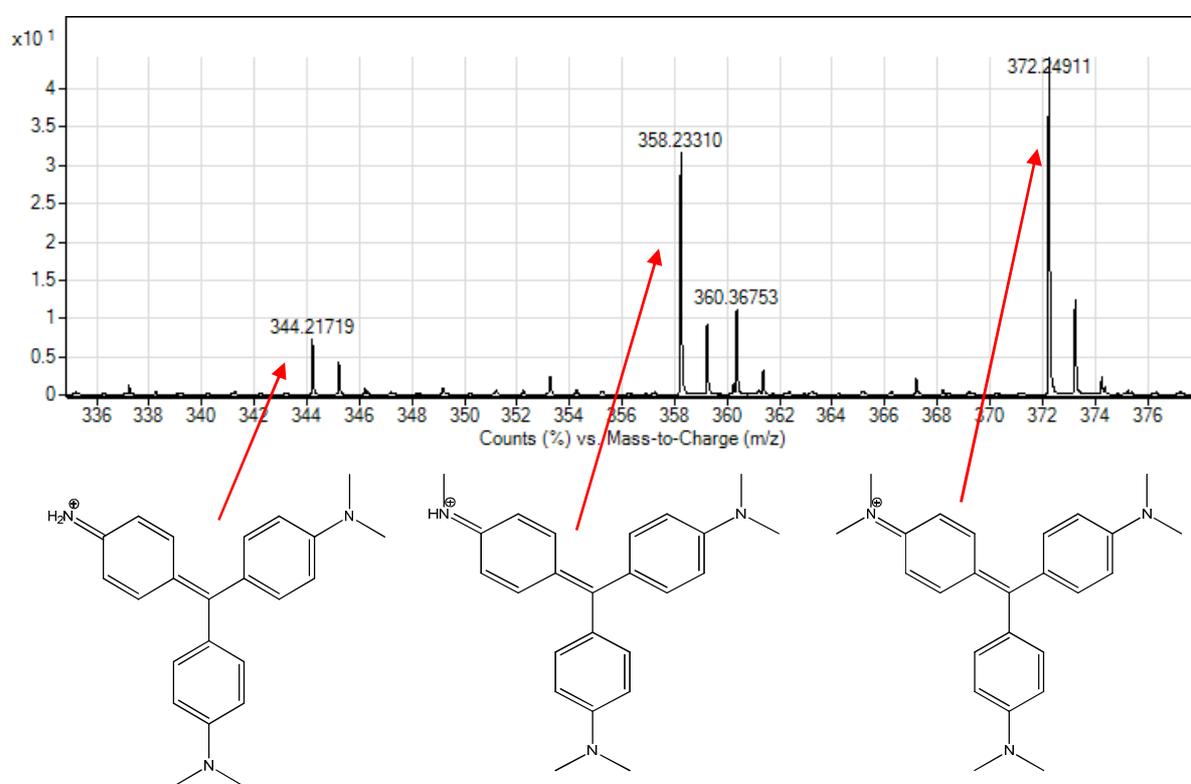


Figura 5 - Espectro de massa obtido experimentalmente e estruturas químicas do corante Violeta Cristal e de alguns de seus produtos de degradação

Já para o corante Basic Blue 7 (Victoria Pure Blue BO), é observada a perda sucessiva de etilas da função amina. Portanto, os produtos de degradação são identificados por íons cuja diferença de relação massa/carga é de 28 Da, conforme mostrado na

Figura 6. Para esse composto, cinco produtos de degradação são possíveis, pois possui cinco grupos etila ligados aos nitrogênios da molécula, que podem ser substituídos por átomos de H.

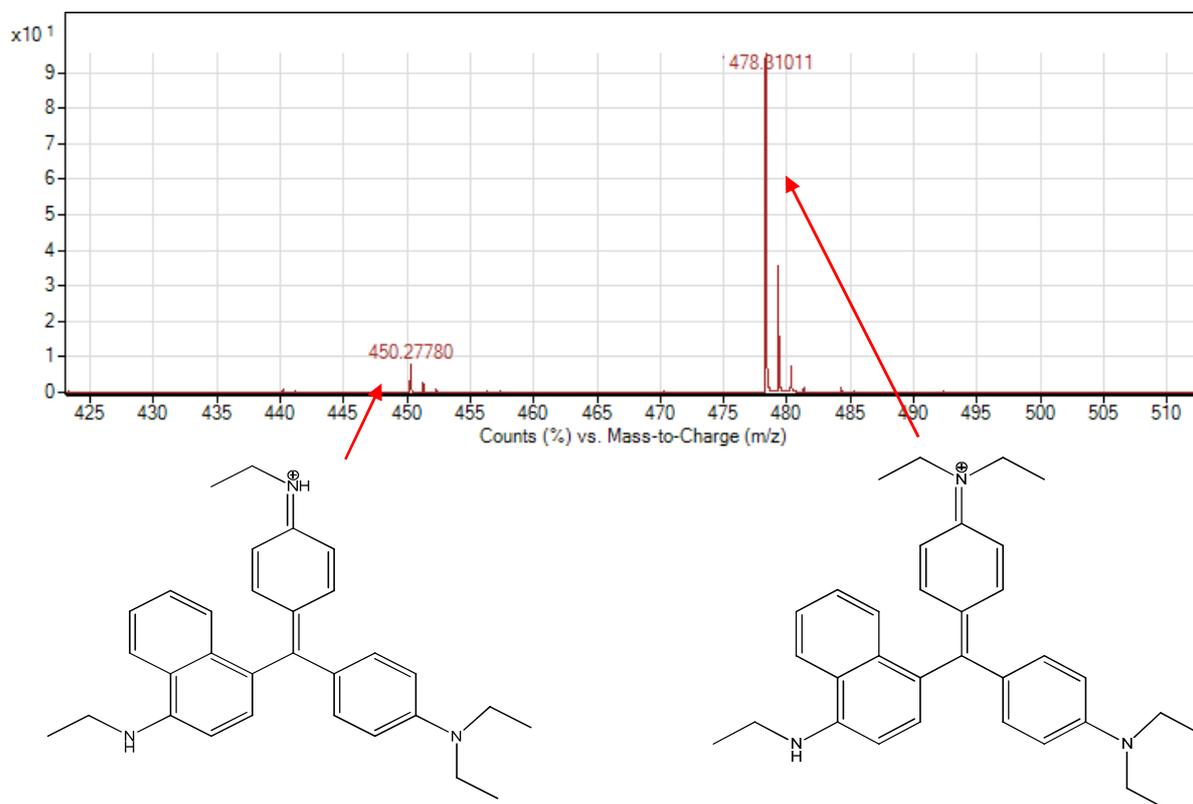
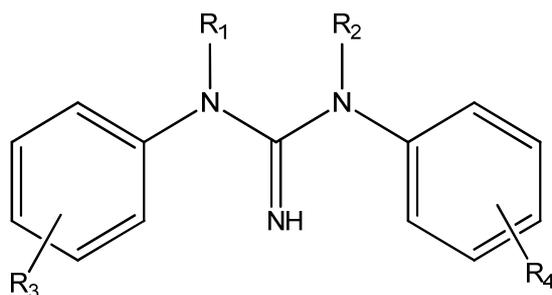


Figura 6 - Espectro de massa obtido experimentalmente e estruturas químicas do corante Basic Blue B e um de seus produtos de degradação

As aril guanidinas são descritas por alguns autores^{5, 37,39} como um aditivo utilizado para formar sais com corantes ácidos ou para aumentar o pH da tinta. Já Lalli *et al.*²² cita a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina protonada (m/z 268) como um corante muito presente em tintas de canetas esferográficas azuis. O fato é que se observa em espectros de massa de várias tintas de caneta esferográfica uma sequência de íons, a partir de m/z 268, com sucessivas perdas de $-CH_3$, indicando a presença de uma mistura de aril guanidinas. A Figura 7 traz as possíveis estruturas e um espectro de massas característico da presença dessas aril guanidinas.



- (1) $R_1, R_2, R_3, R_4 = \text{CH}_3$, $[\text{M}-\text{H}]^+ = m/z$ 268
- (2) $R_1 = \text{H}, R_2, R_3, R_4 = \text{CH}_3$, $[\text{M}-\text{H}]^+ = m/z$ 254
- (3) R_1 e $R_2 = \text{H}, R_3, R_4 = \text{CH}_3$, $[\text{M}-\text{H}]^+ = m/z$ 240
- (4) $R_1, R_2, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{CH}_3$, $[\text{M}-\text{H}]^+ = m/z$ 226
- (5) $R_1, R_2, R_3, R_4 = \text{H}$, $[\text{M}-\text{H}]^+ = m/z$ 212

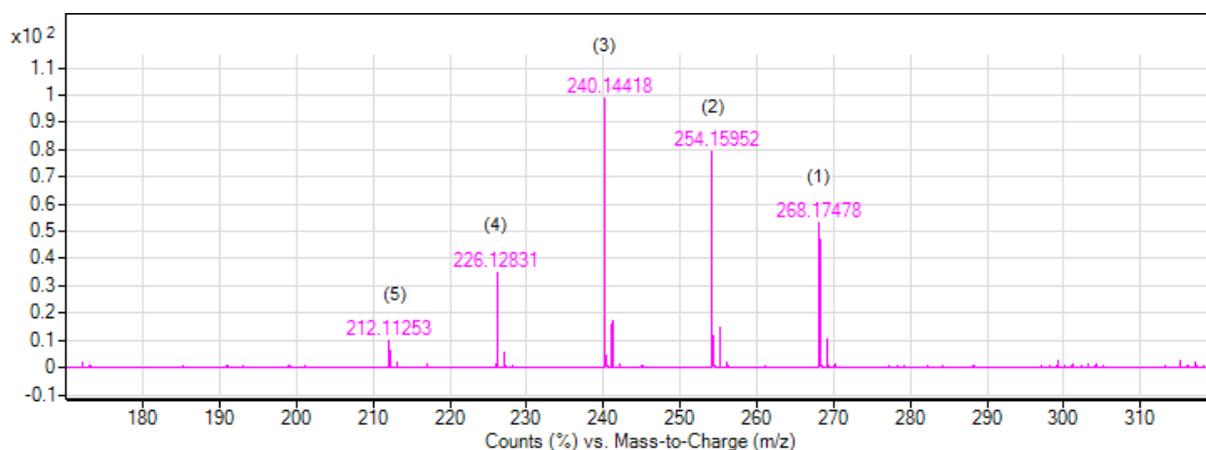


Figura 7 - Estruturas das guanidinas e espectro de massas obtido experimentalmente contendo os possíveis picos referentes aos produtos de degradação

Muito presente na composição de tintas de canetas vermelhas, os corantes Basic Violet 10 (Rodamina B) e Basic Red 1 (Rodamina 6G) também podem apresentar uma cascata de produtos de degradação típica, com íons m/z 443, 415 e 387 com perdas de grupos etila e substituição por hidrogênio. A diferenciação dos dois compostos deve ser realizada por experimentos MS/MS.⁵

Em 2001, Andrasko⁵⁹ desenvolveu um método para análise de tintas por HPLC para estudar o envelhecimento de lançamentos de tintas não expostos à luz. Foram obtidos cromatogramas para a tinta armazenada no escuro, à temperatura ambiente e durante diferentes períodos: um dia, nove meses, treze meses e vinte e dois meses. Foi possível observar que, com o passar do tempo, a concentração relativa do corante Violeta Cristal diminui, enquanto que a dos seus produtos de degradação aumentou. Dentre as limitações do método, está a não

aplicabilidade em casos de documentos que foram expostos à luz ou calor, em combinação com alta umidade, pois, nesses casos, há mudanças na composição da tinta, que se sobrepõem ao efeito de envelhecimento natural das tintas.

Em 2002, Grim, Siegel e Allison⁴⁵ utilizaram LD-MS para analisar lançamentos de tintas de canetas azuis e pretas, que continham Violeta Cristal, envelhecidos natural e artificialmente (UV). Fatores como a distância entre a lâmpada UV e a amostra, assim como a idade da fonte de luz na lâmpada foram avaliados para a geração de curva de envelhecimento do Violeta Cristal. Com esses experimentos, os autores mostraram que irradiando luz UV por 6,25 horas em um lançamento de tinta preta BIC® foi produzida semelhante degradação à que ocorre naturalmente em um período de trinta e oito meses. Além disso, os autores concluíram que o tipo do papel influencia tanto no envelhecimento natural como no artificial. A partir de quinze anos de idade, os lançamentos com Violeta Cristal apresentaram espectros muito similares. A interpretação dada no artigo é que o Violeta Cristal em documentos com mais de quinze anos continua a formar produtos de degradação, porém mais lentamente que documentos criados mais recentemente.

Nesse mesmo ano, Grim e colaboradores⁶⁰ estudaram o perfil da degradação de corantes em tintas de uma coleção de canetas com até vinte anos de idade para verificar se havia envelhecimento da tinta dentro dos cartuchos das canetas. Foi empregada a técnica de LD-MS para análise desses corantes. Os autores explicaram que, na maioria das canetas, os corantes são estáveis dentro do cartucho e não foi observada degradação. Contudo, em algumas canetas, uma degradação substancial ocorreu em uma taxa até maior que a observada em lançamentos da tinta no papel. Não foram descritas em quais canetas foi observado esse fenômeno. Foi evidenciado que a estabilidade dos corantes em uma tinta depende diretamente de sua formulação.

Em 2004, Hofer⁶¹ investigou a possibilidade de lançamentos gráficos de um documento questionado terem sido produzidos a poucas horas do momento do recebimento e terem sido datados como se tivessem sido produzidos três anos antes. Para isso, o autor fez uso de um dispositivo de detecção eletrostática para examinar elementos latentes, e da técnica de HPLC para quantificar os corantes presentes na tinta esferográfica utilizada, bem como seus produtos de degradação. Foram identificados dois tipos de canetas a partir dos perfis de corantes encontrados. Após essa triagem inicial, o documento foi armazenado em condições ambientais controladas por cinquenta dias e então as análises de tinta foram refeitas e comparadas. Segundo

o autor, se o documento tivesse sido produzido anos antes, um envelhecimento adicional de cinquenta dias não traria influência significativa na curva de envelhecimento. Esse fato foi observado ao comparar as curvas das tintas do lançamento datado do ano 2000 com essa mesma tinta envelhecida por cinquenta dias. A HPLC se mostrou uma boa técnica para executar a datação relativa de documentos. Para algumas tintas, dependendo da composição, o autor afirma que é possível até fornecer uma estimativa de sua idade absoluta.

Em 2004, Samanidou e colaboradores⁶² desenvolveram um método para determinação e estudo do envelhecimento de corantes de tinta de canetas esferográficas azuis e pretas. A técnica utilizada foi HPLC com detector de arranjo de diodos e um método de eluição por gradiente. Foram avaliadas seis canetas esferográficas em um período de vinte semanas. Os corantes encontrados foram o Violeta Cristal e o Victoria Blue B. A concentração de Violeta Cristal foi mensurada durante essas vinte semanas e foi observada, como esperado, uma queda na sua concentração. Os autores consideraram o estudo como uma primeira abordagem de datação, sendo necessário um modelo matemático e uma maior amostragem, com maior período de tempo de envelhecimento, para o fornecimento de uma ferramenta útil de datação de tintas em documentos.

Em 2005, Siegel, Allison, Mohr e Dunn⁶³ analisaram as alterações na composição de tintas de canetas azuis e pretas, submetidas a processos de envelhecimento artificial e natural usando LDI-MS. Na avaliação do envelhecimento natural, foram utilizados documentos guardados no Departamento de Química da Universidade de Michigan com datas de escrita conhecidas, porém sem o conhecimento da idade das canetas, quando foram feitos os lançamentos. Os resultados foram coerentes, pois o documento mais velho dos três que foram selecionados para o estudo apresentou maior perda de grupos metila dos corantes, indicando maior degradação. Os autores também avaliaram amostras de canetas esferográficas de cor azul submetidas a envelhecimento artificial utilizando luz UV. Usando LDI-MS foi possível observar o aparecimento de produtos de degradação do corante Violeta Cristal. Após 12h de exposição observaram-se mudanças significativas na composição da tinta e, decorridas 24h, não foram verificadas grandes mudanças no espectro, apenas a diminuição do pico correspondente ao Violeta Cristal. Os autores também avaliaram o envelhecimento da tinta no interior do cartucho e concluíram que a tinta no meio do cartucho sofre envelhecimento de forma bem mais lenta que a tinta próxima às duas extremidades da caneta, ou seja, que sofreu maior contato com o oxigênio atmosférico.

Em 2006, Weyermann e colaboradores⁴⁰ caracterizaram o processo de degradação de dois corantes tipicamente encontrados em tintas de canetas esferográficas (Violeta Cristal e Violeta de etila – m/z 456 Th) utilizando LDI-MS e MALDI-MS. Os autores também realizaram testes com amostras de tinta expostas a dois tipos de iluminação, a natural e a artificial. Utilizando as duas técnicas de espectrometria de massas, foi possível observar os produtos de degradação formados na tinta envelhecida. Os autores concluíram que ambas as técnicas podem ser utilizadas para análise de tintas de canetas esferográficas, mesmo quando estas são submetidas a processos de envelhecimento.

Em 2008, Weyermann e Spengler⁴¹ avaliaram o potencial de uso do envelhecimento artificial quando comparado ao envelhecimento natural de tintas de canetas esferográficas, com o intuito de avaliar os pontos positivos e as limitações desses modelos de datação de documentos questionados. Foram estudados dois parâmetros de datação: a degradação de corantes, com o uso da técnica de LDI-TOF-MS; e a perda de solventes, avaliada por GC-MS. Os autores concluíram que as curvas obtidas para o envelhecimento artificial de corantes não são completamente correspondentes a todas as curvas do envelhecimento natural. Por essa razão, indicam não ser adequada a utilização de envelhecimento artificial em técnicas de datação de lançamentos gráficos sem o conhecimento prévio da composição inicial da tinta, das características do substrato e das condições de armazenamento do documento.

Lalli e colaboradores²² (2010) realizaram um estudo envolvendo a caracterização de amostras envelhecidas naturalmente e submetidas ao processo de envelhecimento artificial, monitorando-se o corante Violeta Cristal. Lançamentos de uma única tinta foram expostos à luz incandescente por variados períodos de tempo. Utilizando EASI-MS, foi possível visualizar os produtos de degradação formados e obter uma correlação cinética linear entre as intensidades relativas e o tempo de envelhecimento artificial. Os autores afirmaram que essa sequência de produtos de degradação funciona como um “relógio químico” para o envelhecimento de tintas, particularmente quando idades relativas de documentos são comparadas. A aplicação da técnica EASI-MS a documentos reais com data de confecção conhecida indicou que uma escala de tempo da ordem de 10 anos estaria envolvida no processo de degradação de alguns corantes utilizados comercialmente.

Espectrometria de Massas

3 Espectrometria de massas

Os princípios fundamentais que regem a espectrometria de massas datam do fim dos anos 1890, quando J. J. Thompson, ganhador do prêmio Nobel em 1906 com um trabalho relacionado a espectrometria de massas, determinou a razão massa/carga do elétron e , Wilhelm Wien, também ganhador do prêmio Nobel em 1911, desenvolveu uma pesquisa sobre deflexão magnética de raios anódicos e determinou que eles eram carregados positivamente.⁶⁴ Em 1918, foi desenvolvido por Dempster o primeiro espectrômetro de massas utilizando como analisador de massas um setor magnético no formato de 180° , em direção ao foco, e a fonte de ionização por elétrons.⁶⁵

Recentemente, diversos estudos sobre análise de tintas por meio da técnica de espectrometria de massas (EM) têm sido realizados, principalmente utilizando uma abordagem hifenada.^{16, 39, 47, 54, 66} A espectrometria de massas tem a vantagem de ser muito sensível e possui a capacidade de produzir espectros muito característicos, oferecendo assim um elevado nível de discriminação entre compostos.³⁷

O espectrômetro de massas é constituído basicamente por cinco componentes⁶⁴ (Figura 8):

- 1) Unidade de introdução da amostra: responsável por introduzir um fluxo das moléculas de interesse na fonte de ionização, levando assim a amostra do ambiente laboratorial, com pressão atmosférica, para uma pressão, em alguns casos, menor no espectrômetro de massas. Um requisito essencial é a manutenção da integridade das moléculas do(s) analito(s) de interesse durante essa transferência. Exemplos de formas de introdução da amostra: por sonda direta e via eluente cromatográfico.
- 2) Fonte de ionização: local onde ocorre a conversão das moléculas neutras da amostra em íons na fase gasosa. A ionização é necessária, pois o movimento e o direcionamento de íons são muito mais fáceis de se manipular experimentalmente com a utilização de forças elétricas e magnéticas. As fontes de ionização mais comuns são: ionização por elétrons (EI), ionização química (CI), ionização por *electrospray* (ESI), ionização por dessorção- *electrospray* (DESI), ionização por íons secundários (SIMS), ionização por dessorção a laser (LDI), ionização por dessorção a laser assistido por matriz (MALDI), ionização química à pressão atmosférica (APCI).

- 3) Analisador de massa: região onde os íons são separados de acordo com suas razões massa/carga (m/z). Campos elétricos e magnéticos são utilizados em analisadores de massa para controlar o movimento dos íons.⁶⁷ Entre os analisadores de massas mais utilizados estão quadrupolar, triploquadrupolar, tempo de voo (TOF), *orbitrap* e o *ion trap*.
- 4) Detector: responsável por contar os íons que emergem do analisador de massas e medir suas abundâncias. Os multiplicadores de elétrons, os copos de Faraday e os fotomultiplicadores são exemplos dos detectores mais comuns na espectrometria de massas.
- 5) Processador de sinais: normalmente, o processamento de sinais é realizado por um computador, que possibilita mostrar, armazenar e processar os espectros de massas obtidos.

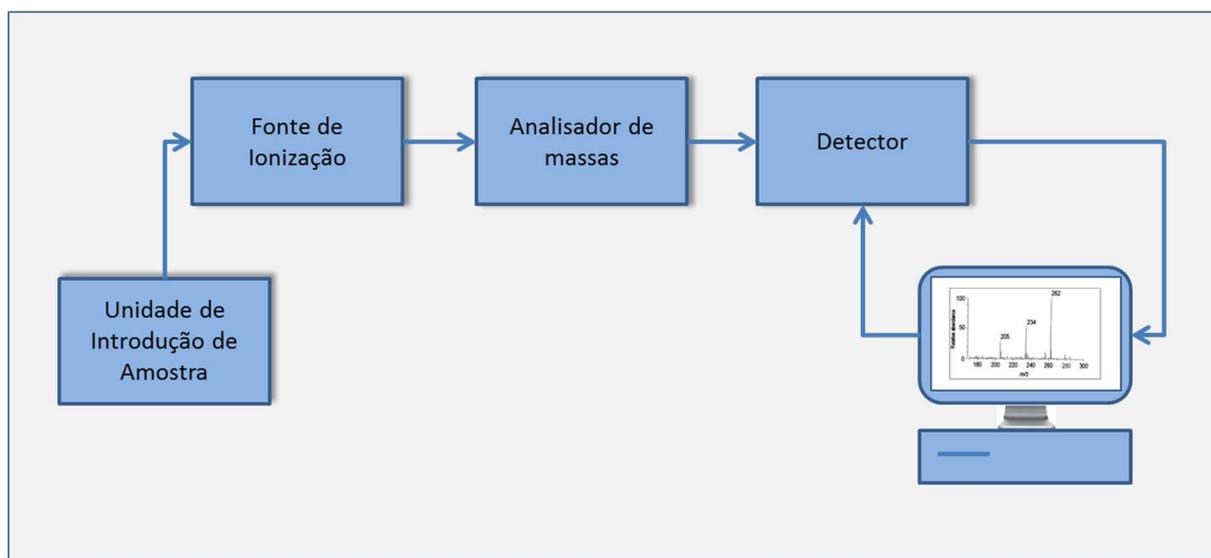


Figura 8 - Componentes básicos de um espectrômetro de massas

As etapas que ocorrem nos componentes 2 e 3 são, normalmente, realizadas sob pressão reduzida, permitindo assim que os íons se movam livremente sem colidir ou interagir com outras espécies. A colisão ou a interação com outras espécies pode levar à fragmentação do íon molecular e à formação de espécies diferentes através de reações molécula-íon, causando diminuição da sensibilidade e da resolução.⁶⁷

3.1 Fonte de ionização por *electrospray* (ESI)

Apesar do conceito de *electrospray* ter sido proposto inicialmente por Malcom Dole, em 1968, foi John Fenn o responsável pelo desenvolvimento da ionização por *electrospray* em espectrometria de massas. Fenn recebeu o prêmio Nobel em 2002 pelo seu trabalho de ESI para análises de macromoléculas biológicas.⁶⁷

Inicialmente, ESI era considerada uma fonte de ionização exclusiva para análise de proteínas. Posteriormente, seu uso foi estendido para análise de pequenas moléculas polares. A ESI é um exemplo de fonte de ionização que funciona à pressão atmosférica. Quando a ionização ocorre em pressão atmosférica, sua eficiência melhora de 1.000 a 10.000 vezes quando comparada com ionização química, que utiliza pressão reduzida.⁶⁵

A ionização por *electrospray* tem como princípio a formação de gotículas pela influência de um intenso campo elétrico. A representação esquemática da ionização por *electrospray* é mostrada na Figura 9. A solução da amostra, por meio de um solvente adequado, passa por um capilar fino, também chamado de eletrodo de trabalho, com um fluxo entre 2 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Um intenso campo elétrico, gerado pela aplicação de uma diferença de potencial de 3 a 6 kV, é aplicado nesse capilar. Esse potencial é grande o suficiente para que a solução contendo a amostra forme pequenas gotículas carregadas, que seguem em direção ao contra-eletrodo. Normalmente, o contra-eletrodo é um cone de amostragem ou um capilar aquecido, que encaminha os analitos para o analisador de massas.

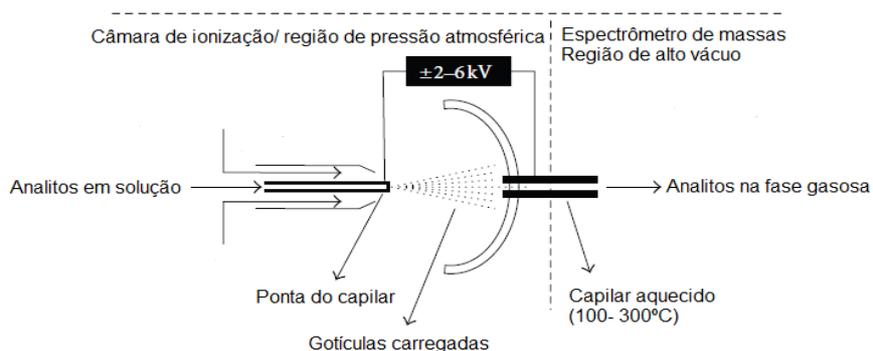


Figura 9 - Representação esquemática de uma fonte de ionização ESI. Adaptado⁶⁷

Para que ocorra esse processo, a densidade de carga na superfície da gota deve ser tal que as forças de repulsão entre os íons superem a tensão superficial. Um contra fluxo de gás de dessolvatação, normalmente o nitrogênio, é aplicado para que todo o solvente seja evaporado, diminuindo o tamanho das gotículas e aumentando assim sua densidade de carga. Quando a

tensão superficial é vencida, a gota presa na ponta do capilar sofre uma deformação, passando de um formato quase esférico para uma espécie de cone (cone de Taylor), e, dessa forma, o spray é formado. A Figura 10 mostra o efeito do potencial de ionização ESI na ponta do capilar.



Figura 10 - Efeito do potencial ESI na gota localizada na ponta do capilar⁶⁵

Nesse processo, a tensão superficial das gotas vai se tornando cada vez menor, até ocorrer o fenômeno chamado de explosão coulômbica, que resulta na formação de gotículas menores, com liberação de íons. Os íons são encaminhados dessa etapa, que é conduzida em pressão atmosférica, para o analisador de massas, que funciona sob alto vácuo.

Existem dois mecanismos propostos para explicar a remoção dos íons das gotículas: o modelo de carga-resíduo e o modelo de dessorção de íons. De acordo com o primeiro, a sequência da evaporação do solvente e a fissão da gota é repetida várias vezes até o tamanho da gota se tornar tão pequeno que só contenha um único íon do analito de interesse. Já no modelo de dessorção de íons, a gota perde massa por evaporação e, com o aumento do campo elétrico devido a densidade de carga, o íon é expulso, por repulsão eletrostática, antes da gota ser partida.⁶⁷

O uso do capilar aquecido (normalmente com 0,2 mm de diâmetro, 60 mm de comprimento e aquecido entre 100 e 300°C) na etapa de transferência dos íons para o analisador de massas visa a dessolvatação das espécies iônicas. A combinação do capilar aquecido com o contrafluxo de gás melhora a robustez do sistema e reduz significativamente a formação de aglomerados de íons (*clusters*).⁶⁸

Durante a ionização por *electrospray*, três tipos de processos distintos podem ocorrer no interior do capilar: reações de oxidação/redução, que produzem íons moleculares; reações ácido/base, que resultam na formação de moléculas protonadas e desprotonadas; e reações de coordenação com cátions ou ânions, que produzem moléculas cationizadas (ex: sodiadas, potassiadas, etc.) ou anionizadas. A maioria dos íons gerados por ESI-MS são moléculas resultantes das duas últimas reações supracitadas, dependendo do modo de ionização utilizado

(positivo ou negativo). É possível controlar a extensão com que cada uma dessas reações ocorre no interior do capilar por intermédio da mudança de solvente, do ajuste de pH, do valor da voltagem aplicada e de variações na estrutura da substância analisada.⁶⁹

3.2 Analisador de massa de tempo de voo (TOF)

O conceito do analisador de massas por tempo de voo (TOF) foi descrito por Stephens em 1946. Onze anos depois, Wiley e McLaren publicaram o projeto do um espectrômetro de massas com analisador TOF linear, que posteriormente se tornou o primeiro instrumento desse tipo comercialmente disponível.⁶⁵

O funcionamento básico do analisador TOF consiste na aceleração dos íons, através de um campo elétrico, dentro de um longo tubo sob vácuo, até que se atinja o detector. Nesse caminho percorrido dentro do tubo, os íons formados na fonte de ionização são separados de acordo com suas razões massa/carga (m/z), chegando ao detector em tempos diferentes. A velocidade v dos íons é proporcional ao inverso da raiz quadrada da razão m/z , conforme mostrado na Equação 1:

$$v = \sqrt{\frac{2zV}{m}} \quad (1)$$

Portanto, quanto menor a razão m/z , mais rápido os íons percorrem o tubo e chegam ao detector. Se dois íons com a mesma carga apresentam massas diferentes, suas velocidades serão inversamente proporcionais a raiz quadrada de massa e atingirão o detector em tempos distintos. A Figura 11 ilustra esse princípio de separação de cargas por meio da razão m/z .

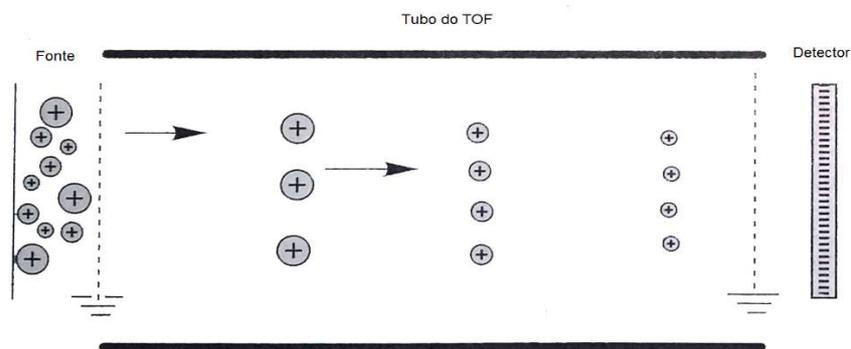


Figura 11- Princípio da separação de massas por TOF. Íons com valores altos de m/z são representados pelas esferas grandes e íons de pequena razão m/z por esferas menores⁶⁷

A Equação 2 mostra como pode ser calculado tempo necessário para um íon de relação m/z atravessar a distância d do tubo até o sistema de detecção.

$$t = \frac{d}{v} = d \sqrt{\frac{m}{2zV}} \quad (2)$$

Instrumentos com analisador TOF linear são relativamente simples de operar, podem ter um tamanho reduzido e são fáceis de construir. Os modelos convencionais têm como desvantagem uma baixa resolução, que é consequência de alguns fatores como a duração do pulso de ionização e a dispersão de energia cinética dos íons na fonte. Como a resolução é proporcional ao tempo de travessia do íon desde o analisador até o detector, uma possível solução para o problema é o aumento do tamanho do tubo de voo. Outra possibilidade é a diminuição da voltagem de aceleração, que também aumenta o tempo de voo, mas, que em contrapartida, diminui a sensibilidade.

Uma maneira adicional de melhorar a resolução é o uso de espelhos eletrostáticos, chamados *reflectrons*. O reflectron é composto de uma série de grades e eletrodos onde é aplicado um aumento progressivo de potencial repulsivo. Quando os íons entram no tubo de voo, são desacelerados por esse campo elétrico repulsivo, mudam a direção de movimento, fazendo uma espécie de curva, e retornam ao tubo livre de campo. (Figura 12). A dispersão da energia cinética é corrigida, pois os íons com maior energia cinética chegam primeiro e permanecem por mais tempo no *reflectron*, ao contrário dos íons com menor energia, que penetram menos profundamente e passam mais rápido pelo dispositivo. Dessa forma, íons com a mesma m/z e diferentes energias cinéticas atingem o detector ao mesmo tempo.^{67, 70}

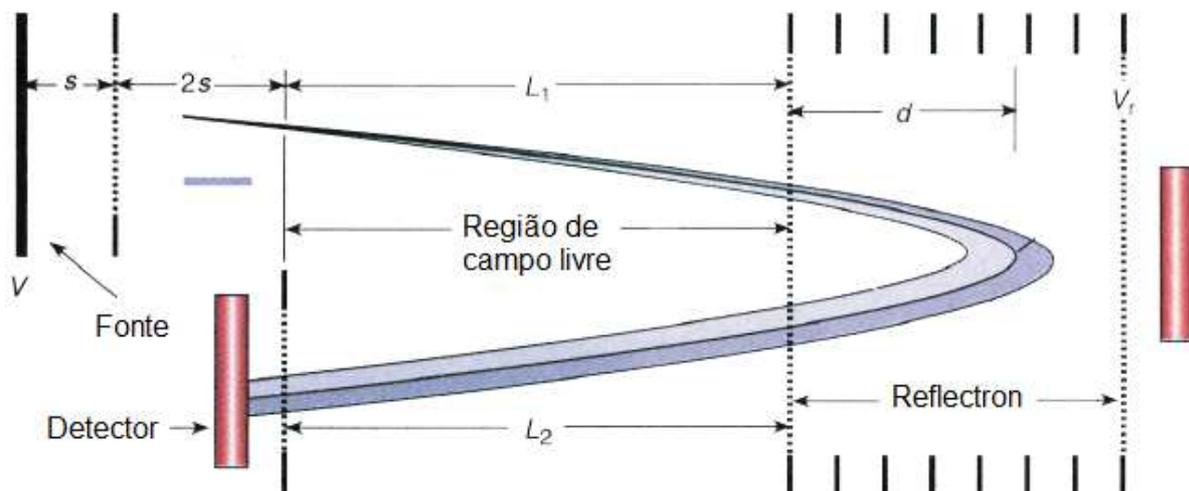


Figura 12 - Esquema de funcionamento de um analisador TOF. Adaptado⁷¹

A aceleração ortogonal também é uma ferramenta que permite, além do uso de fontes de ionização contínuas, ganhos de resolução nos espectros. Os íons provenientes de uma fonte de ionização entram na região de aceleração em uma direção perpendicular ao eixo principal do analisador TOF. O feixe de íons é focalizado com o auxílio de lentes refletoras. Uma aceleração ortogonal e pulsada é aplicada para projetar o feixe de íons na direção da região de campo livre dentro do analisador de massas. Com isso, ocorre menor dispersão espacial e de energia cinética. A Figura 13 traz um esquema da aceleração ortogonal num sistema híbrido quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF).

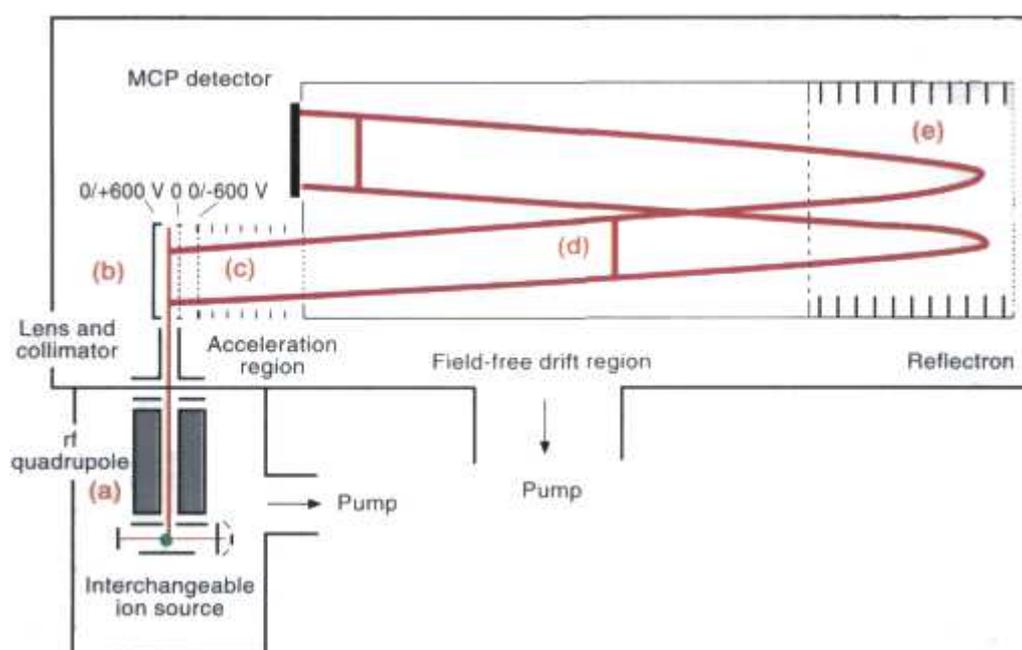


Figura 13 - Esquema da aceleração ortogonal no analisador de massas TOF utilizando injeção quadrupolo (Q-TOF)⁷¹

Alguns espectrômetros mais modernos dispõem de um sistema híbrido envolvendo quadrupolos hifenados a analisadores por tempo de voo, que aliam a velocidade e a sensibilidade do TOF-MS, com um aumento no range dinâmico, tendo assim melhor capacidade de quantificação.⁷² Instrumentos híbridos desse tipo em geral são dotados de um acelerador ortogonal, com um focalizador de íons, por exemplo um quadrupolo ou octopolo (q_0), posicionado à frente e que opera no modo de transmissão de íons, resultando em um aumento da qualidade do feixe iônico que alimenta o equipamento. Na sequência, encontram-se os quadrupolos (hexapolos ou octopolos, dependendo do fabricante) q_1 e q_2 . O primeiro (q_1)

funciona como um filtro seletivo de íons e o segundo (q_2) como cela de colisão, em experimentos MS/MS. Posteriormente, os íons serão direcionados para o analisador TOF e separados pela razão m/z , de acordo com o tempo de voo.⁷³

No modo de espectrometria de massas em série (MS/MS), a fragmentação é induzida por colisão do íon com um gás inerte (Ar ou He), em uma cela de colisão, resultando em fragmentos, cujos espectros de massas são posteriormente analisados. Já no modo MS, todos os quadrupolos operam no modo de transmissão total de íons e a cela de colisão é desativada.

3.3 Detector do tipo *Microchannel plate*

O detector bastante utilizado na configuração dos equipamentos de TOF-MS é do tipo *Microchannel plate* (MCP). Ele é constituído por placa muito fina, contendo um grande número de microcanais individuais, com diâmetro muito pequeno (aproximadamente 10 μ m). Esses microcanais, que são tubos microscópicos, se localizam na parte frontal e traseira da placa. Quando um íon atinge a parte frontal de uma MCP, um elétron é emitido, e assim se inicia o processo de amplificação do sinal elétrico. Assim que elétrons livres colidem com as paredes desses microcanais, uma grande quantidade de elétrons (cerca de dez vezes mais) são encaminhados para a parte traseira da placa. Esses elétrons são focalizados para um cintilador que, ao ser atingido por elétrons, emite um feixe de luz. Essa luz é convergida para um tubo fotomultiplicador, que produz sinais elétricos e são registrados por um sistema de dados.

Ferramentas Quimiométricas

4 Ferramentas Quimiométricas

4.1 Comparação entre amostras

A efetiva comparação entre amostras de tintas de caneta requer primeiramente a identificação química dos corantes e produtos de degradação envolvidos e o estabelecimento das proporções existentes entre eles. A segunda etapa consiste na utilização de uma métrica capaz de aferir o grau de correlação entre as amostras analisadas. Dentre as métricas normalmente utilizadas, estão o coeficiente de correlação de Pearson, a distância euclidiana, a função cosseno e o coeficiente de Canberra.⁷⁴ Após a escolha da métrica, um estudo populacional por meio de um banco de dados deve ser realizado, para a escolha da melhor abordagem estatística para o caso estudado.

Com o propósito de estabelecer comparações entre amostras, vários métodos vêm sendo propostos na área forense, principalmente para análise de drogas de abuso. Esseiva *et al.*⁷⁴ selecionou, entre alguns métodos testados, um baseado no coeficiente de correlação, usando o quadrado da função cosseno, para comparar os perfis químicos de amostras de heroína. Em 2008, Dujourdy e Besacier⁷⁵ estabeleceram limites para determinar a correlação entre amostras de sal de cocaína, a partir dos resultados de solventes residuais obtidos por *headspace* associado à cromatografia gasosa.

Na área de análise de tintas de canetas, Weyermann e colaboradores⁶⁶ aplicaram o coeficiente de correlação de Pearson para comparar a tinta de trinta canetas gel pretas analisadas por LDI-MS. O método escolhido foi eficiente para distinguir as tintas analisadas, obtendo um poder de discriminação máximo de 85%.

Um novo método de correlação entre amostras baseado em análises quimiométricas denominado ULT (do inglês *Unsupervised Linkage Threshold*) foi desenvolvido por Zacca *et al.*⁷⁶ e aplicado para duzentas e cinquenta amostras de cocaína cloridrato apreendidas pela Polícia Federal (PF) e analisadas por *headspace* acoplado a GC-MS. O método permitiu o estabelecimento de valores limites que determinam se as amostras estão ou não ligadas, sem um conhecimento prévio do número de classes ou outras informações preliminares. O ULT combina pares de amostras para o cálculo dos coeficientes de correlação utilizando a métrica do quadrado da função cosseno.

O método ULT foi selecionado para a análise de dados deste trabalho por ser um método totalmente não supervisionado, isto é, por não requerer conhecimento prévio e

detalhado a respeito das amostras tais como o histórico de armazenamento e a composição inicial das tintas de caneta. Variáveis desse tipo, na prática, estão totalmente fora do controle dos peritos criminais e representam uma séria limitação à aplicação a casos reais das técnicas de datação atualmente utilizadas na literatura especializada. O ULT pode ser resumido por meio dos seguintes passos:

1. Obtenção dos espectros de massa das amostras;
2. Definição de uma métrica para determinação de correlações entre amostras;
3. Cálculo do dendrograma, diagrama que exhibe o agrupamento das amostras de acordo com a distância existente entre elas;
4. Para cada número de classes (nclass) possível, que pode variar de 2 até o número total de amostras:
 - 4.1 Obter as correlações intra e extra-classes;
 - 4.2 Construir histogramas das amostras ligadas e não ligadas;
 - 4.3 Construir a curva *Receiving Operating Characteristics (ROC)* e calcular a área sob a curva (AUC)
5. A partir de critérios pré-estabelecidos (explicação a seguir), determinar o número de classes final e os valores limites de correlação entre amostras.

4.1.1 Função Cosseno

Nesse trabalho foi utilizada a métrica do quadrado da função cosseno para determinar a proximidade (correlações) entre perfis de degradação de corantes com o tempo. As correlações são obtidas através do cálculo do cosseno quadrado do ângulo θ ($\rho = \cos^2\theta$) existente entre o vetor composto pelas áreas dos picos dos espectros de massa dos corantes existentes em cada amostra de tinta de caneta. O valor de área de todos os picos, de uma série de produtos de degradação de um determinado corante, é normalizado a 100%. Considerando os valores de área normalizados como componentes, é traçado um vetor único representativo de uma determinada amostra. Assim, cada amostra possui um vetor característico. A comparação entre diferentes vetores permite o cálculo do cosseno quadrado do ângulo entre eles. Quanto mais similares os perfis de degradação de duas amostras, tanto mais próximo de zero será o valor de θ e tanto mais próximo de 1 será o valor correspondente ao cosseno quadrado. A Figura 14 ilustra a construção de dois vetores e a comparação de duas amostras A e B, que possuem um mesmo corante e seus produtos de degradação.

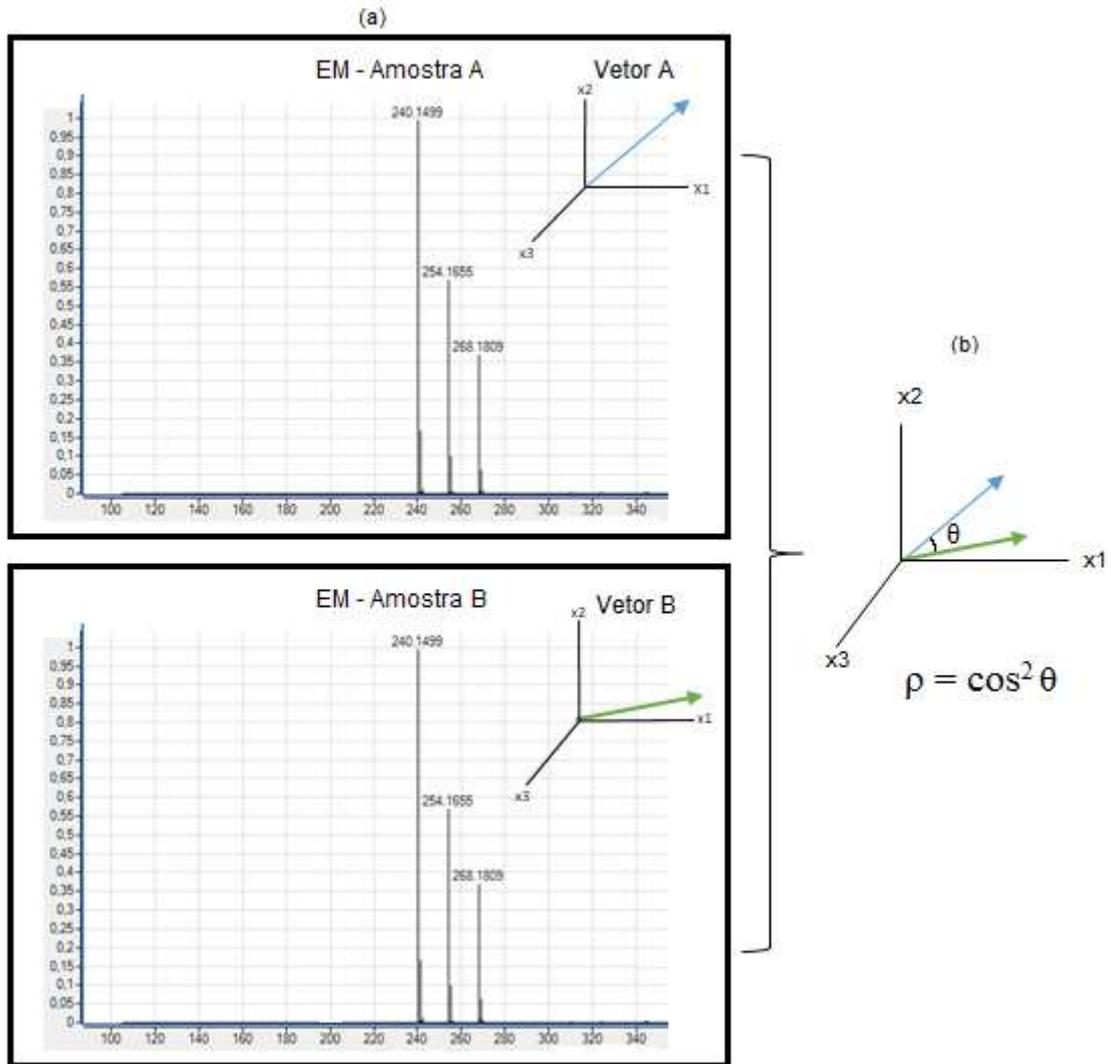


Figura 14 - (a) Construção dos vetores a partir do espectro de massas (b) Comparação dos vetores para cálculo do quadrado da função cosseno

O cosseno quadrado varia entre 0 a 1. Quanto mais próximo de 1, maior é a correlação entre duas amostras.

Sendo o produto escalar de dois vetores A e B:

$$\vec{A} \cdot \vec{B} = \|\vec{A}\| \|\vec{B}\| \cos \theta \rightarrow \cos^2 \theta = \frac{(\vec{A} \cdot \vec{B})^2}{\|\vec{A}\|^2 \|\vec{B}\|^2} \quad (3)$$

O cosseno quadrado de θ pode ser calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\rho = \cos^2 \theta = \frac{(a_1 b_1 + a_2 b_2 + \dots + a_n b_n)^2}{(a_1^2 + a_2^2 + \dots + a_n^2)(b_1^2 + b_2^2 + \dots + b_n^2)} \quad (4)$$

Onde:

$$\vec{A} \cdot \vec{B} = a_1 b_1 + a_2 b_2 + \dots + a_n b_n \quad (5)$$

$$\|\vec{A}\| = \sqrt{a_1^2 + a_2^2 + \dots + a_n^2} \quad (6)$$

$$\|\vec{B}\| = \sqrt{b_1^2 + b_2^2 + \dots + b_n^2} \quad (7)$$

4.1.2 Cálculo do dendrograma

Conforme visto anteriormente, a função cosseno quadrado fornece uma medida de proximidade entre duas amostras. Dessa forma, o complemento de ρ em relação à unidade ($1 - \rho = 1 - \cos^2\theta$) fornece uma medida de distância elas. No método ULT, a partir dos dados de espectrometria de massas, constrói-se um dendrograma, que agrupa as amostras em função da distância ($1 - \rho$) existente entre elas. O dendrograma mostra todos os possíveis agrupamentos de amostras para cada número de classes (nclass) que possa ser formado. Note-se que o valor de nclass pode variar entre 2 e o número total de amostras. No dendrograma, quanto mais longos forem os ramos que distinguem uma classe da outra, melhor será a separação entre essas classes. Cortes horizontais no dendrograma a cada valor das ordenadas ($1 - \rho$) permitem definir um número de classes (nclass) correspondente. A Figura 15 traz um exemplo de dendrograma, onde pode-se observar o agrupamento de amostras para os números de classes nclass = 5 e nclass = 10.

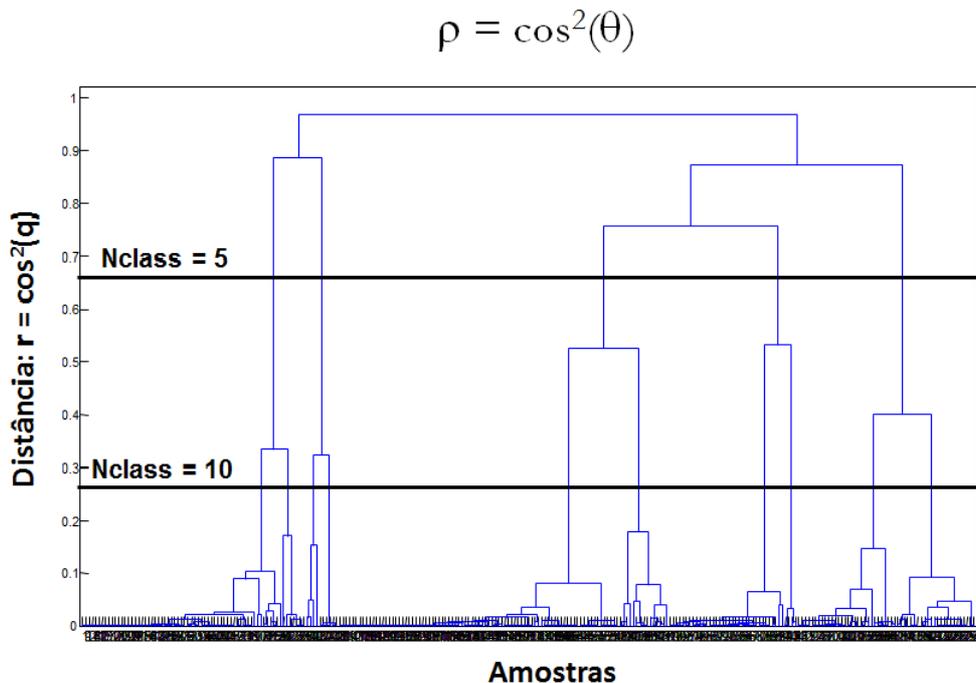


Figura 15 - Exemplo de um dendrograma, onde pode-se observar a distinção de 5 e 10 classes

4.1.3 Correlações intra e interclasses

Uma vez calculado o dendrograma, é possível, para cada número de classes estudado (nclass), calcular a proximidade (correlação) tanto entre amostras classificadas dentro de uma mesma classe (correlações intraclasse) como entre amostras classificadas em classes diferentes (correlações interclasse). A Figura 16 traz um exemplo de correlações intraclasse (a) e interclasses (b) para o caso de 5 amostras hipoteticamente divididas em duas classes distintas.

Para cada número de classes (nclass) possível, os valores de ρ intraclasse e interclasses obtidos são utilizados na construção de histogramas referentes respectivamente a amostras ligadas e não ligadas.

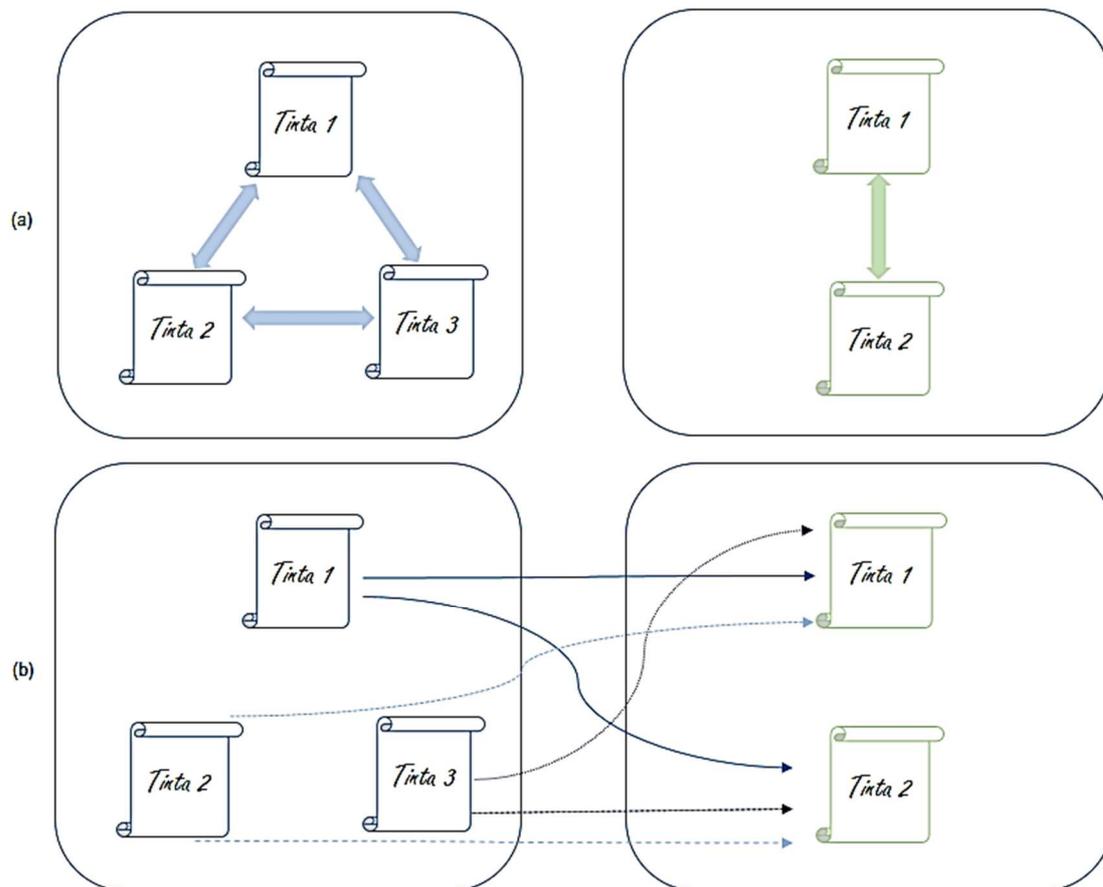


Figura 16 - (a) Correlação de amostras intraclasse e (b) correlação de amostras interclasses

4.1.4 Construção dos histogramas de amostras ligadas e não ligadas

Histogramas são representações gráficas das distribuições de frequência de um conjunto de dados. No caso do método ULT, o eixo das abscissas apresenta os valores de ρ e o das ordenadas a frequência normalizada.

Para esse método, dois histogramas são construídos: um referente às amostras ligadas (obtido a partir das correlações intraclasse) e outro às amostras não ligadas (obtido das correlações interclasses). Em geral, não se obtém uma separação completa entre os dois tipos de histograma, existindo uma zona de sobreposição entre eles. O menor valor de ρ obtido para amostras ligadas é denotado por ρ_L , enquanto que o maior valor de ρ para amostras não ligadas é chamado de ρ_{NL} . Valores de correlação acima de ρ_{NL} indicam que as amostras estão ligadas. Valores de correlação abaixo de ρ_L indicam que as amostras não estão ligadas. A zona de sobreposição, entre ρ_L e ρ_{NL} , representa a região de incerteza, onde não se pode afirmar se as amostras estão ou não ligadas. A Figura 17 ilustra histogramas de correlação típicos envolvendo amostras de tintas de documentos, demonstrando as importantes informações que podem ser obtidas a partir da construção desse tipo de gráfico.

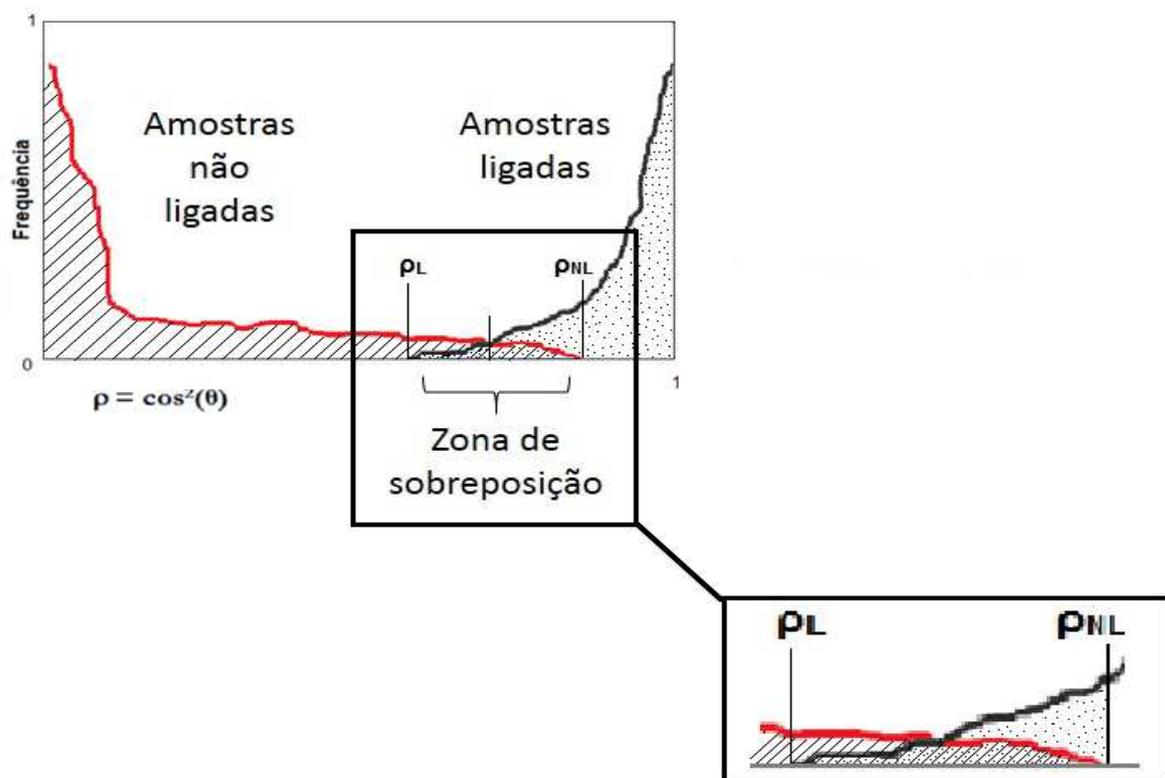


Figura 17 – Histogramas de correlação típicos envolvendo amostras ligadas (preenchido com círculos pretos) e não ligadas (hachurado). Detalhe: ampliação da zona de sobreposição

4.1.5 ROC – *Receiving Operating Characteristics*

Gráficos ROC são úteis para visualizar, organizar e selecionar classificadores baseados em sua performance. São gráficos bidimensionais em que, para um dado valor de ρ_{calc} e para cada valor calculado da função cosseno quadrado ($0 \leq \rho_{\text{calc}} \leq 1$), a taxa de verdadeiros positivos (VP) é traçada no eixo da ordenadas (y) e a taxa de falsos positivos (FP) é plotada no eixo das abscissas (x).⁷⁷ Os valores de VP são determinados pela área existente sob o histograma das amostras ligadas no intervalo $[\rho_{\text{calc}}; 1]$. A taxa de falsos positivos (FP) é estabelecida pela área sob o histograma das amostras não ligadas no intervalo $[\rho_{\text{calc}}; \rho_{\text{NL}}]$.

A ROC oferece uma maneira simultânea de determinar tanto gráfica como numericamente o número de classes que proporciona a melhor separação de amostras.⁷⁶ Pode-se avaliar a zona de sobreposição de histogramas a partir das curvas ROC. Quanto menor a sobreposição entre os histogramas, mais próxima da reta horizontal que passa pelo ponto (0,1) a curva ROC estará. Nesse caso, observa-se um alto número de verdadeiros positivos (VP) e um baixo número de falsos positivos (FP). A Figura 18 ilustra a diferença nas curvas ROC conforme aumenta a zona de sobreposição dos histogramas. A reta pontilhada com inclinação de 45° indica o caso de sobreposição total dos histogramas envolvidos.

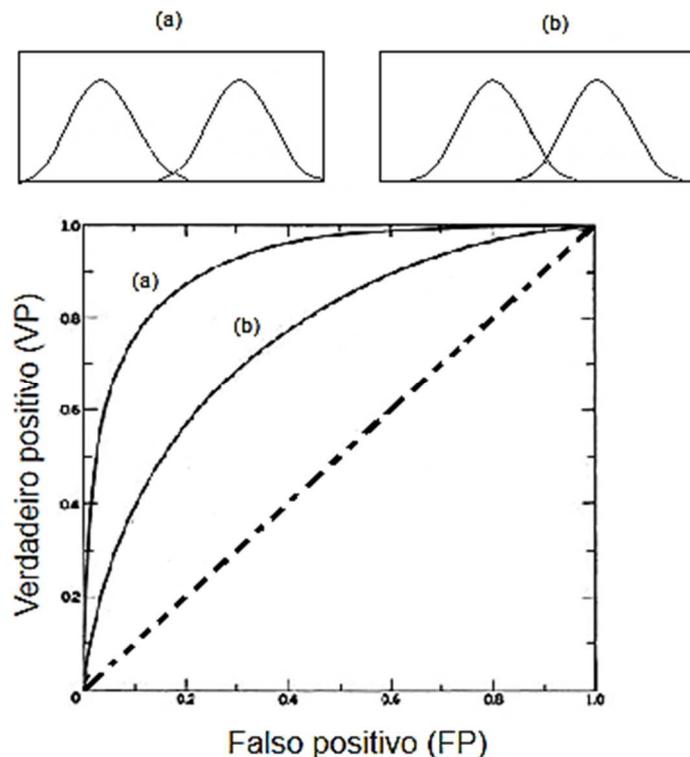


Figura 18 - Curvas ROC para histogramas com diferentes zonas de sobreposição

A área sob a curva, denominada AUC (do inglês, *Area Under the Curve*) fornece uma medida de separação entre os histogramas de amostras ligadas e não ligadas. Quando os histogramas das amostras ligadas e não ligadas estão totalmente separados, a área sob a curva (AUC) resultante é igual a 1. Por conseguinte, quanto maior é o valor de AUC, menor será a zona de sobreposição. A Figura 19 ilustra a AUC em uma curva ROC.

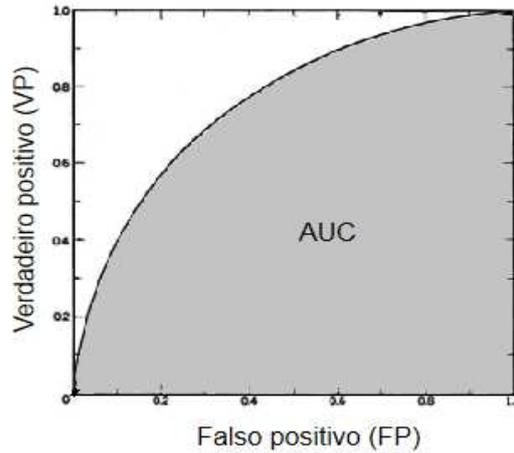


Figura 19 - AUC em uma curva ROC.

No outro extremo, quando há sobreposição total dos histogramas, a AUC assume o valor 0,5, indicando que aquele determinado número de classes (n_{class}) não é discriminativo. Na situação intermediária de sobreposição parcial dos histogramas, que é aquela frequentemente observada na prática, o valor de AUC encontra-se entre 0,5 e 1. A Figura 20 a seguir ilustra os três tipos de histograma com suas respectivas curvas ROC. A posição relativa de três valores experimentalmente calculados da função cosseno quadrado ($\rho_{\text{calc1}} > \rho_{\text{calc2}} > \rho_{\text{calc3}}$) em relação aos valores limites das amostras ligadas (ρ_L) e não ligadas (ρ_{NL}) é utilizada para ilustrar a construção das curvas ROC em cada caso.

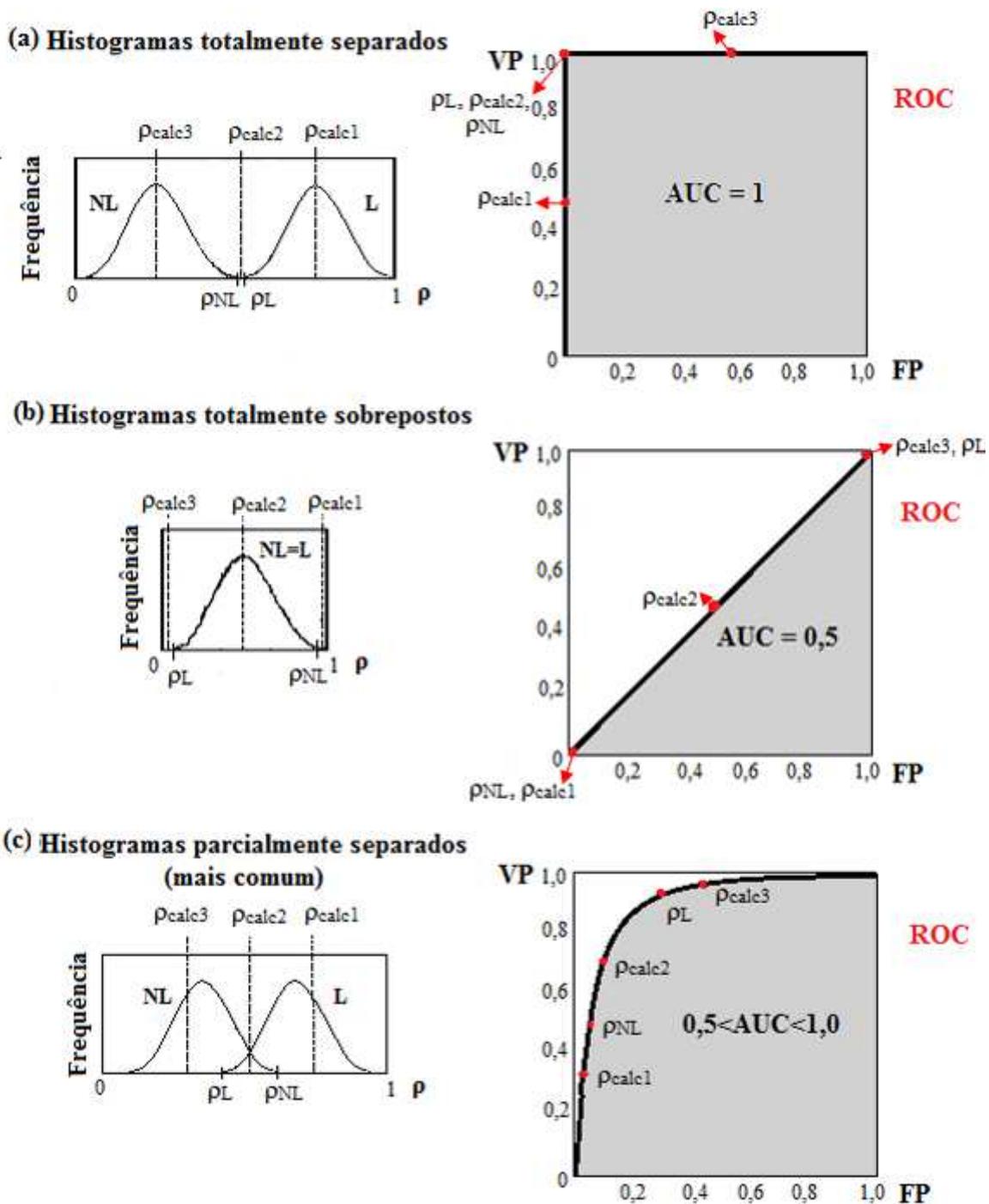


Figura 20 - Histogramas e curvas ROC para três casos possíveis: (a) Histogramas totalmente separados; (b) Histogramas totalmente sobrepostos; (c) Histogramas parcialmente separados. L = histograma das amostras ligadas; NL = histograma das amostras não ligadas.

Nesse trabalho, a AUC é levada em consideração para escolher o número de classes que proporcione a melhor separação entre as amostras de tinta ligadas e não ligadas, de acordo com os critérios estabelecidos pelo método ULT a seguir enumerados:

- 1) Em ordem ascendente, a partir de nclass = 2, escolher o valor de nclass que apresenta maior AUC;
- 2) Para o nclass escolhido, verifica se $\rho_L \geq 0,9$. Em caso positivo, fim da iteração. Em caso negativo, prosseguir para o passo 3.
- 3) Aumentar nclass até que a AUC atinja seu próximo ponto de máximo. Ir para o passo 2.

A Figura 21 ilustra um exemplo de escolha sequencial do número de classes.

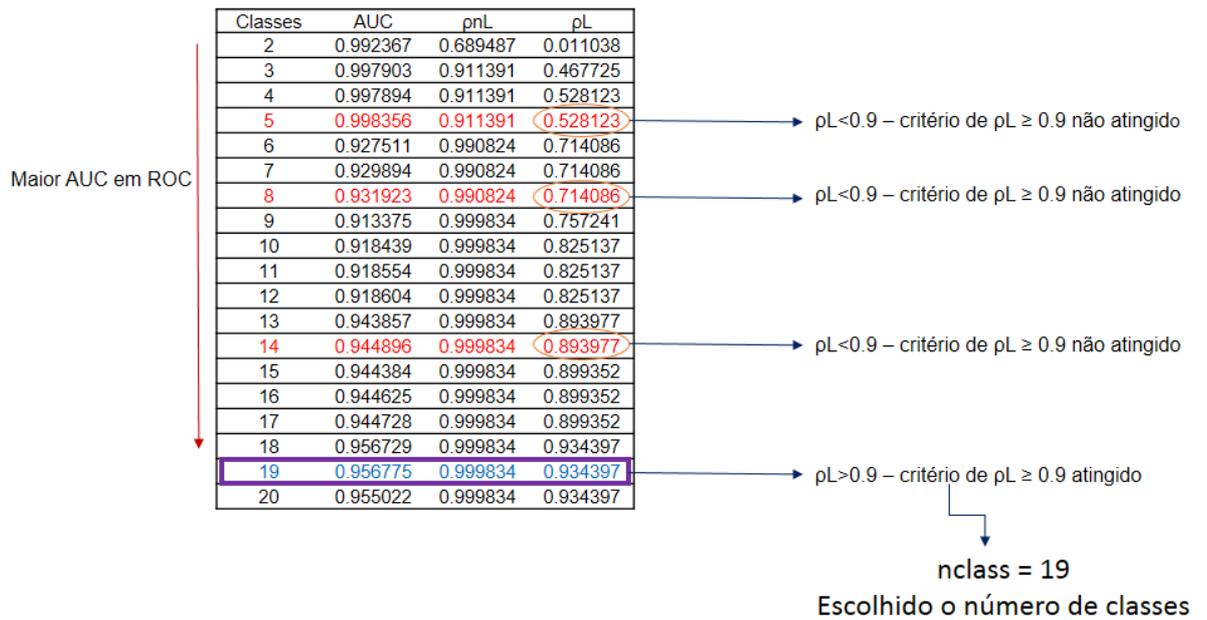


Figura 21 - Exemplo de escolha do nclass de acordo com o método ULT.

A Tabela 2 resume os resultados possíveis a partir da comparação de um determinado valor experimental de correlação (ρ) e os valores críticos referentes à população de amostras ligadas (ρ_L) e não ligadas (ρ_{NL}). Quanto menor for a zona de sobreposição (região entre ρ_L e ρ_{NL}), melhor será a classificação entre as amostras. Para análise pericial é de extrema importância a redução dessa zona de sobreposição para evitar a condenação de um inocente ou a impunidade de um culpado.

Tabela 2 - Resultados obtidos a partir de nclass definido

Condição	Resultado
$\rho > \rho_{NL}$	Amostras correlacionadas
$\rho_L \leq \rho \leq \rho_{NL}$	Região de incerteza
$\rho < \rho_L$	Amostras não correlacionadas

Materiais e Métodos

5 Materiais e métodos

5.1 Amostras

Com o objetivo de verificar os padrões de degradação ao longo do tempo para os corantes mais comumente utilizados em tintas de canetas esferográficas, foi realizada uma amostragem abrangente de laudos periciais, com diferentes datas de produção, localizados no arquivo do Instituto Nacional de Criminalística do Departamento de Polícia Federal (INC/DPF). Referidos documentos continham lançamentos gráficos de tintas de caneta nas cores azul e preta. O processo de amostragem restringiu-se a lançamentos provenientes de canetas esferográficas, por ser esse o tipo com maior prevalência em documentos questionados.¹⁶ A seleção de amostras priorizou tintas de cor azul, por serem as de maior ocorrência dentro da casuística da perícia criminal.

Para o estudo de degradação de corantes com o tempo, foram coletadas amostras de lançamentos produzidos a partir de 1962 até o ano de 2014, com um intervalo de dois anos entre as amostras. Não foi possível obter amostras dos anos 1974 e 1984, pois não estavam disponíveis no arquivo. A Tabela 3 exibe o total de amostras provenientes de laudos periciais coletadas por ano de produção e por cor de tinta de caneta.

Na seleção dos grafismos de caneta lançados nos documentos, foi utilizada uma inspeção visual minuciosa. Para verificar as características do traçado das canetas em busca de amostras de tinta de caneta esferográfica, foi utilizada uma lente de aumento, que permitiu verificar as estrias, os brancos microscópicos e as esquirolas com maior exatidão. Além disso, buscaram-se lançamentos de canetas esferográficas produzidos por diferentes autores, com diversos tons de azul e preto, além de diferentes larguras de traço (canetas de ponta fina, ponta grossa etc.). Amostras de assinaturas pessoais apostas nos laudos periciais foram priorizadas. Dessa forma, foi possível identificar o autor do registro e evitar readquirir amostras de lançamentos produzidos por um mesmo indivíduo, que provavelmente usou uma mesma caneta para rubricar mais de um laudo. Esses procedimentos visaram ampliar o número de formulações de tinta detectadas e, dessa forma, incluir o maior número possível de corantes no banco de dados gerado.

Tabela 3 - Total de amostras coletadas por ano e por cor de tinta de canetas

Ano de produção do documento	Total de amostras de canetas coletadas	Total de amostras de canetas azuis	Total de amostras de canetas pretas
1962	18	18	0
1964	23	22	1
1966	28	25	3
1968	21	19	2
1970	27	22	5
1972	30	24	6
1976	23	20	3
1978	28	21	7
1980	24	14	10
1982	27	17	10
1986	14	9	5
1988	26	17	9
1990	26	15	11
1992	25	16	9
1994	30	23	7
1996	23	21	2
1998	28	18	10
2000	23	17	6
2002	7	7	0
2004	23	18	5
2006	23	15	8
2008	27	20	7
2010	26	21	5
2012	26	21	5
2014	28	21	7
TOTAL	604	461	143

Para análise dos documentos questionados, buscaram-se registros de canetas esferográficas em laudos periciais do arquivo produzidos nos mesmos anos desses documentos. Foram coletadas amostras dos anos 1976 e 2012. Além disso, foi observado o aspecto visual dos traços nos dois casos (laudos e documentos questionados), procurando sempre por tintas de cor e largura semelhantes. Foram amostrados documentos questionados enviados ao INC, para perícia grafotécnica, cuja solicitação tinha referência a data provável de produção de um determinado lançamento.

Para as amostras de validação, foram elaborados lançamentos gráficos em folhas de papel A4 75g/m², marca *Chamequinho*, com três canetas esferográficas azuis das marcas *Bic Cristal*®, *Pilot BPS* e *Molin*. Para os ensaios de repetitividade, foram desenhadas linhas retas no papel com as três canetas e as amostras de tinta foram extraídas dessas linhas. Para os ensaios de precisão intermediária e reprodutibilidade, cada analista recebeu um papel contendo três registros, com a mesma grafia, de cada uma das três canetas citadas. Para uma amostragem mais aleatória possível, nenhum dos analistas teve contato com o papel que outro utilizou para realizar o procedimento. Cada folha que continha os lançamentos gráficos utilizados para a validação foi isolada com papéis, na frente e no verso, com o objetivo de evitar contaminações de tinta entre documentos.

Alguns testes para uso de padrão interno foram realizados. Fenolftaleína foi testada em modo negativo e cafeína e procaína em modo positivo. Esses testes preliminares revelaram a ocorrência de supressão de íons característicos dos corantes analisados. Face a limitações de tempo hábil no contexto do presente projeto e, no intuito de preservar a simplicidade e rapidez do procedimento experimental, optou-se pela não utilização de padrões internos. A escolha e a otimização do uso desse tipo de substância são indicados como objeto de estudo de pesquisas futuras.

Para compensar a não utilização de padrão interno, que daria informações sobre variações de intensidade da resposta obtida pelos espectrômetros, foi utilizada a razão isotópica (r.i.) entre o sinal mais intenso de cada espectro gerado e seu isótopo mais próximo. O cálculo da r.i. permite verificar matematicamente se o pico mais intenso de cada corante (usualmente o íon molecular) foi adequadamente medido pelo espectrômetro de massa. Valores de r.i. muito distantes do valor teórico de cada corante indicam a ocorrência de problemas de saturação ou distorções de sinal. A razão isotópica neste trabalho é calculada pelo quociente entre a área do pico do isótopo M+1 e a área do pico do íon molecular (M) de cada corante no espectro de massas. A Figura 22 ilustra um exemplo desse procedimento.

Para o caso da 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, no lugar da área do pico do íon molecular, foi utilizada a área do pico do íon molecular mais um hidrogênio (M+H⁺), que corresponde ao *m/z* 268 Th observado nos espectros das amostras que contêm esse corante.

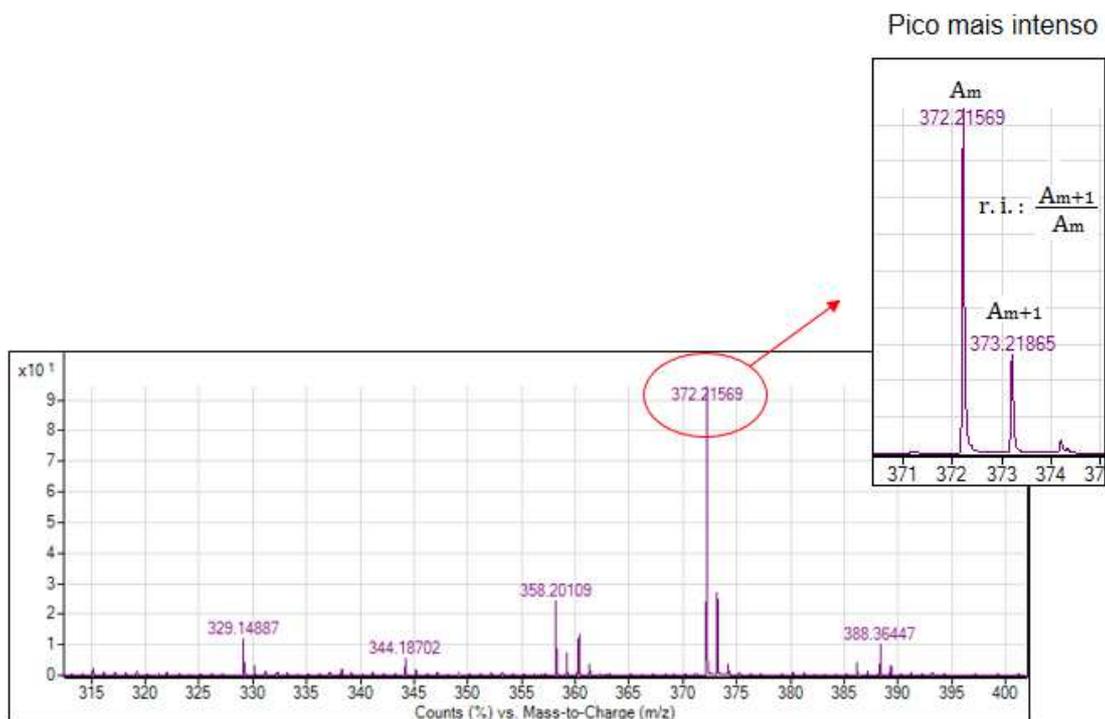


Figura 22 - Procedimento para cálculo da razão isotópica. Detalhe: ilustração do cálculo da r.i. para o corante Violeta Cristal.

Foram utilizados os valores de razão isotópica calculados para amostras analisadas na etapa de validação, mais precisamente nos ensaios de repetitividade, para o cálculo de ± 1 , ± 2 e ± 3 desvios padrões das medidas. A partir desses resultados, foi definido que para as amostras de tintas dos laudos o sinal referente a cada corante em estudo é considerado aceito se o valor de r.i. experimentalmente calculado para esse composto for menor do que o valor médio correspondente dos ensaios de validação ± 3 desvios padrões. Esse valor foi escolhido com base nos resultados de razão isotópica obtidos para as amostras de validação. Os valores e os gráficos realizados para essas amostras constam no Anexo 1. O cálculo da razão isotópica foi realizado para todas as amostras de tintas de laudos e foram excluídos os valores acima do critério de aceitação definido.

Além disso, foram adquiridos, por meio do *software ChemDraw Ultra®*, os valores teóricos de abundância relativa dos isótopos de cada composto estudado, para comparação com as médias obtidas nos ensaios de validação.

5.2 Equipamentos

Em virtude de dificuldades contingenciais de manutenção ocorridas em alguns dos equipamentos envolvidos e da necessidade da realização de experimentos de reprodutibilidade, os experimentos foram desenvolvidos em diferentes laboratórios: no Serviço de Perícias em Laboratório e Balística do Instituto Nacional de Criminalística do Departamento de Polícia Federal (INC), no Instituto de Criminalística da Polícia Civil do Distrito Federal (IC/PCDF) e na Central Analítica – Instituto de Química/ Universidade de Brasília (UnB). A Tabela 4 mostra os locais de realização das etapas experimentais envolvidas no presente trabalho e a Tabela 5 resume as principais características dos equipamentos utilizados.

Tabela 4 - Locais de realização dos experimentos

Etapa do trabalho	Local
Validação	INC e IC/PCDF
Análise das amostras de laudos, exceto os datados de 1976, 1996 e 2002	UnB
Estudos de caso e laudos datados de 1976, 1996 e 2002	INC

Tabela 5 – Principais características dos equipamentos utilizados neste trabalho.

Laboratório	INC	IC/PCDF	UnB
Fabricante	<i>Agilent Technologies</i>	<i>Agilent Technologies</i>	<i>Sciex</i>
Introdução da amostra	Injetor automático do HPLC 1100 (sem coluna)*	Injetor automático do UHPLC <i>Infinity</i> 1290 (sem coluna)*	Injetor automático do UHPLC <i>Cekspert™ Eksigent 100-XL</i> (sem coluna)*
Fonte de Ionização	ESI	Dual AJS ESI	ESI
Analisador de massas	MSD TOF modelo G1969A	Q-TOF 6540**	TripleTOF 5600+***

*O método empregado não requer separação cromatográfica. A injeção direta no espectrômetro de massas valeu-se do sistema automático de injeção disponível no módulo de cromatografia líquida existente.

** Sistema híbrido que possui um quadrupolo e dois octopolos, que filtram e colimam íons (de acordo com a relação m/z), hifenados a uma célula de colisão (hexapolo) e a um analisador por tempo de voo.

*** Sistema híbrido que possui uma série de 03 quadrupolos (que filtram, colimam e colidem íons de acordo com a relação m/z) hifenados a um analisador por tempo de voo.

Os documentos questionados, juntamente com as amostras de laudos confeccionados em datas compatíveis e provenientes dos arquivos do INC (laudos produzidos em 1976 e 2012, listados na tabela 4), foram analisados no equipamento do INC. Devido a problemas com o contrato de prestação de serviços de manutenção, não foi possível dar continuidade às análises das outras amostras utilizando esse equipamento.

Para continuação do trabalho, os espectros de massa das amostras de laudos provenientes dos arquivos do INC foram obtidos por meio do equipamento da UnB.

Após retiradas do suporte, as amostras foram transferidas para *vials* de vidro, marca *Agilent*, com capacidade para 2 mL, fechados com tampa rosqueável de polipropileno e septos em silicone. Foi utilizada micropipeta Pipetman marca Gilson (200 a 1000 μ L) para manipulação de volumes de solvente. As amostras foram submetidas a um agitador tipo *Vortex*, marca *Thermo*.

5.3 Reagentes

Foi utilizado metanol grau HPLC tanto na extração das amostras quanto para o preparo da fase móvel. Esse solvente foi adquirido da empresa *Tedia*. Também para a preparação das fases móveis, foi utilizado o reagente ácido fórmico, adquirido da *Synth* e água ultra-purificada obtida do equipamento *Milli-Q Millipore*®.

5.4 Procedimento experimental

5.4.1 Preparo das amostras

O procedimento de amostragem utilizado neste trabalho pode ser considerado destrutivo, já que requer a remoção de uma porção milimétrica do documento para análise. Apesar dos métodos minimamente destrutivos de análise de tinta serem preferíveis do ponto de vista da integridade do documento, eles trazem como desvantagens um menor poder de discriminação entre canetas, além de uma variedade limitada de técnicas analíticas possíveis de serem utilizadas.^{78, 37}

Foram extraídos dos documentos dois pequenos confetes (diâmetro de 2 mm cada) do suporte com a tinta que será objeto de estudo. Esse mesmo processo foi repetido para obtenção das amostras do papel do documento, funcionando como branco. Na análise por espectrometria de massas, o espectro do papel foi subtraído do espectro obtido da tinta. Isso permite a

visualização dos picos referentes apenas à composição da tinta, sem interferência do suporte. No caso dos documentos questionados, essa perfuração dos documentos foi previamente autorizada pelo juiz do processo ou pelo condutor do inquérito policial (delegado de polícia). Portanto, essa técnica minimamente destrutiva de análise de tintas de caneta não se mostrou um empecilho para realização dos ensaios. Foram realizados alguns testes para otimização do método. Foi testado o uso de apenas um confete e a extração com 250 μL de metanol. Contudo, as condições que apresentaram melhores resultados, em termos de concentração e da qualidade dos espectros obtidos, foram as descritas a seguir. A Figura 23 ilustra o procedimento experimental de obtenção e preparo de amostras de tinta de caneta esferográfica, realizado para laudos de data de elaboração conhecida, documentos questionados e amostras de validação.

Para extração de cada amostra de todos os documentos analisados, foi utilizado um perfurador tipo alicate, capaz de produzir um furo por aplicação (“monofurador”), conforme ilustrado na Figura 23. Para cada segmento de tinta ou de suporte a ser amostrado, os dois pequenos discos obtidos foram transferidos, com auxílio de uma pinça, para um *vial* de vidro. Em seguida, ao mesmo *vial* foram pipetados 500 μL de álcool metílico. Esse solvente já é conhecido na literatura como sendo capaz de solubilizar os compostos de interesse. Todos os *vials* foram fechados com um conjunto de septo e tampa rosqueável e submetidos à agitação, por 30 segundos, no agitador tipo *Vortex*, para acelerar a extração dos corantes presentes na tinta.

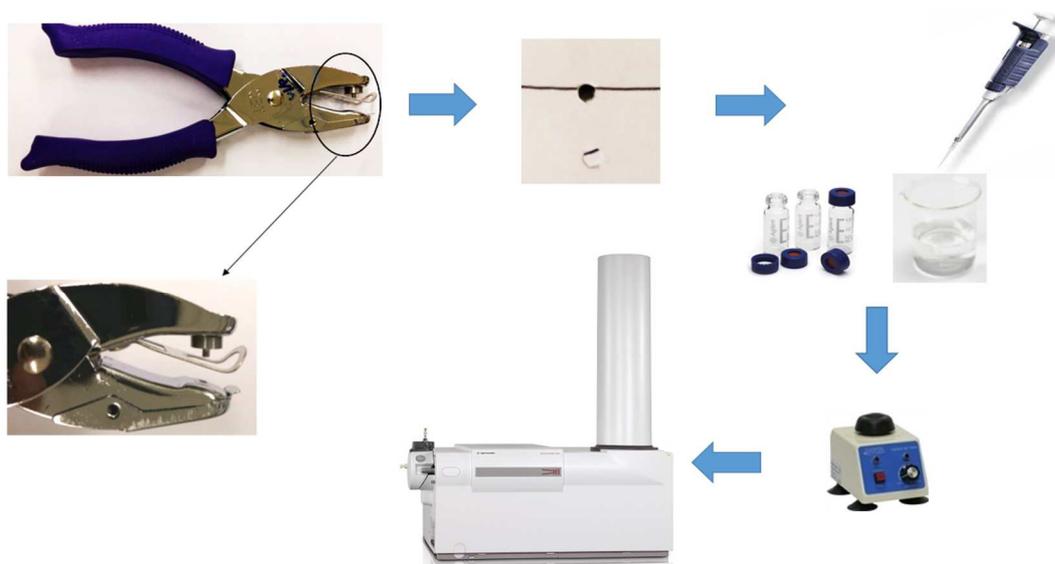


Figura 23 - Procedimento experimental para análise de tintas de canetas em documentos

Durante a amostragem, alguns cuidados foram tomados para evitar contaminação cruzada. A cada amostra, o perfurador e a pinça foram higienizados com papel toalha umedecido com álcool etílico e depois foram secos com outra folha de papel do mesmo tipo. Além disso, foi observado o verso de todas as folhas onde se pretendia amostrar alguma tinta. Buscou-se, na medida do possível, amostrar partes do documento que não possuísem no seu verso algum tipo de marcação, impressão, ou qualquer elemento que pudesse interferir nos resultados das análises.

5.4.2 Preparo do padrão de tinta para controle

O padrão-controle de tinta foi obtido a partir de uma caneta esferográfica Bic Cristal®. Foi preparada uma solução-mãe com 112,5 mg da tinta comercial solubilizada em 40 mL de metanol. A partir da solução, 160µL foram pipetados e diluídos em 100 mL de metanol. Esse nível de diluição permitiu a obtenção de espectros de massa com intensidades dentro da faixa de operação normal dos equipamentos e com formatos de pico adequados à integração de área.

5.4.3 Preparo da fases móveis

Foram utilizadas duas diferentes fases móveis:

Fase A: metanol (MeOH)/ ácido fórmico (HCOOH) 0,1%

Fase B: água (H₂O)/ ácido fórmico (HCOOH) 0,1%.

Para preparar a fase A, foi adicionado 1 mL de HCOOH concentrado a aproximadamente 800 mL de metanol em um balão volumétrico de 1000 mL. O volume do balão foi completado com metanol até o menisco.

No preparo da fase B, foi adicionado 1 mL de HCOOH a aproximadamente 800 mL de água ultra-purificada em um balão volumétrico de 1000 mL. O volume do balão volumétrico foi completado para 1000 mL com água ultra-purificada.

5.5 Parâmetros do método do TOF-MS

Os métodos desenvolvidos no presente trabalho não fazem uso de coluna cromatográfica, sendo o injetor automático do módulo de cromatografia líquida apenas utilizado como forma de injeção direta no espectrômetro de massas. A não utilização de separação cromatográfica mostrou-se uma alternativa simples e adequada aos objetivos deste

trabalho. Alguns parâmetros de análise tiveram que ser adaptados conforme as características específicas dos respectivos equipamentos, principalmente com relação à sensibilidade diferenciada de cada sistema analisador de massas. A Tabela 6 exhibe os parâmetros utilizados.

Tabela 6 - Parâmetros do método conforme o laboratório/equipamento

Parâmetros do método	INC LC/MSD TOF	IC/PCDF UHPLC Q-TOF	UnB UHPLC TripleTOF
Volume de injeção	10µL	0,3 µL	2 µL
Fluxo da bomba (LC)	0,35 mL/min	0,35 mL/min	0,30 mL/min
Fases móveis	20% Fase B 80% Fase A	20% Fase B 80% Fase A	20% Fase B 80% Fase A
Polaridade	Modo positivo	Modo positivo	Modo positivo
Coluna	n.a.	n.a.	n.a.
Temperatura do gás (ESI)	330°C	300°C	450°C
Fluxo do gás de secagem (ESI)	12 L/min	8 L/min	50 L/min
Pressão de nebulização	30 psi	35 psi	Não informado
Voltagem do fragmentador	100 V	175 V	100V
Mass Range (mín.)	100 m/z	100 m/z	100 m/z
Mass Range (máx.)	600 m/z	600 m/z	1000 m/z

Fase A: Metanol/ Ácido Fórmico 0,1%; Fase B: Água/ Ácido Fórmico 0,1%; n.a: não se aplica, injeção direta.

5.6 Figuras de mérito do método do TOF-MS

Sempre que um procedimento analítico é desenvolvido, existe a necessidade de verificar se o método apresenta performance adequada para os fins a que se destina e nas condições nas quais será aplicado. Esse processo de averiguação é conhecido como validação. A validação de um método pode ser atestada através de índices conhecidos como figuras de mérito. Dentre as figuras de mérito mais aplicadas em validação estão a seletividade, exatidão, precisão, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, entre outras. A escolha desses parâmetros para validação varia com o propósito do método e/ou dependem dos objetivos do órgão de fiscalização a que o laboratório está sujeito.⁷⁹

No caso deste trabalho, restringiu-se a etapa de validação à determinação da precisão e à garantia de seletividade, por tratar-se de um método qualitativo em que não é necessária a quantificação dos corantes analisados, mas somente a determinação das áreas dos picos no espectro de massas. Não há medidas de concentração de analitos para avaliação de parâmetros

como exatidão, sensibilidade e limite de quantificação. O limite de detecção não foi realizado por não haver os padrões de corantes disponíveis à época dos ensaios de validação.

A precisão expressa a concordância entre diferentes valores experimentais obtidos para uma mesma amostra em determinadas condições. Os parâmetros estatísticos repetitividade, reprodutibilidade e precisão intermediária de um conjunto de dados devem ser determinados para se obter os resultados de precisão.

Para avaliação de quais amostras seriam utilizadas nos testes de precisão, foram realizadas análises das tintas de 21 canetas esferográficas azuis e 13 canetas esferográficas pretas, disponíveis no laboratório e provenientes de diferentes fabricantes, por meio de Q-TOF (equipamento IC/PCDF). Dentre elas, foram escolhidas três canetas (doravante indicadas como canetas de número 2, 5 e 6) que apresentaram espectros de massas distintos entre si, tendo em comum apenas o Violeta Cristal, corante encontrado em mais de 97% das canetas analisadas nesta etapa do trabalho. Todos os procedimentos de validação foram realizados para as três tintas das canetas descritas na Tabela 7. Os espectros de massas obtidos para essas amostras constam no Anexo 2.

Tabela 7 - Canetas escolhidas para os ensaios de precisão

Caneta	Marca da canetas	Corantes apresentados
2	Bic Cristal®	1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Violeta Cristal
5	Pilot BPS	Violeta Cristal, Basic Blue 7
6	Molin	Violeta Cristal, Victoria Blue B

5.6.1 Repetitividade

A repetitividade é definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, isto é, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento de medição e mesmo laboratório.⁸⁰

Conforme a Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos elaborada pelo INMETRO⁸¹, é recomendado um mínimo de sete replicatas para determinação da repetitividade. Seguindo essa orientação, foram obtidas sete replicatas de um mesmo lançamento de caneta esferográfica, localizado no mesmo suporte e realizado na noite anterior à análise por espectrometria de massas. Esse procedimento exigiu esse intervalo de tempo entre a amostragem e a análise para garantir que a tinta já estivesse seca no momento da extração do

traço do papel. Todas as etapas de elaboração do lançamento, de amostragem e de realização da análise foram efetuadas pelo mesmo analista.

Os espectros de massas das sete replicatas das três canetas apresentadas na Tabela 7 foram obtidos no TOF do INC. Essas amostras também foram analisadas pelo TripleTOF da UnB, pois, com a necessidade de troca de equipamento para continuação do trabalho, era importante conhecer a diferença de resposta entre esses aparelhos.

5.6.2 Precisão intermediária

Também denominada de reprodutibilidade intralaboratorial, a precisão intermediária refere-se a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método e o mesmo laboratório, mas variando condições ambientais, analistas ou equipamentos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório.⁸⁰

No estudo de precisão intermediária foram comparados os resultados obtidos por dois analistas diferentes, utilizando mesmo método e equipamento. As amostras foram analisadas no TOF do INC e no TripleTOF da UnB. Foram feitas triplicatas de cada amostra de caneta lançada no papel.

5.6.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre resultados das medidas obtidas em diferentes laboratórios, para um mesmo processo. A reprodutibilidade foi avaliada para triplicatas das amostras de três canetas, produzidas por dois operadores diferentes. Os espectros de massa foram gerados tanto no laboratório do IC/PCDF quanto no do INC.

Essas amostras também foram analisadas no espectrômetro de massas da UnB para fins de comparação dos resultados.

5.6.4 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de discriminação entre a substância a ser analisada e outras análogas. A substância de interesse deve ter o sinal analítico isento de interferências que possam dar margem a não confiabilidade do resultado.⁸⁰ No presente

trabalho, a seletividade foi garantida de duas maneiras. Primeiramente, verificou-se a presença ou não de sobreposição nos espectros de massa entre os picos dos corantes (e seus produtos de degradação) e aqueles presentes no espectro de massa do papel sem tinta. Para cada página analisada de um documento, a subtração do espectro de massa do papel daquele correspondente às amostras com tinta proporcionou a redução do possível efeito de substâncias interferentes. Em segundo lugar, o fato de utilizarem-se equipamentos de alta resolução (TOF), com relação m/z exata até a quarta casa decimal, reduz de forma significativa a chance de sobreposição de picos interferentes no espectro de massas.

5.7 Análise dos dados obtidos por MS

Um dos corantes presentes na maioria das formulações de tinta das canetas esferográficas analisadas é o Violeta Cristal (Hexametilpararosnilina ou Basic Violet 3). O Violeta Cristal é um composto instável, sendo por isso bastante utilizado em estudos de datação de tintas.⁶¹ Pelo seu espectro de massa, é possível observar uma sequência de produtos de decomposição (penta-, tetra-, trimetilpararosnilina etc.), diferenciados por m/z 14 Da (alguns deles exibidos na Figura 5 do item 2.2.3.2). Essa diferença se dá devido à perda sucessiva de grupos metila, que são substituídos por átomos de hidrogênio.^{22, 59}

Os perfis de degradação dos corantes Victoria Blue B, também conhecido como Basic Blue 26, e do 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (Figura 7 do item 2.2.3.2) também apresentam essas perdas sucessivas de grupos metila. O corante Basic Blue 7 (Figura 6 do item 2.2.3.2) e Rodamina (6G e B) exibem uma sequência de produtos de degradação, cuja diferença em massa molecular corresponde à de uma etila (m/z 28). A Tabela 8 traz os dados referentes aos íons moleculares característicos para cada composto, com os valores de relação massa/carga exibidos com até duas casas decimais, por motivo de concisão na apresentação dos resultados.

O estudo de degradação dos corantes foi centralizado nesses cinco compostos, em função de sua maior ocorrência em canetas esferográficas. Devido ao término do prazo disponível para o trabalho experimental, não foi possível realizar as análises por MS/MS para diferenciar a Rodamina 6G e B.

O primeiro passo para início da análise de dados foi, após geração dos espectros de massa, observar quais desses compostos estavam presentes em cada uma das amostras analisadas, e verificar se havia produtos de degradação.

Tabela 8 - Razão m/z dos íons moleculares observados para cada corante

Corante	Razão m/z dos íons observados (Th)
1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina	268.18*, 254.16*, 240.15*, 226.13*, 212.12*
Violeta Cristal	372.24, 358.23, 344.21, 330.20, 316.18, 302.16, 288.15
Rodamina (6G e/ou B)	443.23, 415.20
Victoria Blue B	470.26, 456.24, 442.23, 428.21, 414.20
Basic Blue 7	478.32, 450.29, 422.26, 394.23

*Relação m/z com íon protonado.

A partir dos dados de área obtidos por integração dos picos de interesse no espectro de massas, foi calculada a porcentagem de área relativa para cada corante e seus produtos de degradação. Para exemplificar, a Figura 24 traz um espectro de massas gerado a partir de uma amostra conhecida e produzida no ano de 1985. É possível observar a presença dos corantes 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (m/z 268 Th) e Violeta Cristal (m/z 372 Th), e alguns de seus produtos de degradação.

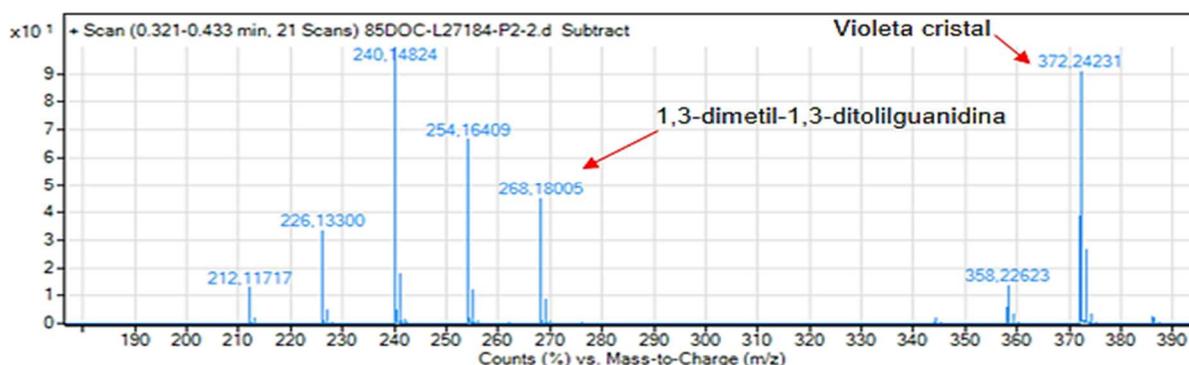


Figura 24 - Espectro de massa obtido para uma amostra produzida no ano de 1985.

Iniciando pelo 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, a área referente a cada pico (m/z 268, 254, 240, 226 e 212) foi obtida através do software de análise de dados do equipamento de massas e transferida para uma tabela do Microsoft Excel. Nessa tabela, o valor de área de todos os picos, de uma sequência de produtos de degradação, é normalizado a 100%. Dessa forma, a porcentagem de área de cada íon foi obtida pela razão entre a área individual de um dos

compostos de degradação e a área total dos íon do mesmo corante. Assim, os perfis de degradação dos corantes eram comparados a partir desse conjunto de informações de porcentagem de área.

5.8 Análise Quimiométrica

As análises quimiométricas foram realizadas por meio do programa Matlab versão 8.0.0.783 (R2012b) e funções do PLS *toolbox statistics*.

Resultados

6 Resultados

6.1 Figuras de mérito do método do TOF-MS

6.1.1 Repetitividade

Ensaio com boa repetitividade possuem baixos desvios, sendo realizados de maneira independente, com o mesmo método, com material de análise idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista e utilizando o mesmo equipamento.⁸⁰

O critério de aceitação para avaliação da repetitividade do método é, conforme Procedimento Operacional Padrão 11 do SEPLAB/INC/DPF, a obtenção de um coeficiente de variação (CV) menor que 10% para cada nível avaliado.

No ensaio de repetitividade, foram realizadas sete replicatas para cada uma das três canetas anteriormente escolhidas. A partir dos dados de porcentagem de área, adquiridos conforme descrito no item 5.7, foram calculados o desvio-padrão, o coeficiente de variação e a variância das medidas, para cada pico de cada corante.

É importante frisar que essas análises foram realizadas tanto no TOF do INC quanto no TripleTOF da UnB. Os resultados referentes às análises realizadas no INC constam nas tabelas 9, 10 e 11, enquanto que aqueles obtidos na UnB, nas tabelas 12, 13 e 14.

Pelos baixos valores de coeficiente de variação e desvio-padrão obtidos para a maioria das replicatas, é possível observar que o método apresenta boa repetitividade. No caso do pico cuja m/z é 330 Th, houve um aumento do coeficiente de variação, o que já era esperado, por ser o menor pico da série de degradação do Violeta Cristal, para as amostras analisadas. Houve também um acréscimo dos valores de desvio-padrão e CV para alguns íons no TripleTOF da UnB. Vários podem ser os motivos para essa diferença: o método precisou ser ajustado, pois eram equipamentos distintos; a sensibilidade do TripleTOF é superior à do TOF; a forma de integração dos picos para obtenção das áreas foi distinta, pois no software do INC a integração era feita manualmente, pico a pico, enquanto que na UnB as integrações eram geradas pelo programa, a partir de um intervalo de massas, que foi definido para cada pico levando em consideração sua massa exata. Não foi observado o íon de m/z igual a 442 Th (caneta 6), referente à degradação do Victoria Blue B, nos espectros obtidos no equipamento TripleTOF da UnB (Tabela 14). Provavelmente os parâmetros do método, ajustados para esse equipamento, foram responsáveis por essa diferença nos resultados obtidos na UnB e no INC.

Tabela 9 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Violeta Cristal – INC¹

Amostra	Compostos de degradação do Violeta Cristal (Th)	Média da % área	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Caneta 2	<i>m/z</i> 372	43,289%	0,002	0,4
	<i>m/z</i> 358	42,598%	0,002	0,5
	<i>m/z</i> 344	12,196%	0,001	0,8
	<i>m/z</i> 330	1,864%	0,001	6,5
Caneta 5	<i>m/z</i> 372	42,975%	0,005	1,2
	<i>m/z</i> 358	45,313%	0,008	1,7
	<i>m/z</i> 344	11,586%	0,004	3,1
	<i>m/z</i> 330	n.d.*	-	-
Caneta 6	<i>m/z</i> 372	43,496%	0,004	1,0
	<i>m/z</i> 358	42,954%	0,003	0,8
	<i>m/z</i> 344	12,094%	0,002	1,6
	<i>m/z</i> 330	1,538%	0,001	6,0

Tabela 10 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Basic Blue 7 – INC¹

Amostra	Compostos de degradação do Basic Blue 7 (Th)	Média da % área	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Caneta 5	<i>m/z</i> 478	97,553%	0,0009	0,09
	<i>m/z</i> 450	2,447%	0,0009	3,58

Tabela 11 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Victoria Blue B – INC¹

Amostra	Compostos de degradação do Victoria Blue B (Th)	Média da % área	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Caneta 6	<i>m/z</i> 470	75,058%	0,0015	0,20
	<i>m/z</i> 456	22,825%	0,0016	0,72
	<i>m/z</i> 442	2,117%	0,0014	7,01

¹ Valores de média e desvio-padrão obtidos para 7 replicatas.

*n.d.= não detectado.

Tabela 12 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Violeta Cristal – UnB²

Amostra	Compostos de degradação do Violeta Cristal (Th)	Média da % área	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Caneta 2	<i>m/z</i> 372	46,329%	0,006	1,3
	<i>m/z</i> 358	40,311%	0,005	1,3
	<i>m/z</i> 344	11,550%	0,004	3,2
	<i>m/z</i> 330	1,916%	0,002	9,1
Caneta 5	<i>m/z</i> 372	43,608%	0,012	2,6
	<i>m/z</i> 358	44,234%	0,012	2,8
	<i>m/z</i> 344	10,549%	0,002	1,7
	<i>m/z</i> 330	1,358%	0,001	5,1
Caneta 6	<i>m/z</i> 372	47,554%	0,005	1,0
	<i>m/z</i> 358	39,361%	0,006	1,6
	<i>m/z</i> 344	11,630%	0,004	3,1
	<i>m/z</i> 330	1,471%	0,000	1,7

Tabela 13 - Resultados dos ensaios de repetitividade para o Basic Blue 7 – UnB²

Amostra	Compostos de degradação do Basic Blue 7 (Th)	Média da % área	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Caneta 5	<i>m/z</i> 478	98,328%	0,0005	0,05
	<i>m/z</i> 450	1,625%	0,0005	2,81

Tabela 14- Resultados dos ensaios de repetitividade para o Victoria Blue B – UnB²

Amostra	Compostos de degradação do Victoria Blue B (Th)	Média da % área	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Caneta 6	<i>m/z</i> 470	81,274%	0,003629	0,44
	<i>m/z</i> 456	18,523%	0,003382	1,82
	<i>m/z</i> 442	n.d.*	-	-

² Valores de média e desvio-padrão obtidos para 7 replicatas.

*n.d.= não detectado

Para detecção de *outliers* (resultados anômalos), foi realizado o teste-Q, com 95% nível de confiança, para todas as medidas de todas as canetas obtidas nos dois equipamentos (UnB e INC). Não foram identificados dados que precisassem ser rejeitados, pois $Q_{cal} < Q_{critico}$.

6.1.2 Precisão intermediária

Para os ensaios de precisão intermediária, dois operadores realizaram o mesmo procedimento de amostragem de lançamentos idênticos preparados com as três canetas. As tabelas 15 a 17 trazem os resultados de desvio-padrão e coeficiente de variação das medidas obtidas no TOF do INC, para as três canetas, respectivamente. Os resultados obtidos no TripleTOF da UnB estão apresentados nas tabelas 18 a 20. De acordo esses dados, percebe-se que o método possui uma boa reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária), pois os valores dos CV foram baixos, ficando menores que 10%, exceto para o íon m/z 330 Th da caneta 2 (Analista 2). Assim como foi observado nos resultados de repetitividade, no caso de íons com área muito pequena, é esperado que o seu CV seja maior.

Pelo teste t de *Student*, para um nível de confiança de 95%, foi possível comprovar que a média dos resultados obtidos pelos dois analistas, para as três canetas, utilizando o mesmo equipamento, são iguais.

Tabela 15 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 2 - INC³

Caneta 2	Íons (Th)	Analista 1			Analista 2		
		Média (%)	Desvio-padrão (%)	Coeficiente de Variação (%)	Média (%)	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
Compostos de degradação do Violeta Cristal	m/z 372	43,78	0,0034	0,78	44,26	0,0046	1,04
	m/z 358	42,46	0,0027	0,65	42,01	0,0068	1,62
	m/z 344	12,04	0,0010	0,86	11,94	0,0028	2,37
	m/z 330	1,72	0,0009	4,95	1,79	0,0019	10,38

³ Valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação obtidos para triplicatas.

Tabela 16 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a caneta 5 - INC⁴

Caneta 5	Íons (Th)	Analista 1			Analista 2		
		Média (%)	Desvio-padrão (%)	Coefficiente de Variação (%)	Média (%)	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Compostos de degradação do Violeta Cristal	<i>m/z</i> 372	43,12	0,0040	0,93	42,46	0,0050	1,18
	<i>m/z</i> 358	45,97	0,0067	1,45	46,52	0,0073	1,58
	<i>m/z</i> 344	10,91	0,0027	2,49	11,03	0,0023	2,11
	<i>m/z</i> 330	n.d.*	-	-	-	-	-
Compostos de degradação do Basic Blue 7	<i>m/z</i> 478	97,67	0,0003	0,03	97,62	0,0005	0,05
	<i>m/z</i> 450	2,33	0,0003	1,27	2,38	0,0005	1,90

Tabela 17 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 6 - INC⁴

Caneta 6	Íons (Th)	Analista 1			Analista 2		
		Média (%)	Desvio-padrão (%)	Coefficiente de Variação (%)	Média (%)	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Compostos de degradação do Violeta Cristal	<i>m/z</i> 372	43,08	0,0037	0,85	43,62	0,0028	0,64
	<i>m/z</i> 358	42,70	0,0036	0,85	42,71	0,0050	1,17
	<i>m/z</i> 344	12,81	0,0074	5,81	12,14	0,0017	1,41
	<i>m/z</i> 330	1,41	0,0011	7,69	1,51	0,0013	8,27
Compostos de degradação do Victoria Blue B	<i>m/z</i> 470	73,40	0,0089	1,22	73,74	0,0032	0,43
	<i>m/z</i> 456	24,30	0,0077	3,18	23,93	0,0021	0,87
	<i>m/z</i> 442	2,31	0,0012	5,27	2,33	0,0013	5,43

Tabela 18 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 2 – UnB⁴

Caneta 2	Íons (Th)	Analista 1			Analista 2		
		Média (%)	Desvio-padrão (%)	Coefficiente de Variação (%)	Média (%)	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Compostos de degradação do Violeta Cristal	<i>m/z</i> 372	49,10	0,0037	0,76	49,01	0,0103	2,11
	<i>m/z</i> 358	37,81	0,0020	0,54	37,60	0,0084	2,23
	<i>m/z</i> 344	11,37	0,0031	2,74	11,64	0,0014	1,19
	<i>m/z</i> 330	1,72	0,0005	2,91	1,75	0,0007	4,09

⁴ Valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação obtidos para triplicatas.

*n.d.= não detectado

Tabela 19 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 5 – UnB⁵

Caneta 5	Íons (Th)	Analista 1			Analista 2		
		Média (%)	Desvio-padrão (%)	Coefficiente de Variação (%)	Média (%)	Desvio-padrão	Coefficiente e de Variação (%)
Compostos de degradação do Violeta Cristal	<i>m/z</i> 372	45,48	0,0084	1,84	46,21	0,0029	0,63
	<i>m/z</i> 358	42,65	0,0049	1,14	41,83	0,0064	1,53
	<i>m/z</i> 344	10,54	0,0033	3,11	10,68	0,0041	3,80
	<i>m/z</i> 330	1,33	0,0003	2,27	1,28	0,0003	2,39
Compostos de degradação do Basic Blue 7	<i>m/z</i> 478	98,42	0,0005	0,05	98,40	0,0004	0,04
	<i>m/z</i> 450	1,53	0,0004	2,69	1,56	0,0002	1,58

Tabela 20 - Resultados dos ensaios de precisão intermediária para a Caneta 6 – UnB⁵

Caneta 6	Íons (Th)	Analista 1			Analista 2		
		Média (%)	Desvio-padrão (%)	Coefficiente de Variação (%)	Média (%)	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Compostos de degradação do Violeta Cristal	<i>m/z</i> 372	47,77	0,0083	1,73	47,84	0,0076	1,58
	<i>m/z</i> 358	38,51	0,0087	2,27	38,64	0,0109	2,83
	<i>m/z</i> 344	12,24	0,0043	3,48	12,03	0,0073	6,07
	<i>m/z</i> 330	1,49	0,0007	4,56	1,50	0,0007	4,58
Compostos de degradação do Victoria Blue B	<i>m/z</i> 470	79,90	0,0045	0,57	80,68	0,0047	0,59
	<i>m/z</i> 456	19,87	0,0046	2,32	19,13	0,0042	2,19

6.1.3 Reprodutibilidade

Nessa etapa, foram analisadas triplicatas para cada uma das três canetas, variando alguns fatores: analistas diferentes (analista 1 e 3), equipamentos (TOF do INC e Q-TOF do IC/PDCF) e em momentos distintos. Os cálculos foram restritos ao corante Violeta Cristal e seus produtos de degradação, por estarem presentes em todas as canetas e para facilitar a comparação de resultados. Foi realizado teste t de *Student* (nível de confiança de 95%) para comparar as médias das porcentagens de área, para todos os corantes e seus produtos de degradação, comparando os resultados obtidos nas duas condições (TOF e Analista 1, Q-TOF e Analista 3). A aplicação do teste-F revelou a igualdade de variâncias em todas as

⁵ Valores da média e desvio-padrão obtidos para triplicatas.

comparações, exceto no caso dos picos com m/z 344 da caneta 5 e m/z 330 da caneta 6. Para esses dois casos, as devidas correções no número de graus de liberdade foram efetuadas no cálculo do teste t de *Student*. Todos os valores obtidos foram inferiores aos valores críticos da distribuição- t , portanto, a hipótese nula é aceita em um nível de confiança de 95%. Pode-se concluir que não há diferença entre as proporções de áreas obtidas nos dois laboratórios e com analistas diferentes. As tabelas 21 a 23 trazem os resultados dos ensaios de reprodutibilidade.

Tabela 21 - Resultados dos ensaios de reprodutibilidade para a caneta 2⁶

Caneta 2	Íons (Th)	Analista 1/ TOF		Analista 3/ Q-TOF		$t_{\text{calculado}}$	Graus de liberdade	$t_{\text{crítico}}$
		Média (%)	Desvio-padrão	Média (%)	Desvio-padrão			
Compostos de degradação do Violeta Cristal	m/z 372	43,78	0,0034	41,68	0,0371	0,97	4	2,78
	m/z 358	42,46	0,0027	42,42	0,0207	0,03	4	2,78
	m/z 344	12,04	0,0010	13,25	0,0254	-0,82	4	2,78
	m/z 330	1,72	0,0008	2,65	0,0080	-1,99	4	2,78

Tabela 22 - Resultados dos ensaios de reprodutibilidade para a caneta 5⁶

Caneta 5	Íons (Th)	Analista 1/ TOF		Analista 3/ Q-TOF		$t_{\text{calculado}}$	Graus de liberdade	$t_{\text{crítico}}$
		Média (%)	Desvio-padrão	Média (%)	Desvio-padrão			
Compostos de degradação do Violeta Cristal	m/z 372	43,12	0,0040	41,34	0,0039	0,77	4	2,78
	m/z 358	45,97	0,0066	46,75	0,0310	-0,42	4	2,78
	m/z 344	10,91	0,0027	11,90	0,0088	-1,85	2	4,30

Tabela 23 - Resultados dos ensaios de reprodutibilidade para a caneta 6⁶

Caneta 6	Íons (Th)	Analista 1/ TOF		Analista 3/ Q-TOF		$t_{\text{calculado}}$	Graus de liberdade	$t_{\text{crítico}}$
		Média (%)	Desvio-padrão	Média (%)	Desvio-padrão			
Compostos de degradação do Violeta Cristal	m/z 372	43,08	0,0037	41,03	0,0127	-2,68	4	2,78
	m/z 358	42,71	0,0036	42,91	0,0074	0,44	4	2,78
	m/z 344	12,81	0,0074	13,47	0,0199	0,54	4	2,78
	m/z 330	1,41	0,0011	2,59	0,0060	3,34	2	4,30

⁶ Valores de média e desvio-padrão obtidas para triplicatas.

As mesmas amostras que foram preparadas pelo Analista 3 para o ensaio de reprodutibilidade, analisadas no Q-TOF do IC/PCDF, foram submetidas ao TOF, em outro momento. Dessa forma, a comparação de média foi realizada, considerando como variáveis o operador (Analista 1 e 3) e o momento em que as amostras foram preparadas e analisadas. Pelos resultados do teste-t, todas as médias podem ser consideradas equivalentes, exceto a obtida para o íon m/z 330 Th da caneta 2, que apresentou $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$, para um nível de confiança de 95%.

6.1.4 Seletividade

Com a subtração dos picos referentes aos íons dos compostos presentes no substrato (papel) dos espectros de massa das amostras de tinta, observa-se que a interferência dos compostos presentes na composição do papel era anulada.

6.2 Amostras de tinta de laudos do INC

6.2.1 Panorama das amostras

Foram coletadas 604 amostras de lançamentos de tinta esferográfica em laudos do INC produzidos a partir de 1962 até 2014, conforme a Tabela 4 do item 5.2. Todas as amostras foram analisadas por espectrometria de massas e, a partir dos dados obtidos, foram selecionadas as que cumpriram dois requisitos: presença dos corantes objeto de estudo e valor de razão isotópica do pico mais intenso condizente com o esperado.

Vinte e nove (29) amostras apresentaram, além dos íons correspondentes aos corantes conhecidos, um único íon em m/z 240 Th. Esse íon normalmente aparece na perda sequencial de metilas (m/z 268, 254, 240 Th) da 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, devido à fotodegradação oxidativa. Ng *et al.*⁵ relatou a presença desse único íon, sem a presença dos outros homólogos, na formulação de algumas tintas de canetas, e o considerou como a ditolilguanidina (m/z 240), um dos produtos da degradação da 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina. Como não há informações a respeito da formulação inicial das tintas das canetas analisadas e não foram utilizadas outras técnicas para elucidação das estruturas, não é possível afirmar que esse íon, sozinho, realmente se refere ao composto ditolilguanidina. A Figura 25 traz o espectro de massas de uma amostra de 1986, onde observa-se a presença do íon m/z 240 isolado, sem os demais compostos de degradação da 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina.

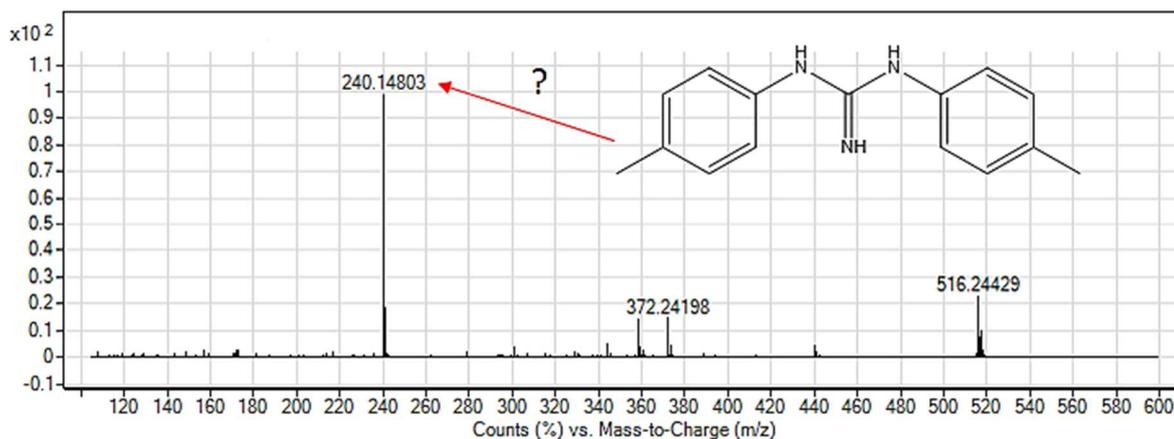


Figura 25 – Espectro de massas de uma amostra que contém o íon m/z 240 isolado e a possível estrutura desse composto

Outra anormalidade observada nos espectros de dezoito amostras foi a perda sucessiva de grupos etila a partir do precursor de m/z 268. A Figura 26 mostra o espectro de massas de uma amostra de 2002 que apresenta essa característica. Por apresentar comportamento de degradação distinto do observado para a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, não se pode afirmar se as estruturas referentes aos íons m/z 268, 240 e 212 correspondem às aril guanidinas ilustradas na figura 7 do item 2.2.3.2. Existem algumas possíveis explicações para esse comportamento distinto. Uma delas pode estar relacionada ao fato de que a formulação inicial da tinta (desconhecida) já contivesse os compostos correspondentes aos íons observados. Uma outra hipótese é a ocorrência de degradação com perda de grupamentos etila ligadas a nitrogênio, partindo de um composto como o 1,3-dietil-1,3-difenilguanidina (m/z 268), mostrado na Figura 27. Estudos cinéticos de degradação em condições controladas poderiam fornecer maiores esclarecimentos a respeito desse fenômeno.

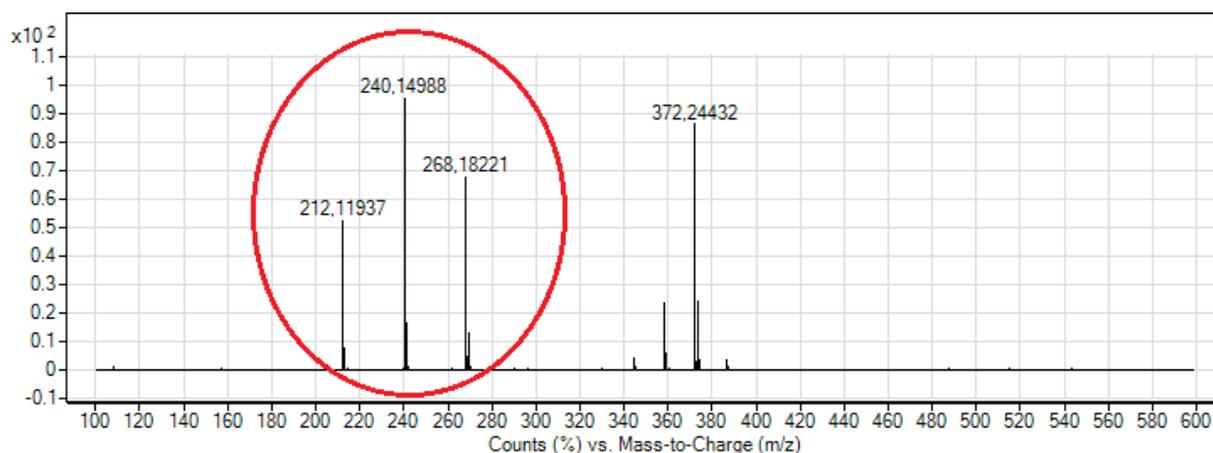


Figura 26 - Espectro de massas de uma amostra com íons m/z 268, 240 e 212 Th.

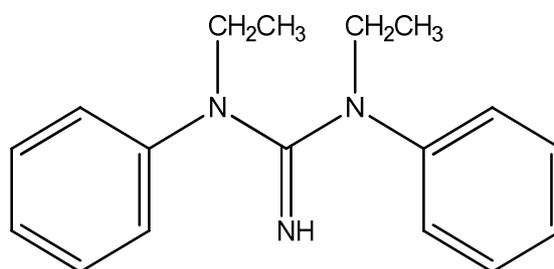


Figura 27 - Estrutura do composto 1,3-dietil-1,3-difenilguanidina

Devido ao término do prazo para o trabalho experimental, não foi possível realizar experimentos MS/MS para elucidar as estruturas referentes aos íons ilustrados nas Figuras 25 e 26. Por isso, as amostras que apresentaram esses comportamentos não explicados foram excluídas do banco de dados utilizado para determinação de correlação entre amostras. Um estudo mais detalhado desses casos deverá ser realizado em pesquisas futuras. A Tabela 24 traz o total de amostras excluídas, em cada caso, e a distribuição dessas amostras nas diferentes décadas.

Pelo critério da razão isotópica, foram excluídas 25 amostras do banco de dados, pois seus corantes com picos mais intensos apresentaram valores de A_{M+1}/A_M maiores do que a média obtida nos ensaios de validação \pm três desvios padrões. Além disso, os valores calculados nesses casos estavam acima dos valores teóricos.

Vinte e sete (27) amostras não apresentaram os corantes de interesse ou os espectros não possibilitaram a visualização dos corantes, portanto foram desconsideradas no estudo. Considerando então todos os requisitos, foram excluídas do banco de dados 99 amostras, cerca de 16% do total de amostras de lançamentos de caneta selecionados.

Tabela 24 - Total de amostras excluídas do banco de dados pela presença de m/z 240 isolado e da sequência m/z 268, 240 e 212 e a distribuição dessas amostras, por década

Íons presentes (Th)	Total de amostras	Década de 60	Década de 70	Década de 80	Década de 90	Década de 2000
m/z 240	29	7 (24,14%)	11 (37,93%)	3 (10,34%)	8 (27,59%)	-
m/z 268, 240 e 212	18	5 (27,78%)	1 (5,55%)	-	-	12 (66,67%)

Das 505 amostras de tinta de caneta que foram selecionadas para o estudo, 384 são da cor azul, enquanto que 121 são da cor preta. Essa distinção de cores foi feita apenas visualmente. Na amostragem, foi dado preferência a lançamentos de tinta esferográfica azul, por serem as de uso mais comum no dia-a-dia. A Figura 28 ilustra a quantidade de amostras por cores em porcentagem.

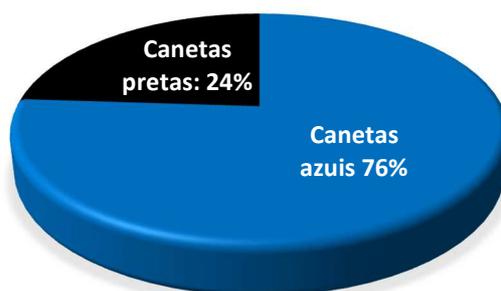


Figura 28 - Distribuição das cores das amostras de tinta de caneta obtidas dos laudos

Dentro do conjunto de 505 amostras de canetas esferográficas, foram observadas 15 formulações distintas de tintas. A distribuição das composições de corantes está ilustrada na Figura 29. Cento e sessenta e cinco (165) amostras apresentaram unicamente os corantes 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC). Essa é a composição majoritária e está presente em todos os anos selecionados para esse estudo. Em segundo lugar de abundância está a formulação Violeta Cristal e Victoria Blue B (CV), identificada em 99 amostras. Na terceira posição está a composição contendo 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rodamina e Basic Blue 7 (GRB). Todas as sessenta e seis amostras identificadas com essa última formulação são da cor preta. As formulações Basic Blue 7 (B) e Violeta Cristal (C) apareceram em 43 e 40

amostras, respectivamente. As outras formulações apareceram em menores proporções, como ilustrado na figura a seguir.

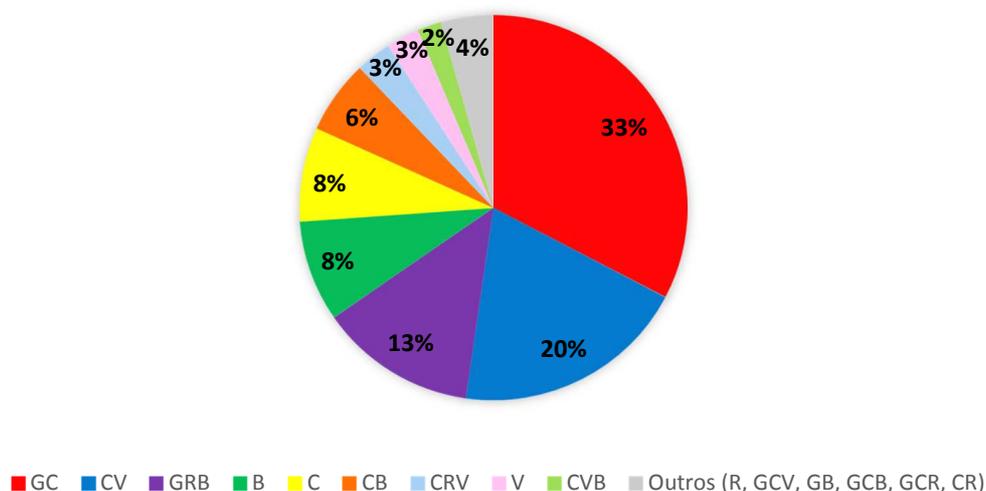


Figura 29 - Proporção de todas as formulações de tintas detectadas, onde G=1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, C=Violeta Cristal, V = Victoria Blue B, B=Basic Blue 7 e R= Rodamina

As Tabelas 25 e 26 apresentam todas as combinações de corantes detectadas, o número máximo de picos identificados, a quantidade de amostras, por década, para cada formulação e o total de amostras analisadas em cada década, para canetas azuis e pretas, respectivamente. Observa-se que, na amostragem realizada, a composição de corantes GC se destaca por estar presente em maior número nas tintas dos documentos produzidos nas décadas de 60, 70, 80 e 90. Cerca de 47% das amostras da década de 90 apresentaram essa formulação.

Pelos dados da tabela, pode-se perceber que as canetas pretas amostradas possuem, predominantemente, a formulação GRB (100%) e C (87,5%). Em contrapartida, as canetas azuis apresentam composições de corantes mais variadas.

A Rodamina (6G e/ou B), normalmente encontrada em tintas de canetas vermelhas²², também está presente em canetas azuis e pretas. Chama atenção a presença de picos únicos no espectro de massas referentes a essa substância em canetas azuis utilizadas na década de 60. Esse fenômeno pode ser explicado pela estabilidade dessa substância, que será discutida posteriormente. Importante lembrar que colorantes que não sejam solúveis em metanol ou que não sejam facilmente ionizados pela fonte ESI podem estar presentes nas tintas, mas não serão detectados pela técnica escolhida para esse estudo.

Tabela 25 - Distribuição das formulações de canetas azuis por década

Formulação	Nº de picos máx.	% conforme coloração da tinta	Quantidade de lançamentos de tinta de canetas azuis por década						Total de canetas azuis por formulação
		Canetas Azuis	1960 a 1968	1970 a 1978	1980 a 1988	1990 a 1998	2000 a 2008	2010 a 2014	
GC	13	98,2%	12	26	40	55	18	11	162
CV	13	96%	2	3	2	21	30	37	95
GRB	10	0%	-	-	-	-	-	-	0
B	3	88,4%	7	21	5	3	-	2	38
C	5	12,5%	-	-	-	1	4	-	5
CB	10	96,8%	11	6	3	0	2	8	30
CRV	11	93,3%	-	-	-	1	11	2	14
V	5	78,6%	5	2	1	2	-	1	11
CVB	12	100%	8	1	-	-	1	-	10
R	3	100%	7	-	-	-	-	-	7
GCV	14	100%	1	4	1	-	-	-	6
GB	8	66,7%	-	2	-	-	-	-	2
GCB	12	100%	3	-	-	-	-	-	3
GCR	13	50%	-	-	1	-	-	-	1
CR	6	0%	-	-	-	-	-	-	0
Total de amostras por década			56	65	53	83	66	61	384

G=1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, C=Violeta Cristal, V = Victoria Blue B, B=Basic Blue 7 e R= Rodamina

Tabela 26 - Distribuição das formulações de canetas pretas por década

Formulação	Nº de picos máx.	% conforme coloração da tinta	Quantidade de lançamentos de tinta de caneta preta por década						Total de canetas pretas por formulação
		Canetas Pretas	1960 a 1968	1970 a 1978	1980 a 1988	1990 a 1998	2000 a 2008	2010 a 2014	
GC	13	1,8%	-	-	2	1	-	-	3
CV	13	4,0%	-	-	-	-	2	2	4
GRB	10	100%	-	7	27	31	1	-	66
B	3	11,6%	2	3	-	-	-	-	5
C	5	87,5	3	7	-	3	17	10	35
CB	10	3,2%	-	-	-	1	-	-	1
CRV	11	6,7%	-	-	-	-	1	-	1
V	5	21,4%	-	3	-	-	-	-	3
CVB	12	0%	-	-	-	-	-	-	0
R	0	0%	-	-	-	-	-	-	0
GCV	0	0%	-	-	-	-	-	-	0
GB	8	33,3%	-	-	-	1	-	-	1
GCB	12	0%	-	-	-	-	-	-	0
GCR	13	50%	-	-	-	-	-	1	1
CR	6	100%	-	-	-	-	-	1	1
Total de amostras por década			5	20	29	36	17	14	121

G=1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, C=Violeta Cristal, V = Victoria Blue B, B=Basic Blue 7 e R= Rodamina

Das amostras de tintas coletadas em lançamentos gráficos entre os anos de 2010 e 2014, mais de 50% contêm os corantes CV, um quadro totalmente diferente do observado na década de 60, onde essa formulação correspondeu a menos de 4% das amostras coletadas desse período. Esse tipo de informação, que vincula tipos de formulação de tinta a prevalência temporal, aliada a outros exames periciais e subsídios da investigação, pode ser de grande valia na formação de convicção, por parte dos peritos criminais, a respeito da idade de documentos questionados.

A Figura 30 ilustra o emprego das formulações de tintas mais representativas no decorrer das décadas, de acordo com a amostragem realizada. Pode-se observar uma tendência de crescimento do uso da formulação de corantes CV a partir da década de 80. Em contrapartida, é possível inferir que a formulação GRB, muito comum em tintas de caneta preta até meados da década de 90, vem se tornando obsoleta, já que nenhuma das tintas pretas analisadas, presentes nos laudos produzidos entre 2010 e 2014, apresentaram essa combinação de corantes.

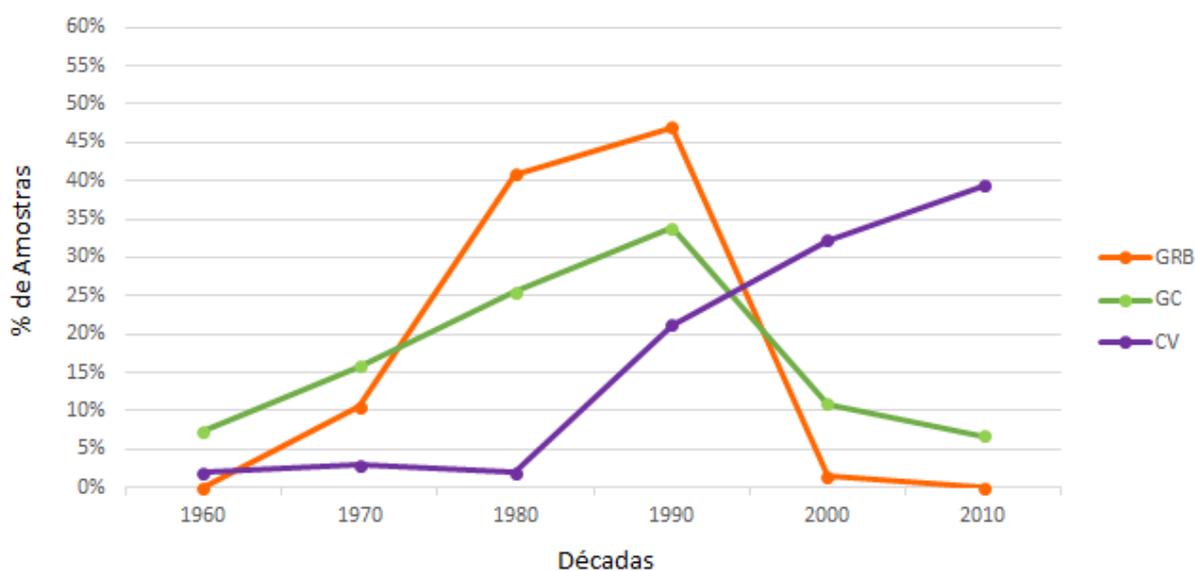


Figura 30 - Emprego das formulações de tintas mais representativas durante as décadas

Levando em consideração apenas a presença ou ausência dos corantes estudados em cada um dos lançamentos extraídos dos laudos, percebe-se uma maior inserção dos corantes Violeta Cristal e da 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina nas formulações de caneta esferográfica. A Figura 31 ilustra a proporção dos corantes nas tintas estudadas. Das 505 amostras de tinta de caneta, 372 canetas continham o corante Violeta Cristal, cerca de 74% do total de canetas

estudadas. Como já era esperado, a Rodamina é o corante menos utilizado na composição das tintas de canetas pretas e azuis.

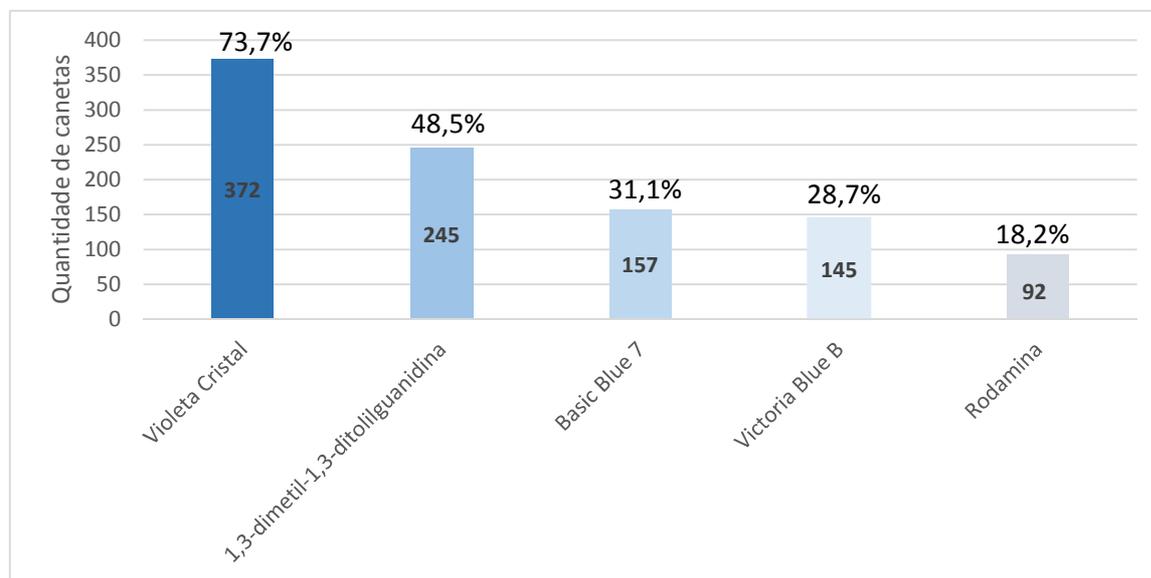


Figura 31 - Presença de corantes nas tintas extraídas dos laudos

6.2.2 Perfis de degradação dos corantes com o decorrer do tempo

Após adquirir os espectros de massa de cada amostra, foi verificada a presença dos corantes de interesse, cujos íons moleculares característicos foram mostrados na tabela 7 do item 5.6. Foi possível observar que alguns corantes sofrem degradação ao longo do tempo e outros se mantêm estáveis, mesmo durante várias décadas.

Iniciando pela 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, observa-se uma acentuada diminuição do pico precursor m/z 268 Th com o passar dos anos e um surgimento e/ou aumento dos seus homólogos demetilados. Para exemplificar, a Figura 32 mostra a diferença entre espectros de massa de uma amostra de tinta de um documento datado de 1986 e outro de 2012. Na primeira, observam-se vários íons, característicos da degradação do precursor m/z 268 Th, enquanto que na amostra de 2012, apenas o pico referente à 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina foi encontrado. Portanto, existe grande perspectiva do uso desse composto como marcador para datação de tintas.

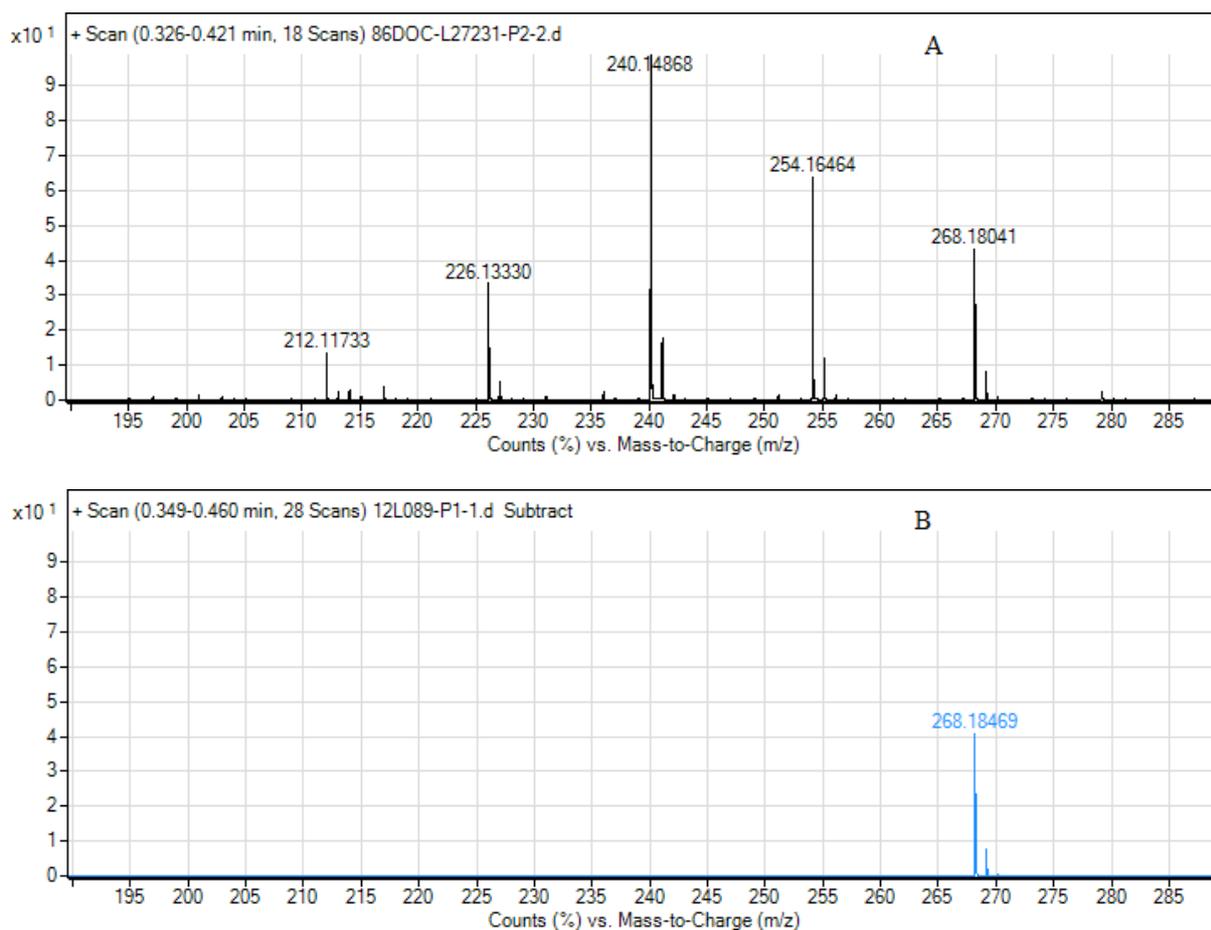


Figura 32 - Espectros de massas: A) Amostra de tinta em documento de 1986; B) Amostra de tinta em documento de 2012.

O Violeta Cristal apresenta um processo de degradação menos intenso com o passar do tempo, pois normalmente observam-se os três primeiros picos referentes ao precursor e seus compostos demetilados, tanto em amostras recentes como em amostras antigas. É possível especular que formulações de tintas comerciais à base de Violeta Cristal já contenham em sua composição inicial produtos de degradação inerentes ao processo de fabricação. Esse fato é corroborado pela ocorrência de produtos de degradação em uma tinta fresca utilizada na etapa de validação desse trabalho (Anexo 2, figura 2.1a). A Figura 33 mostra dois espectros de massas: o primeiro de uma amostra de tinta de um documento produzido em 1962 e o segundo de um documento de 2002. A diferença principal ocorre na proporção das áreas desses picos com o tempo. Tintas mais antigas tendem a possuir maiores picos em m/z 358 Th e 344 Th quando comparadas as mais recentes. Ferreira e colaboradores³⁹, observaram, para um estudo de degradação com condições controladas (72h de exposição à luz), que o Violeta Cristal mostra um processo de degradação mais acentuado do que a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina. Essa

informação não vai de encontro à degradação natural de corantes, em condições não controladas, avaliadas nesse trabalho.

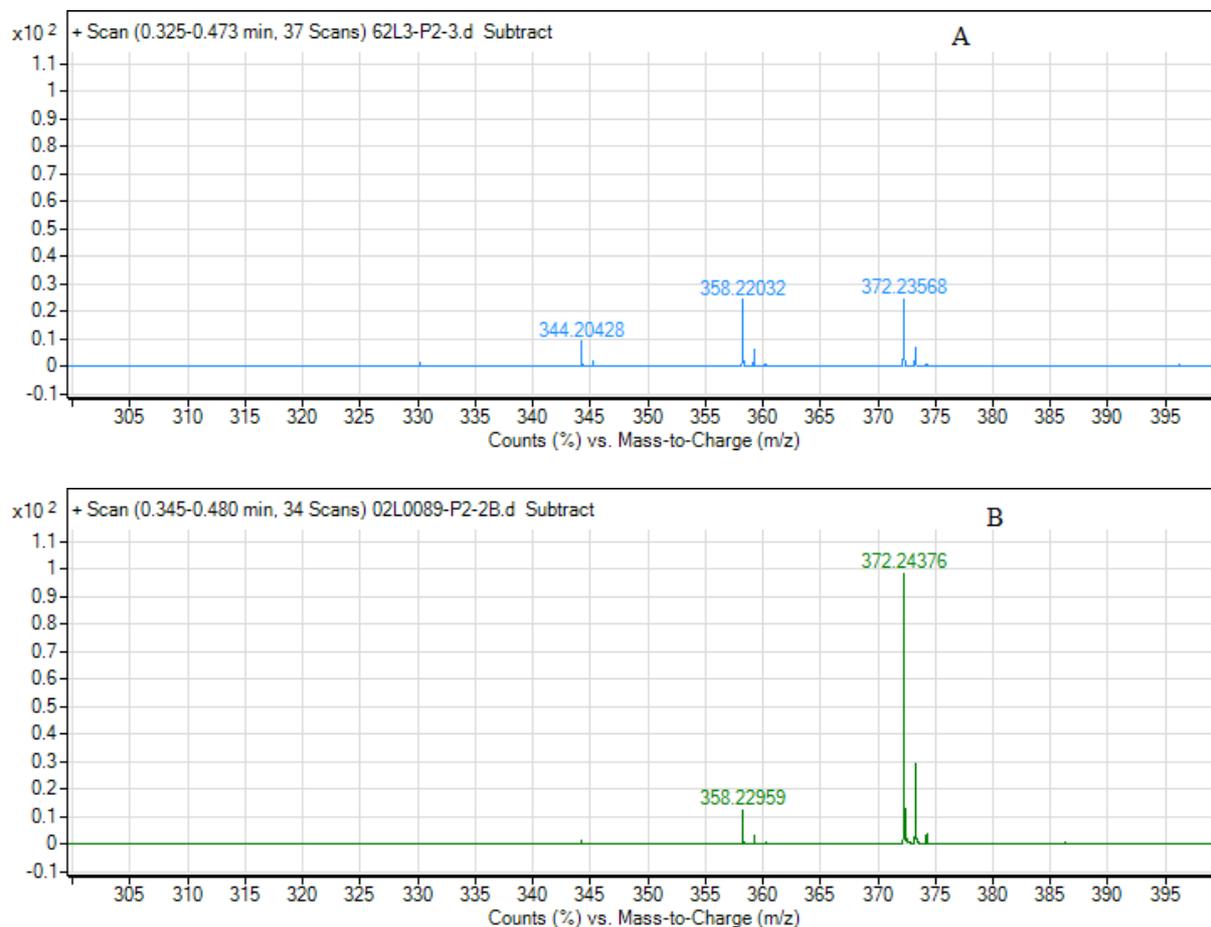


Figura 33 - Espectros de massas: A) Amostra de tinta em laudo de 1962; B) Amostra de tinta em laudo de 2002.

Pelos estudos realizados no presente trabalho, observou-se que a Rodamina (6G e B) não sofre degradação oxidativa suficiente que possibilite mensurar a idade de lançamento de uma tinta. Nas amostras analisadas, esse corante apresentou uma maior estabilidade diante dos diversos fatores ambientais que interferem na degradação da tinta. A Figura 34 possível perceber apenas um pequeno pico de m/z 415 que corresponde à perda de uma etila da Rodamina. Seria esperado que esse corante, presente em uma tinta lançada há mais de cinquenta anos, apresentasse uma sequência maior de substituição de grupos etila por hidrogênio nos grupos amino da molécula. No entanto, o que se observa é um perfil de degradação muito semelhante quando comparamos amostras de décadas muito distintas.

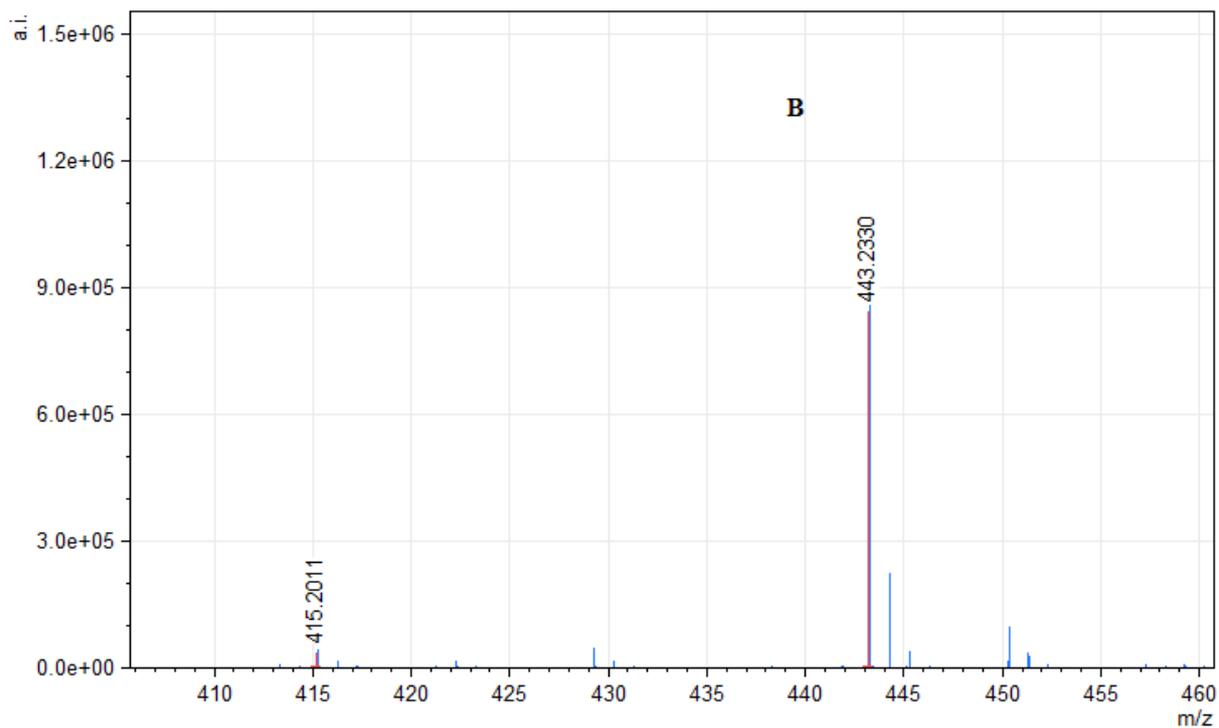
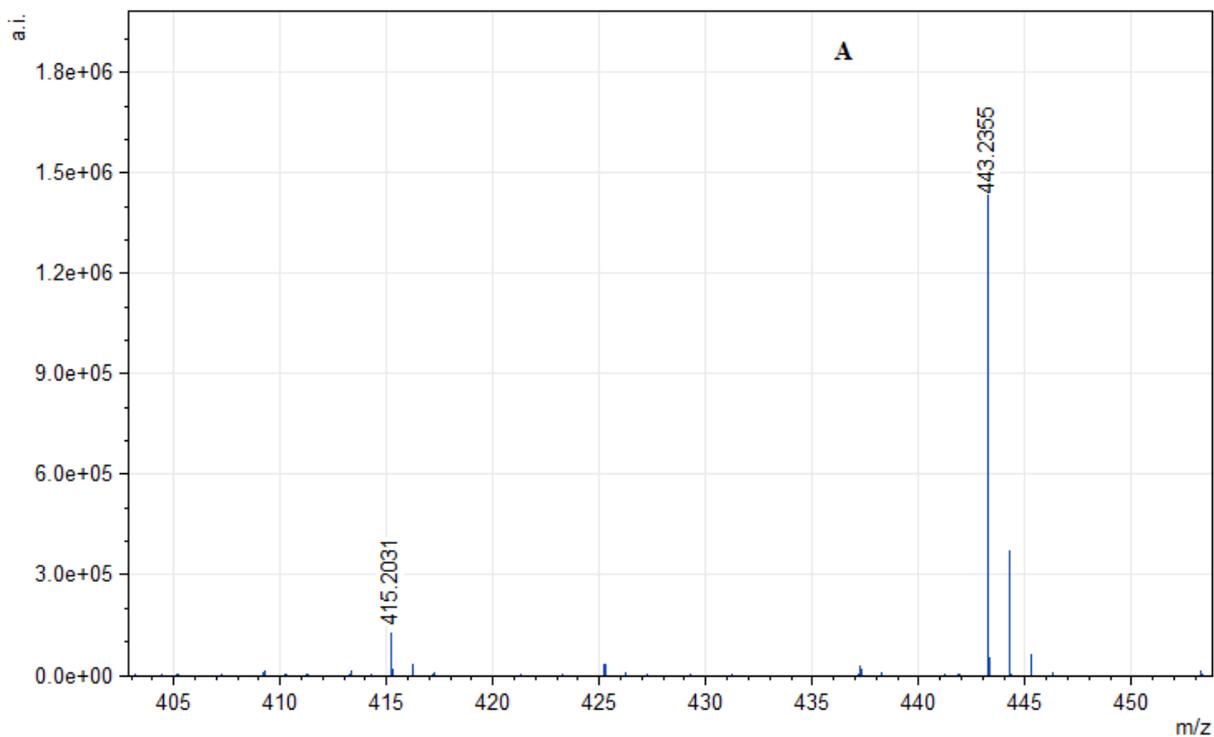


Figura 34 - Espectros de massas: A) Amostra de tinta em laudo de 1964; B) Amostra de tinta em laudo de 2004.

Comportamento semelhante foi verificado para o corante Basic Blue 7. A perda de grupos etila também se mostrou lenta com o tempo. Por exemplo, no espectro de massas de

uma amostra de tinta de laudo de 1962 (Figura 35A), são vistos dois picos (m/z 450 e m/z 422) de área e intensidade muito pequenas quando comparados ao precursor. Para uma amostra de tinta lançada em 2014 (Figura 35B) também é observada a presença de um pico referente ao primeiro produto de degradação do Basic Blue 7 (m/z 450), mas com intensidade muito pequena quando comparada ao íon principal (m/z 478). Tanto na estrutura da Rodamina como do Basic Blue 7, existem átomos de nitrogênio ligados a grupos etila. A quebra dessa ligação se mostra lenta, mesmo com passar de várias décadas.

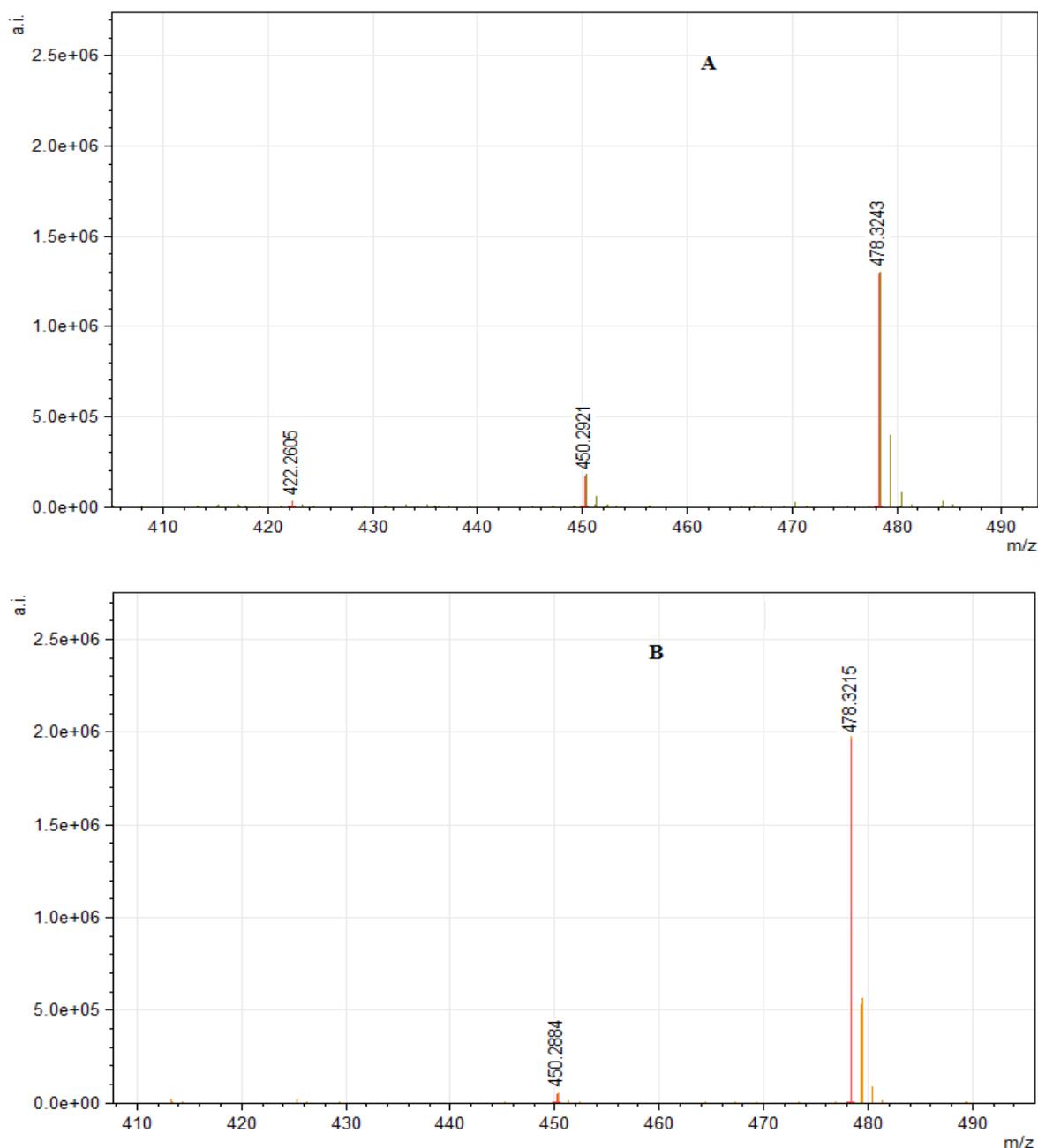


Figura 35 - Espectros de massas: A) Amostra de tinta extraída de um laudo de 1962; B) Amostra de tinta em laudo de 2014.

O corante Victoria Blue B apresenta comportamento de degradação um pouco mais lento em relação ao Violeta Cristal. Em amostras recentes, como mostrado na Figura 36B, é possível verificar a presença de um pico (m/z 456) referente a perda de uma metila. Já em amostras antigas (Figura 36A), observa-se, além do pico em m/z 456, um outro de menor intensidade (m/z 442), que evidencia a perda de mais um metila. Como no caso do Violeta Cristal, a diferença no perfil de degradação com o tempo está na proporção de áreas de cada um dos íons.

Com essas informações obtidas de degradação com o tempo, a partir do banco de dados que foi construído, pode-se inferir que os compostos que apontam para melhores resultados como marcadores para datação de documentos são a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, o Violeta Cristal e o Victoria Blue B. No item seguinte serão explanados os resultados das correlações entre amostras para as diversas formulações encontradas.

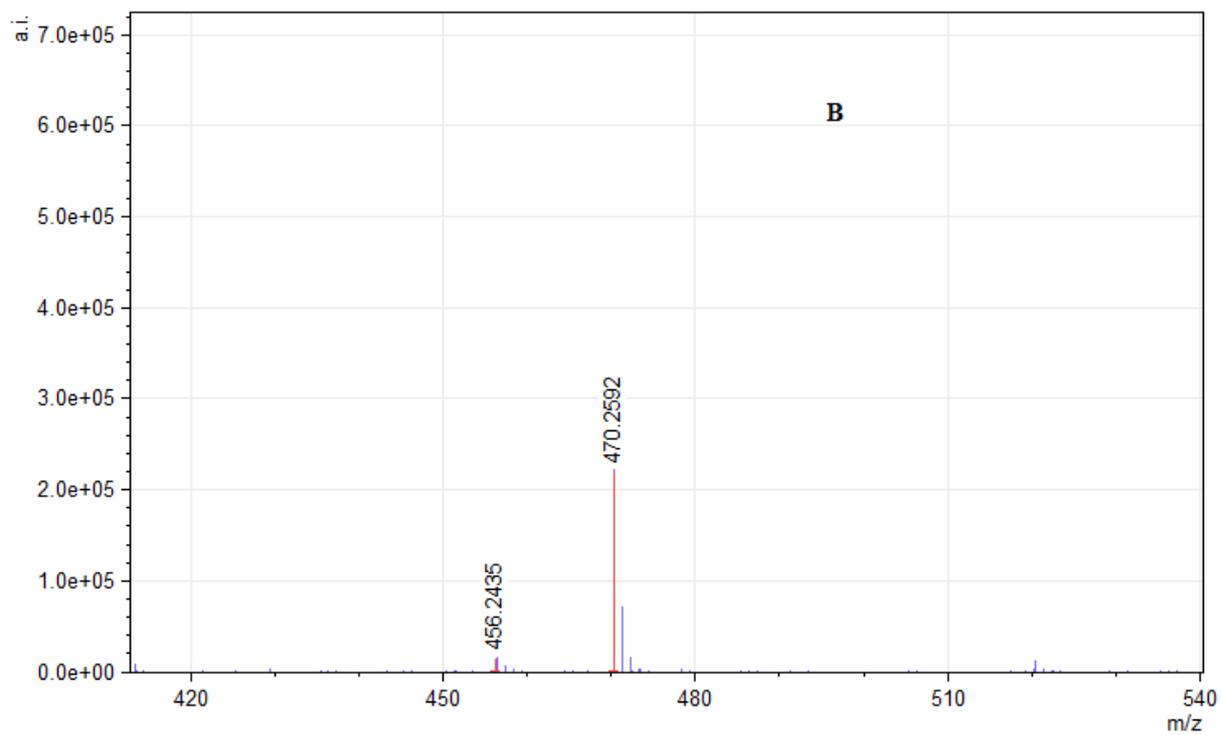
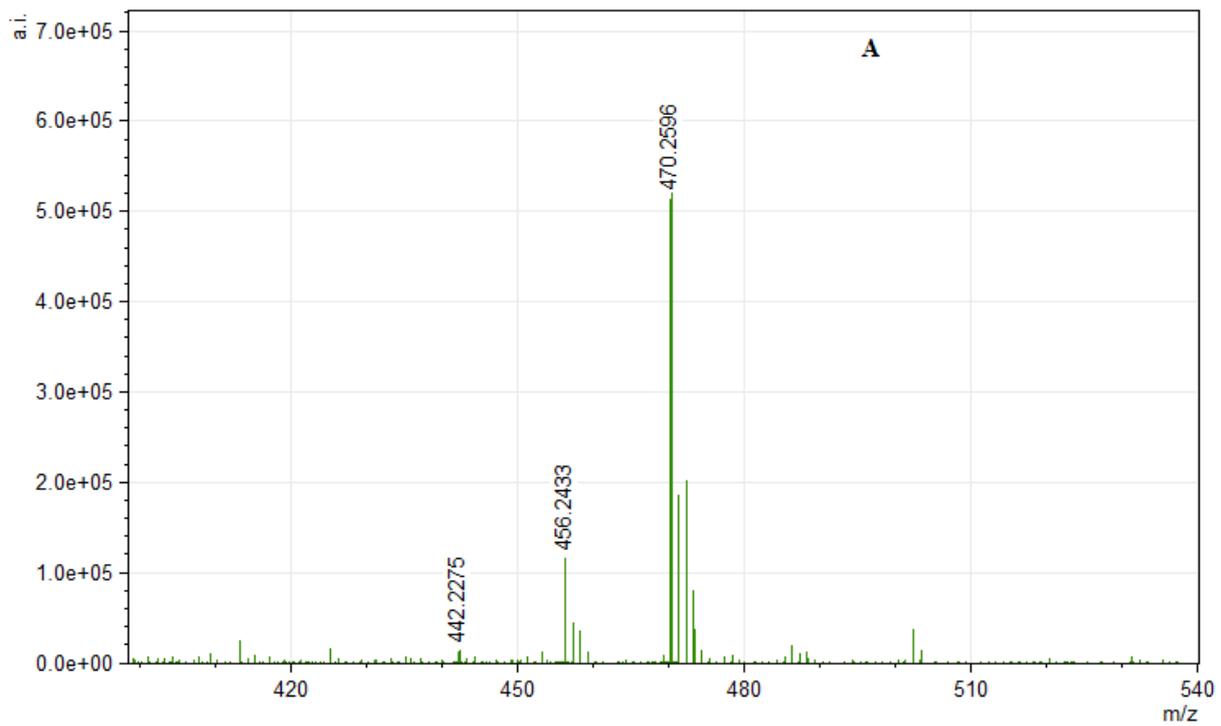


Figura 36 - Espectro de massas: A) Amostra de tinta em laudo de 1962; B) Amostra de tinta em laudo de 2014.

6.3 Correlações entre amostras de tinta de laudos

Conforme descrito no item 4.1, o método utilizado para análise de correlações de amostras foi o ULT.⁷⁶ A partir dos espectros de massas, foi gerada uma tabela com as áreas de todos os picos referentes aos corantes estudados. Com esses valores, normalizados a 100%, foram traçados vetores característicos de cada amostra. A comparação entre os vetores das amostras permitiu o cálculo do quadrado da função cosseno (ρ). Com esses valores foi possível determinar as correlações entre todos os pares de amostras. No Anexo 3, encontram-se todos os valores de AUC, ρ_L e ρ_{NL} , utilizados para a escolha do número de classes, para cada corante/formulação de corantes.

6.3.1 Correlação entre amostras – por corante

Inicialmente, foram realizados todos os cálculos descritos na seção 4.1 com os valores de área dos picos referentes aos corantes objeto desse estudo. Os dados foram analisados considerando-se apenas a presença de cada corante, sem considerar os demais compostos presentes na formulação. A motivação nesse caso era verificar se algum dos corantes estudados poderia ser utilizado como marcador único para datação de documentos.

Dessa forma, foram obtidos cinco conjuntos de dados, referentes a cada um dos corantes estudados (Figura 31 da seção 6.2.1).

O método foi empregado para obtenção da correlação entre amostras considerando apenas o Violeta Cristal, desprezando quaisquer outros corantes que estivessem presentes na formulação das tintas. O histograma referente às amostras correlacionadas nessa situação é mostrado na Figura 37. Nesse caso, é possível observar que, embora a diferença de idade mais frequente (~26%) ocorra entre zero e dois anos, 95% das amostras apontam diferenças de idade de até 30 anos entre lançamentos (percentil 95%).

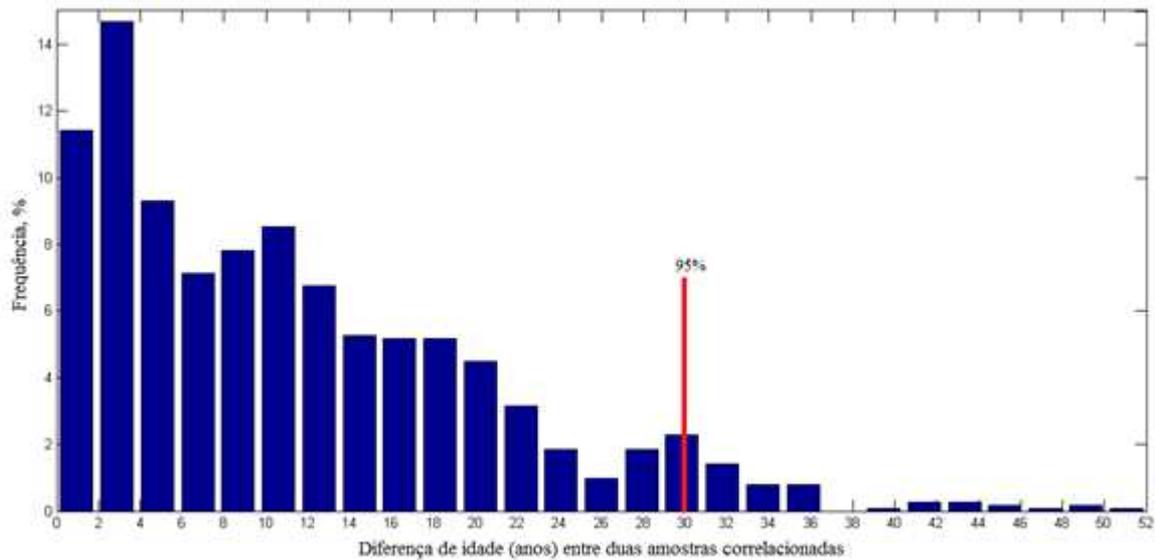


Figura 37 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante – Violeta Cristal (C). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 1138 e 6% respectivamente.

Aplicando o método para todas as amostras que continham a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, obteve-se um total de 1167 correlações. É importante salientar que a diferença de idade entre amostras correlacionadas fornece uma medida do erro de datação incorrido. A Figura 38 ilustra um histograma de amostras correlacionadas para esse caso em que o eixo das ordenadas exibe a frequência de amostras correlacionadas versus a diferença de idade existente entre elas (abscissas). Para essa situação, 95% das amostras correlacionadas apresentaram uma diferença de idade de lançamento de até 8 anos (percentil 95%). Observando-se o gráfico, verifica-se que a diferença de idade mais frequente (~37%) encontra-se na faixa entre 0 e 2 anos, sendo que uma grande parte (~80%) das amostras correlacionadas encontra-se na faixa entre 0 e 4 anos. O histograma também evidencia que a frequência de amostras correlacionadas decresce à medida que a diferença de idades aumenta, o que é um comportamento desejável.

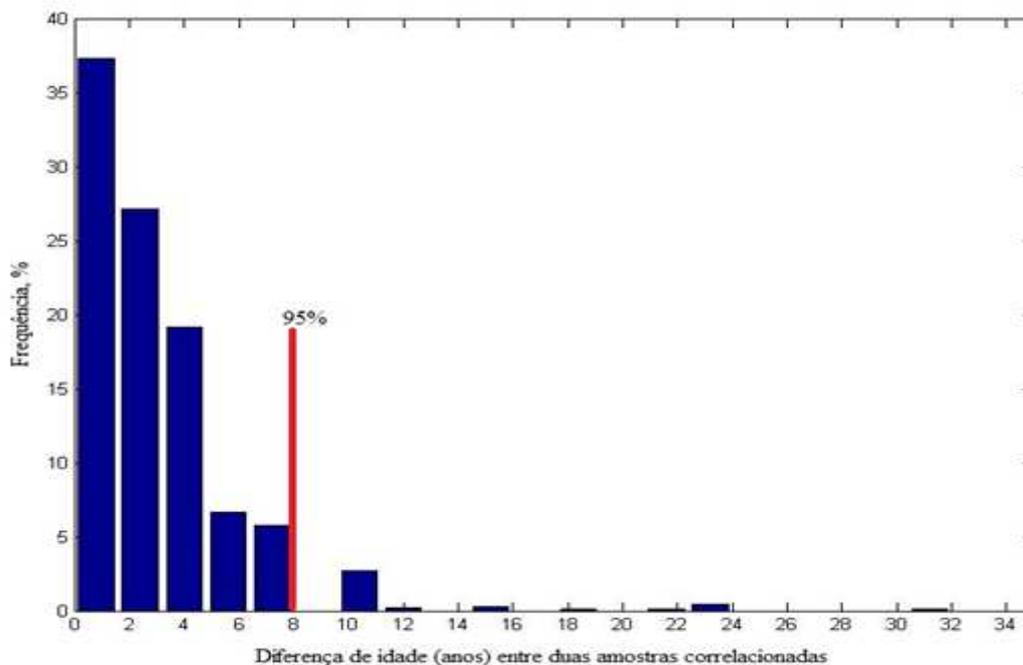


Figura 38 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante – 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (G). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 1167 e 19% respectivamente.

A Figura 39 traz um gráfico de confronto de idades entre tintas correlacionadas. No eixo das abscissas, encontra-se o ano da tinta mais antiga e no eixo das ordenadas o ano da tinta mais recente. Os números indicados próximos a alguns pontos da figura indicam a diferença de idade observada e representam as correlações com diferenças de idade acima de 8 anos (percentil 95%). Os demais pontos (sem números) representam diferenças de idade iguais ou inferiores a 8 anos. Cada cor indica o número de correlações correspondentes a cada ponto, conforme a legenda da figura. Por exemplo, pontos que representam poucas correlações (entre 1 a 5 correlações) foram destacados com a cor verde, ao passo que pontos com número de correlações acima de 100 foram destacados com a cor amarela. É possível observar que os maiores erros de datação se encontram entre as décadas de 60 a 90, isto é, em amostras com mais de 20 anos de idade, e que grande parte desses pontos correspondem a poucas correlações, muitos deles contendo apenas uma correlação. Esse é o caso dos pontos inscritos com as diferenças de idade de 22, 32 e 18 anos. O ponto com a diferença de 24 anos corresponde a uma única amostra em 1986 que correlacionou com cinco tintas lançadas em 1962. Importante salientar que as tintas correlacionadas com maiores diferenças de anos (32 e 24 anos) não apresentaram semelhanças na cor e no traçado.

No Anexo 4 consta o histograma contendo as curvas das amostras ligadas e não ligadas para a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (por corante), com os respectivos valores de ρ_L e ρ_{NL} .

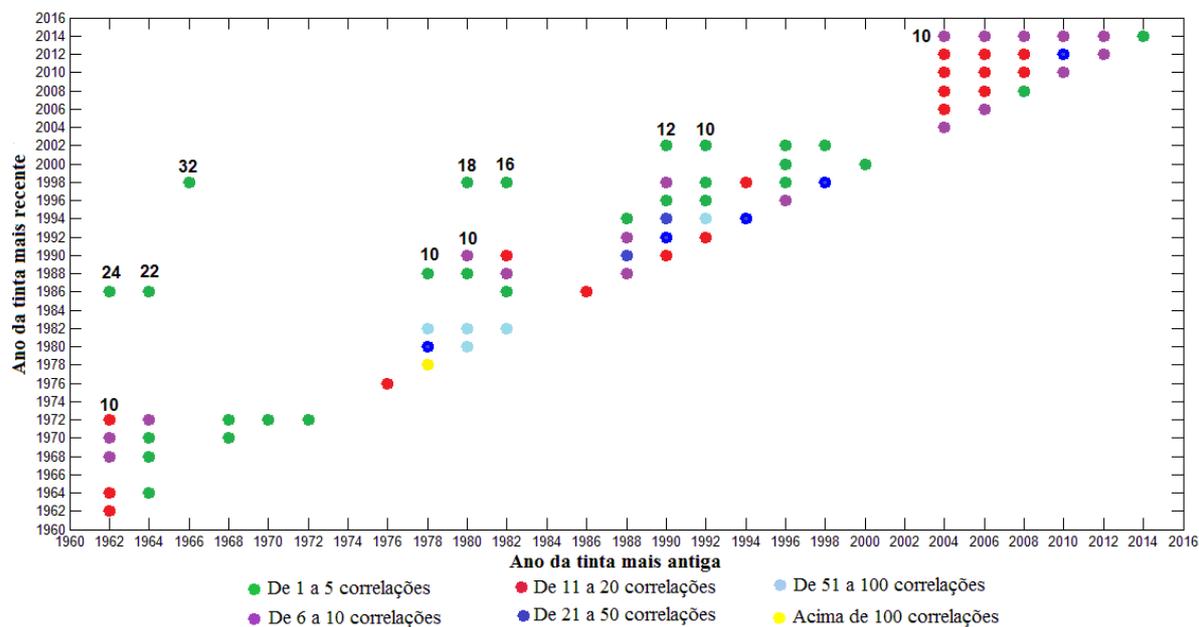


Figura 39 - Idade (anos) das amostras correlacionadas e erros de datação - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (por corante)

No caso dos corantes Victoria Blue B e Basic Blue 7, considerados isoladamente na formulação, os valores do percentil 95% foram de respectivamente 44 e 38 anos. Para o Victoria Blue B a maior frequência de amostras correlacionadas (~13% das correlações) ocorreu para uma diferença de idade de quatro anos, enquanto que para o Basic Blue 7 as maiores frequências de amostras correlacionadas (cada uma com ~8% das correlações) ocorreram para diferença de idade de dois, quatro, oito e dez anos. As Figura 40 e Figura 41 mostram os histogramas de amostras correlacionadas para esses dois corantes. Cabe salientar que o elevado número e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$ encontrado para o corante Basic Blue 7 (11340 e 97% respectivamente) é indicativo do baixo poder de datação desse corante, em função da existência de correlações indesejáveis entre amostras muito antigas e amostras mais recentes.

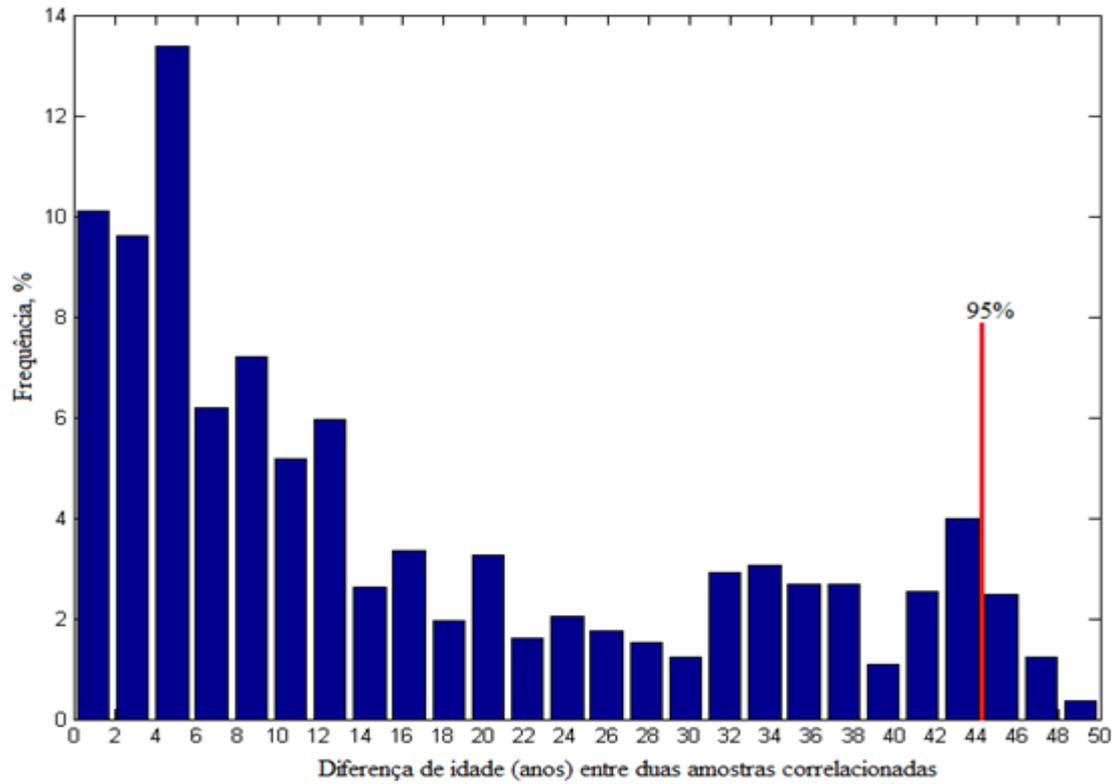


Figura 40 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante - Victoria Blue B (V). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 1375 e 19% respectivamente.

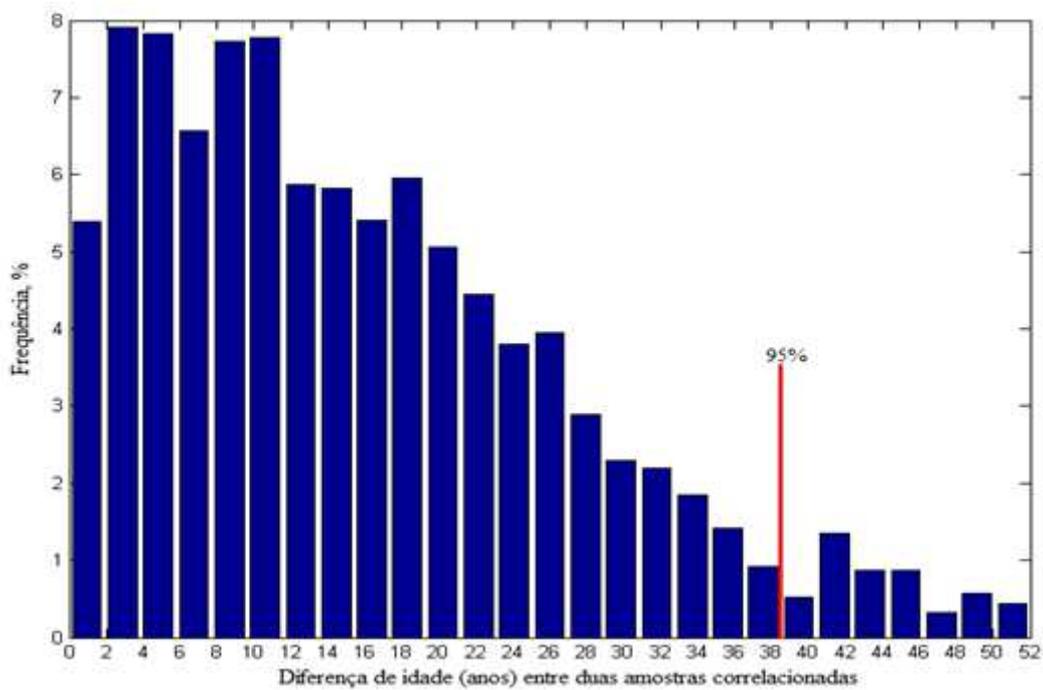


Figura 41 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante - Basic Blue 7 (B). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 11340 e 97% respectivamente.

Para o corante Rodamina (6G e B), considerado individualmente na formulação das tintas, o histograma de amostras correlacionadas é mostrado na Figura 42. Pelo gráfico, é possível verificar que 95% das amostras correlacionadas apresentam uma diferença de idade de até 34 anos. Além disso, conforme observado no caso do Basic Blue 7 (B), a Rodamina apresenta baixo poder de datação, em função de seu elevado número e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$ (4005 e >98% respectivamente).

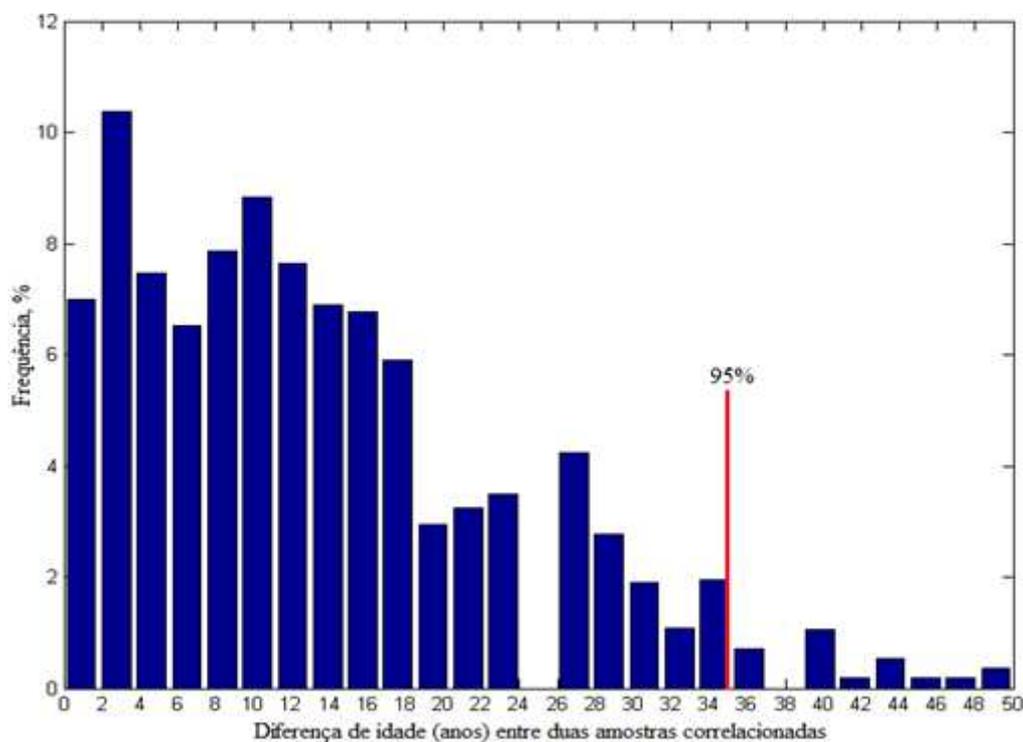


Figura 42 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por corante - Rodamina (R). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 4005 e >98% respectivamente.

De forma resumida, a Tabela 27 traz as principais informações sobre todos os resultados obtidos para cada corante, independentemente da formulação. A última coluna dessa tabela refere-se ao percentual de área do histograma de amostras ligadas com valores de $\rho > \rho_{NL}$. Conforme explicado anteriormente, valores muito elevados desse parâmetro indicam baixo poder de discriminação na datação devido à maior possibilidade de correlação entre amostras de idades muito diferentes. Por outro lado, valores muito baixos indicam pouca representatividade das correlações. Pela experiência obtida, o valor ideal da porcentagem de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) deve estar entre 20% a 50% e deve necessariamente ser avaliado em conjunto com o percentil 95% a fim de avaliar o desempenho de datação de um determinado corante.

Dentre os corantes estudados, a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (G) mostrou-se o melhor marcador individual de datação pelas seguintes razões:

- Apresentar um histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) que decresce rapidamente com o aumento da diferença de idade entre os documentos. Dessa forma, um elevado percentual (~80%) das correlações exibem pequena diferença de idade (até 4 anos) entre os documentos.
- Proporcionar o menor valor de percentil 95% (8 anos);
- Exibir um valor considerado adequado para a percentagem de amostras correlacionadas com $\rho > \rho_{NL}$ (19%).

É possível que a presença de outras substâncias químicas na formulação da tinta possa interferir na cinética de degradação de cada corante estudado individualmente. A desconsideração da mistura de corantes existente na formulação da tinta traz o inconveniente adicional de reduzir o número de picos de integração considerados no espectro de massas, podendo assim diminuir a confiabilidade estatística das correlações encontradas.

Tabela 27 - Resultados obtidos para cada corante, independente da formulação

Formulação	Nº de amostras	Nº máximo de correlações possíveis**	Faixa de anos	Nº de classes	ρ_L	ρ_{NL}	Percentil 95%	Diferença máxima (em anos)	Diferença média (em anos)	Nº de correlações $\rho > \rho_{NL}$	% de correlações com $\rho > \rho_{NL}$
C	372	69006	1962 a 2014	12	0,9093	0,9997	30	52	17,1	1138	6%
G	245	29890	1962 a 2014	15	0,9089	0,9976	8	32	12,8	1167	19%
B	157	12246	1962 a 2014	2	0,9459	0,9825	38	50	26	11340	97%
V	145	10440	1962 a 2014	6	0,9557	0,9997	44	50	25	1375	19%
R	92	4278	1964 a 2014*	3	0,9994	0,9993	34	50	23,5	4005	>98%

*Faltando: 1666 a 1976 e 2002.

**Valor calculado pela expressão $N(N-1)/2$, onde N é número de amostras.

6.3.2 Correlação entre amostras – por formulação

Outra abordagem utilizada para o estudo das correlações entre amostras foi considerar apenas formulações contendo os mesmos corantes em sua composição. Conforme descrito nas tabelas 25 e 26, as amostras de tinta de caneta foram separadas em quinze formulações distintas e, a partir daí, calculou-se o quadrado da função cosseno para os pares de amostras.

Não foram estudadas as correlações envolvendo as formulações CRV, V, CVB, R, GCV, GB, GCB, GCR e CR. Essas formulações foram desconsideradas por apresentarem pequena incidência no conjunto de amostragem (n° de amostras <30) e uma ocorrência esparsa ao longo das décadas avaliadas. Portanto, o estudo se restringiu às formulações GC, CV, GRB B, C e CB, encontradas em maior quantidade.

A formulação 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC) é a mais frequentemente encontrada no conjunto de amostras estudado (165 amostras, equivalendo a 33% de um total de 505 amostras). Além disso, ela encontra-se presente em diversas décadas, o que torna o estudo de degradação mais abrangente e confiável. Os cálculos pelo método ULT resultaram em 645 correlações (23%) com $\rho > \rho_{NL}$. Analisando os critérios descritos no item 4.1.4, considerando os valores de AUC e de ρ_L , encontrou-se que 17 classes seria o adequado para agrupar as amostras.

A diferença de idades obtida foi de 10 anos para 95% das amostras correlacionadas (percentil 95%). Esse resultado é coerente com os resultados obtidos no trabalho de Lalli e colaboradores²², que analisaram documentos reais com data de confecção conhecida e indicaram que, para a formulação GC, uma escala de tempo da ordem de 10 anos estaria envolvida no processo de degradação desses corantes. As maiores frequências de correlações (~70%) foram observadas para diferenças de idade entre 0 e 2 anos. A Figura 43 traz o histograma frequência versus a diferença de idade entre amostras correlacionadas.

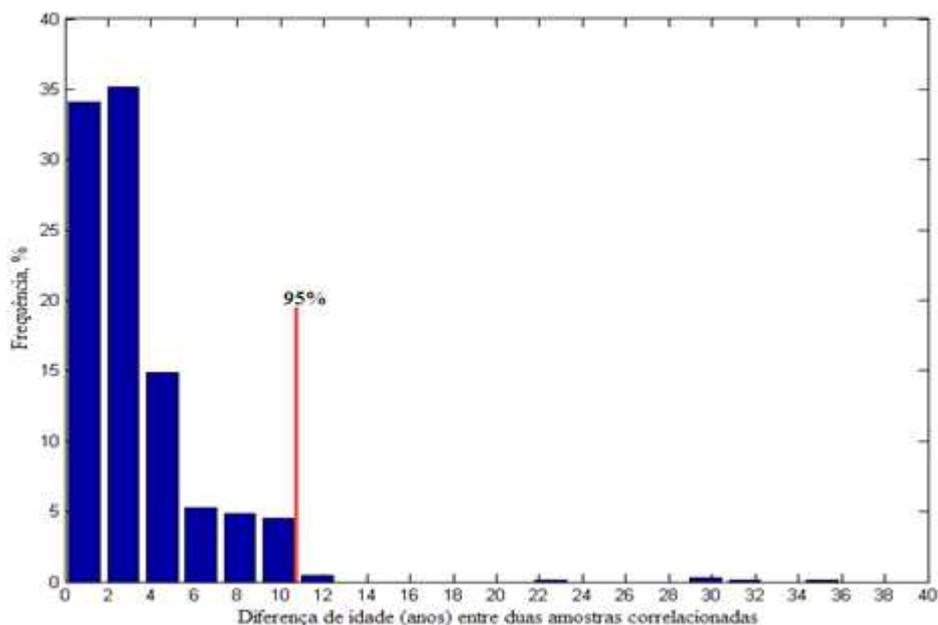


Figura 43 - Histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 645 e >23% respectivamente.

A Figura 44 mostra um gráfico de confronto de idades entre tintas correlacionadas para a formulação GC em que, no eixo das abscissas, encontra-se o ano da tinta mais antiga e, no eixo das ordenadas, o ano da tinta mais recente. Os números indicados próximos a alguns pontos da figura indicam a diferença de idade observada e representam as correlações com diferenças de idade acima de 10 anos (percentil 95%). Os demais pontos (sem números) representam diferenças de idade iguais ou inferiores a 10 anos. Cada cor indica o número de correlações correspondentes a cada ponto, conforme a legenda da figura. Observou-se que as maiores diferenças de idade (36, 32 e 30 anos) ocorreram com correlações de uma única amostra de 1966 com amostras dos anos de 1996, 1998 e 2002. Portanto, pode-se considerar que essa amostra apresentou um comportamento de envelhecimento de corantes atípico, quando comparada a outras do mesmo ano de confecção. Algumas das possíveis explicações para esse resultado incomum são o emprego de uma formulação diferenciada no momento da produção da tinta e/ou condições de armazenamento anormais do documento em questão.

No Anexo 4 consta o histograma contendo as curvas das amostras ligadas e não ligadas para a formulação 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC), com os respectivos valores de ρ_L e ρ_{NL} .

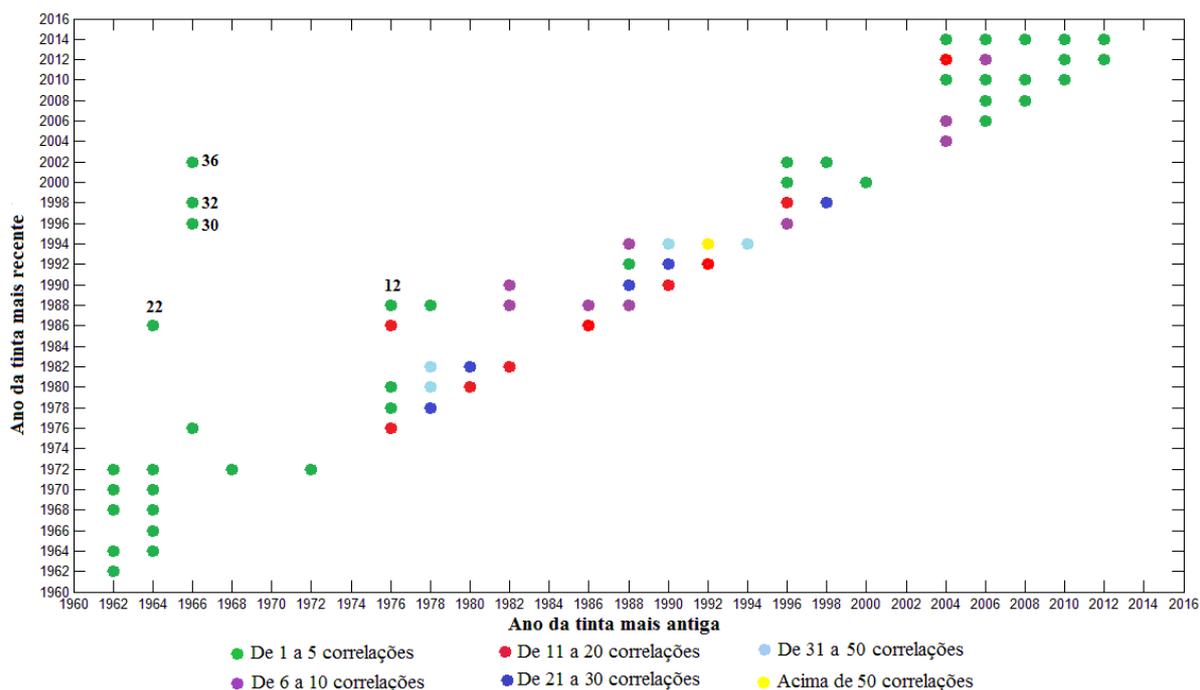


Figura 44 - Idades (anos) das amostras correlacionadas e erros de datação – 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC)

No caso da formulação contendo Violeta Cristal e Victoria Blue B (CV), é possível observar que cerca de 93% das amostras foram confeccionadas entre 1990 e 2014 (Tabela 25). Esse fato leva a crer que essa formulação se tornou mais comum a partir da década de 90. Portanto, não foi obtida uma população satisfatória de tintas em documentos mais antigos do que os anos 90, tornando o estudo de datação limitado a poucas décadas. A aplicação do método ULT resultou em 52 correlações com $\rho > \rho_{NL}$, um valor relativamente baixo quando se considera o número máximo de 4851 correlações possíveis nesse caso. O percentil 95% obtido foi de 11,8 anos. Aproximadamente 40% das correlações obtidas não apresentaram diferença de idade entre as amostras correlacionadas. A Figura 45 evidencia essas informações.

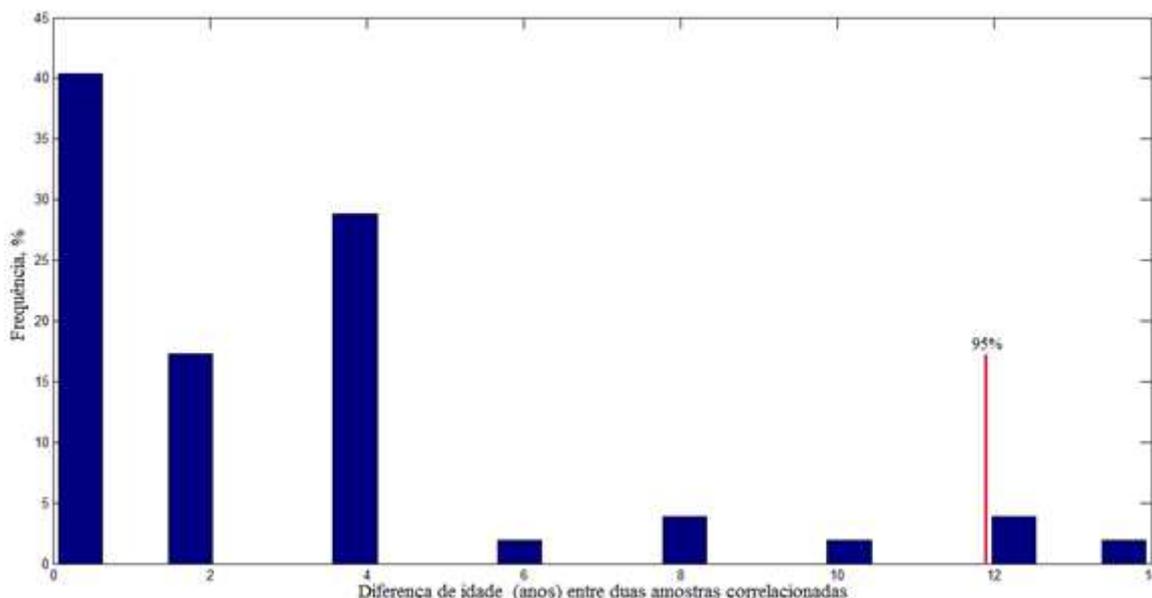


Figura 45 - Histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) - Violeta Cristal e Victoria Blue B (CV). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 52 e >8% respectivamente.

Outra formulação analisada (GRB) é composta por três corantes: 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rodamina (B e 6G) e Basic Blue 7. Ela está presente apenas em canetas de tinta preta. Foi aplicado o método ULT tanto para os dados de área dos 3 corantes em conjunto como para os da 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina individualmente nesse tipo de formulação (denominada “G de GRB”). Os corantes Rodamina e Basic Blue 7 não foram considerados pelo fato de não terem apresentado os melhores resultados individuais, conforme apresentado na seção anterior.

Para a formulação GRB, foram obtidas 1988 correlações com $\rho > \rho_{NL}$. Esse número é relativamente elevado, considerando que a matriz de dados da formulação GRB continha 66 amostras e que o número máximo de correlações é igual a 2165 para esse caso. Essa composição não foi encontrada em laudos da década de 60 nem a partir do ano de 2002. Esse fato restringe a análise da degradação dos corantes a um período de tempo mais estreito. O percentil 95% calculado foi de 18 anos. Na Figura 46 é possível visualizar que a maior frequência de correlações, cerca de 18%, apresentou erro de datação de apenas dois anos. O decaimento do histograma com a diferença de idade entre as amostras apresenta-se evidente somente a partir de 12 anos.

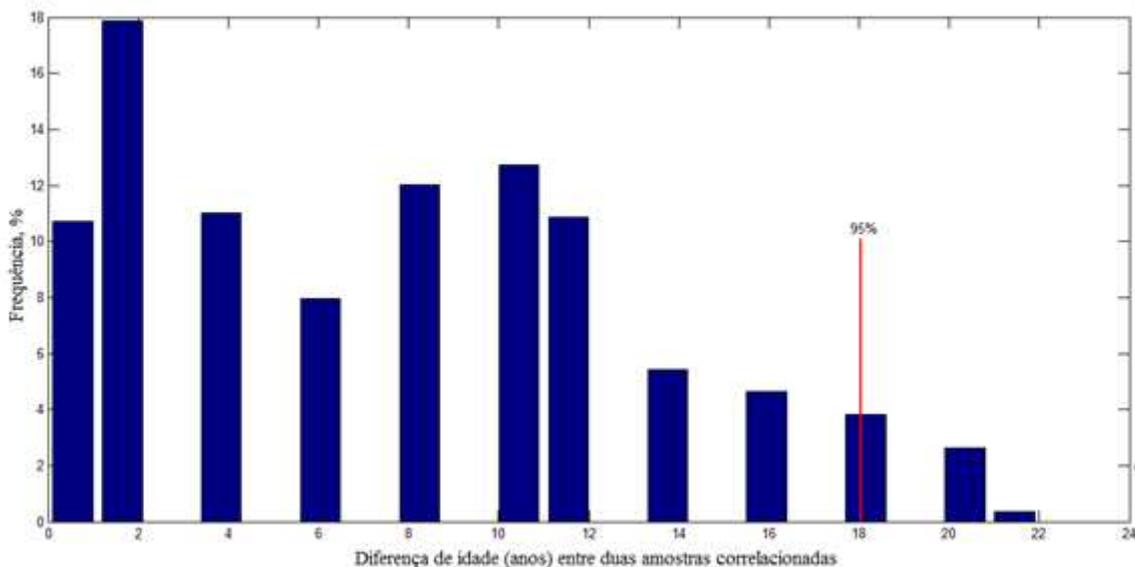


Figura 46 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rodamina e Basic Blue 7 (GRB). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 1988 e >95% respectivamente.

A Figura 47 mostra um gráfico de confronto de idades entre tintas correlacionadas para a formulação GRB em que, no eixo das abscissas, encontra-se o ano da tinta mais antiga e, no eixo das ordenadas, o ano da tinta mais recente. Os números indicados próximos a alguns pontos da figura indicam a diferença de idade observada e representam as correlações com diferenças de idade acima de 18 anos (percentil 95%). Os demais pontos (sem números) representam diferenças de idade iguais ou inferiores a 18 anos. Cada cor indica o número de correlações correspondentes a cada ponto, conforme a legenda da figura. Pode-se observar que as maiores diferenças de idade entre amostras correlacionadas ocorrem nas amostras mais antigas (1978 e 1980).

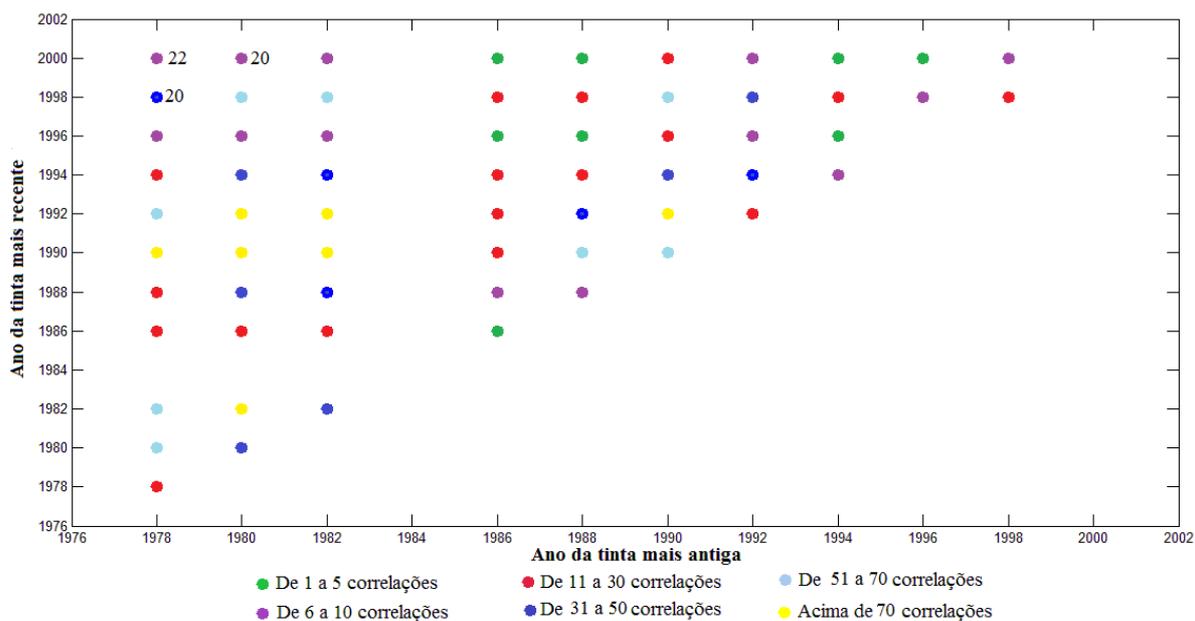


Figura 47 – Idade (anos) das amostras correlacionadas e erros de datação - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rodamina e Basic Blue 7 (GRB).

Utilizando-se apenas os valores de área dos íons referentes a degradação do 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina encontrados na formulação GRB (“G de GRB”), observa-se uma redução no número de correlações com $\rho > \rho_{NL}$ para o valor de 190 correlações (46% de correlações com $\rho > \rho_{NL}$). Por outro lado, verifica-se que em torno de 50% das correlações obtidas apresentam anos de lançamento da tinta idênticos. Para 95% das amostras, foi verificado um erro de datação de até 6 anos (percentil 95%), conforme ilustrado na Figura 48. Esses dados demonstram que a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina se mostra um melhor marcador de envelhecimento da tinta do que a mistura de corantes GRB contendo esse corante.

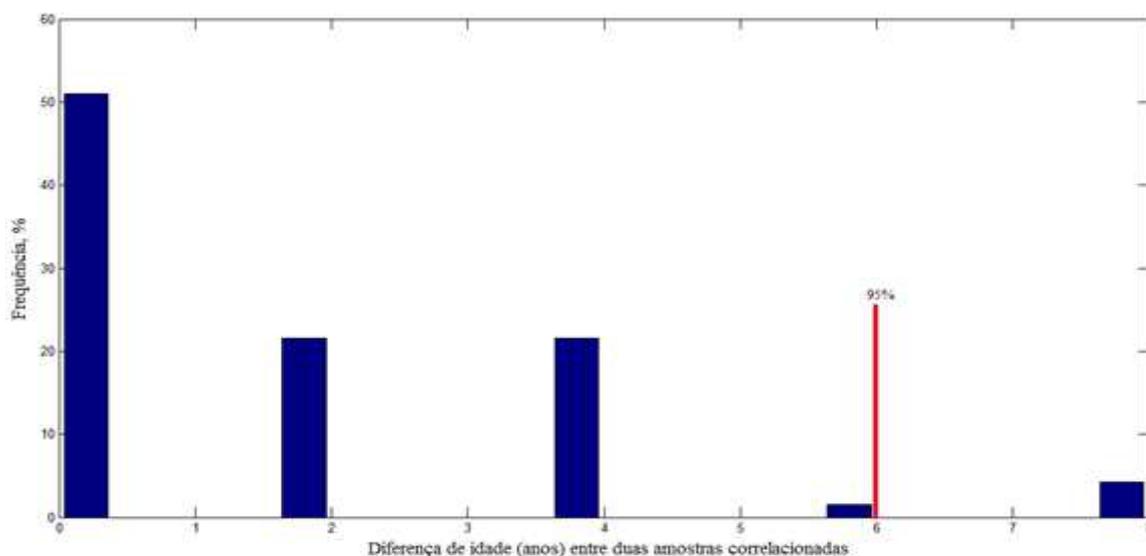


Figura 48 - Histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) - 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina na formulação GRB (“G de GRB”). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 190 e >46% respectivamente.

Para a formulação Basic Blue 7 (B), que contou com 43 amostras, com datas entre 1962 e 2014, foram obtidas 819 correlações com $\rho > \rho_{NL}$, o que indica que tintas muito antigas correlacionaram com tintas recentes, já que o número máximo de combinações possíveis para essas amostras é 903. Observando o histograma de amostras correlacionadas com $\rho > \rho_{NL}$ (Figura 49), é possível verificar que, embora a diferença de datas mais frequente (~25%) ocorra entre zero e dois anos, 95% das amostras apontam diferenças de idade de até 38 anos entre lançamentos. De certa forma, esse fato já era esperado de acordo com o processo lento de degradação exibido pelo Basic Blue 7 em função do tempo (item 6.2.2). Amostras relativamente antigas não apresentam picos de degradação significativos, referentes a perdas de grupos etila, o que dificulta a utilização prática dessa formulação como marcador químico de datação de documentos.

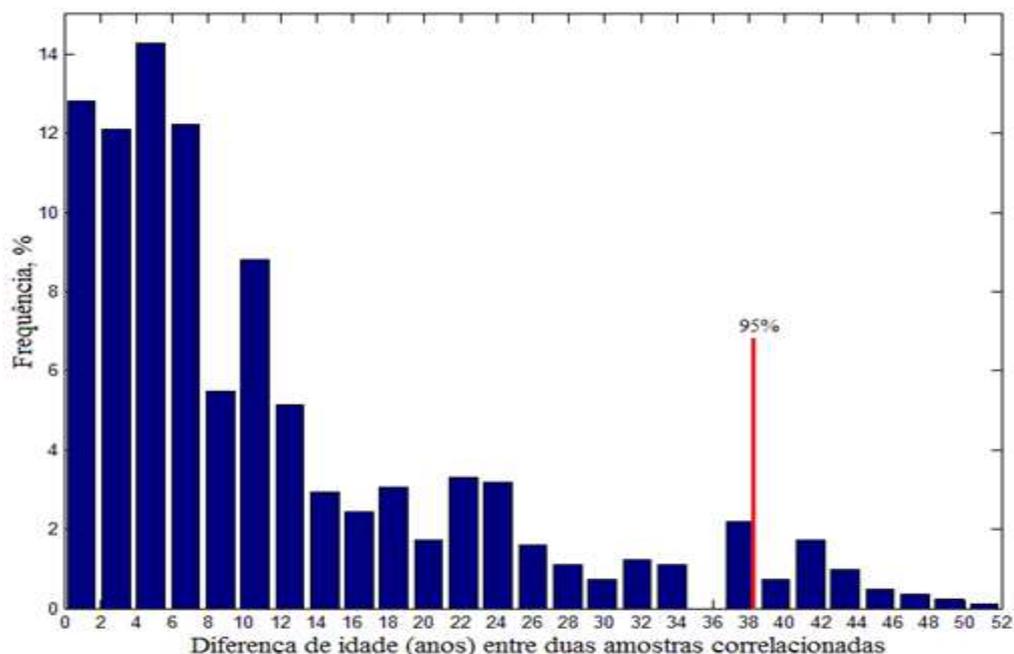


Figura 49 - Histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por formulação - Basic Blue 7 (B). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 819 e >95% respectivamente.

A formulação contendo apenas Violeta Cristal, apresentou 40 amostras, datadas entre 1964 e 2014. Foram obtidas 58 correlações, que equivale a 48% de correlações com $\rho > \rho_{NL}$. Apesar do erro máximo de datação obtido ser bastante alto (48 anos), o percentil 95% encontrado foi de 14 anos.

A Figura 50 traz o histograma das amostras correlacionadas com $\rho > \rho_{NL}$ para a formulação supracitada. Cerca de 36% das amostras correlacionadas apresentaram diferença de idade entre as amostras de 0 a 2 anos, ao passo que 5% delas apresentam diferenças entre os anos das amostras na ordem de 14 anos. Importante ressaltar que os erros de datação entre 38 e 48 anos correspondem a apenas três amostras de tinta.

A Figura 51 mostra um gráfico de confronto de idades entre tintas correlacionadas, para a formulação contendo somente Violeta Cristal, em que, no eixo das abscissas, encontra-se o ano da tinta mais antiga e, no eixo das ordenadas, o ano da tinta mais recente. Os números indicados próximos a alguns pontos da figura indicam a diferença de idade observada e representam as correlações com diferenças de idade acima de 14 anos (percentil 95%). Os demais pontos (sem números) representam diferenças de idade iguais ou inferiores a 14 anos. Cada cor indica o número de correlações correspondentes a cada ponto, conforme a legenda da figura. É possível perceber que os maiores erros de datação ocorreram com amostras de 1966.

Além disso, para os anos de 1968, 2002 e entre 1974 a 1996 não foi encontrada essa formulação nos documentos examinados. A baixa ocorrência dessa formulação no conjunto amostral, a não existência de amostras no referido período de tempo e o baixo número de correlações encontrado (58 de um máximo de 780 correlações possíveis) diminuem a representatividade estatística dessa formulação.

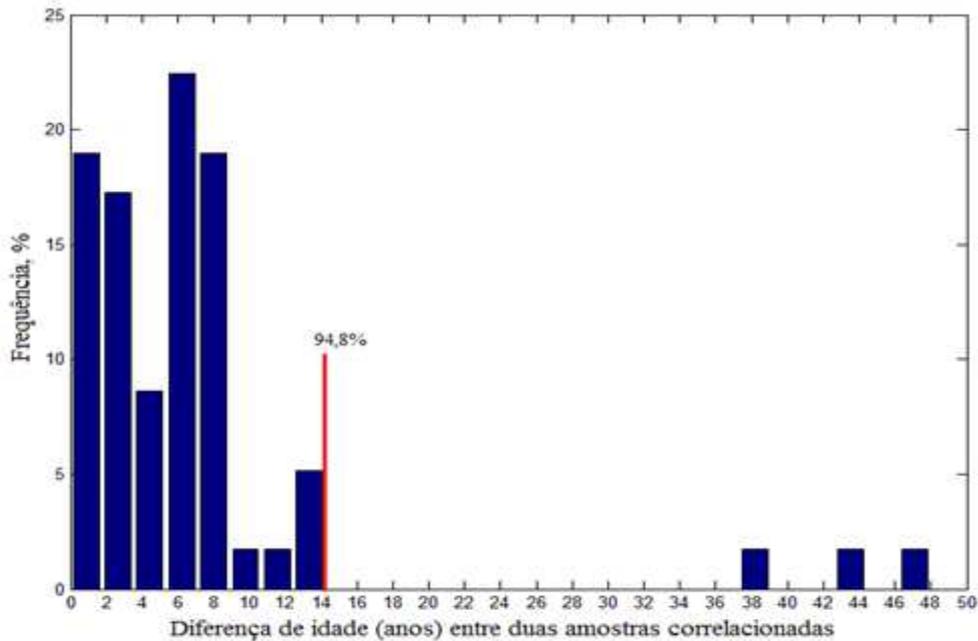


Figura 50 - Histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) por formulação - Violeta Cristal (C). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 58 e >48% respectivamente.

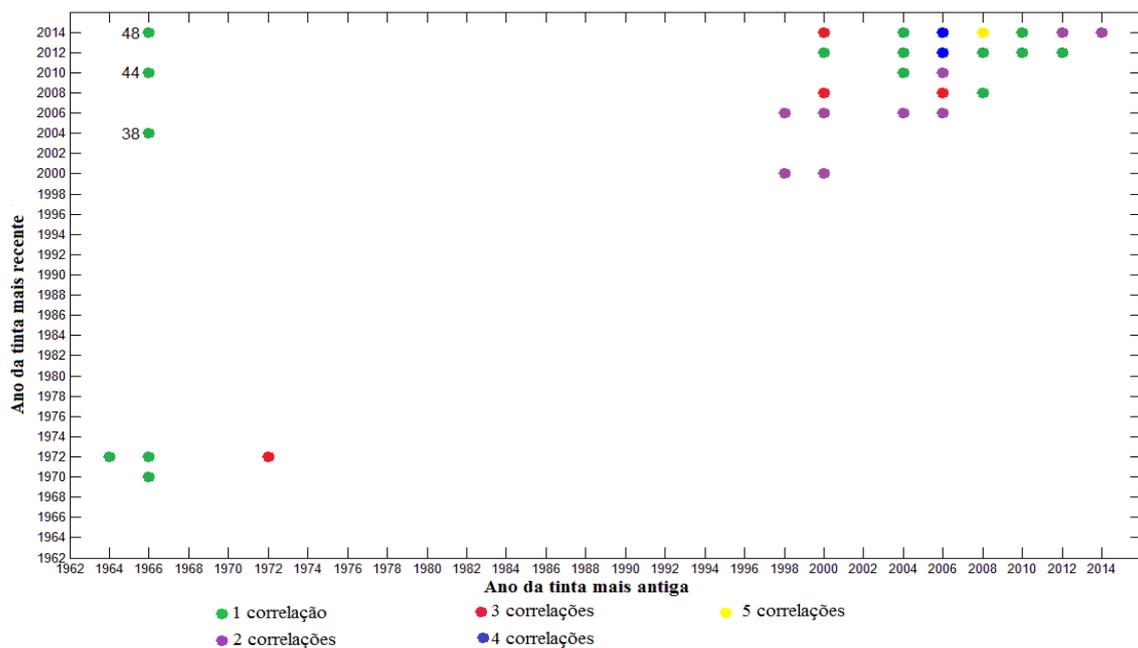


Figura 51 – Idade (anos) das amostras correlacionadas e erros de datação por formulação – Violeta Cristal (C)

A composição de corantes Violeta Cristal e Basic Blue 7 (CB) foi encontrada em 31 amostras. Essa formulação apresentou um número elevado de correlações (122 de um máximo de 465 correlações possíveis). Em torno de 92% das correlações apresentaram diferenças de até 36 anos. A Figura 52 ilustra o histograma das amostras correlacionadas para esse caso. Utilizando-se apenas os valores de área dos íons referentes a degradação do Violeta Cristal encontrados na formulação CB (“C de CB”) não foram observadas mudanças significativas no que tange à diferença máxima de anos de amostras correlacionadas e ao percentil 95%.

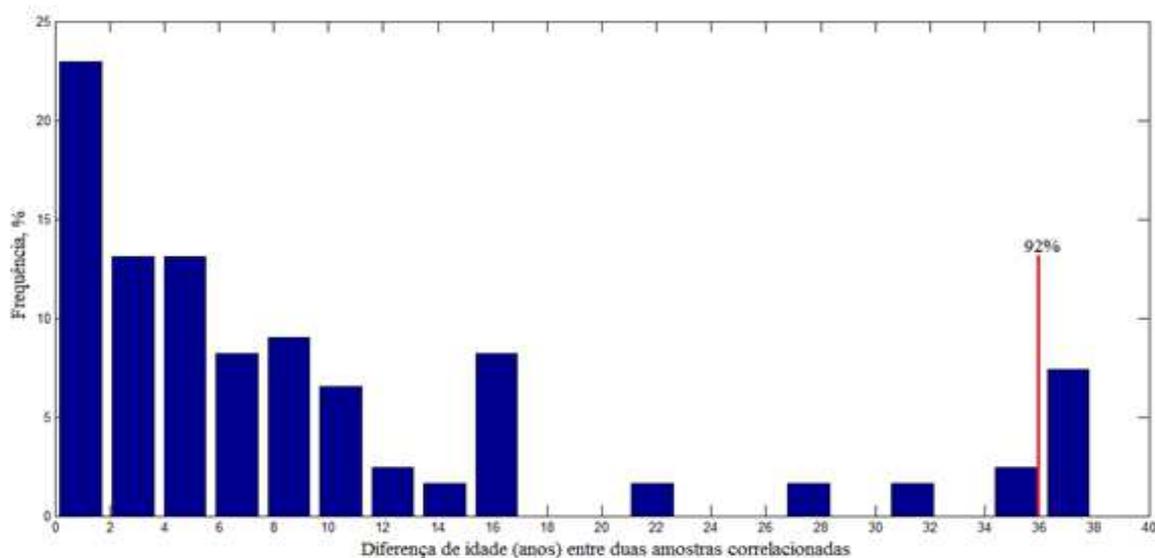


Figura 52 - Histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) - Violeta Cristal e Basic Blue 7 (CB). N° de total e percentual de correlações com $\rho > \rho_{NL}$: 122 e >74% respectivamente.

De forma resumida, a Tabela 28 traz as principais informações sobre todas as formulações e os resultados encontrados.

Dentre as 6 formulações estudadas, a composição 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC) mostrou-se o melhor marcador de datação por formulação pelas seguintes razões:

- Estar presente em todas as décadas estudadas e com significativa taxa de ocorrência.
- Apresentar um histograma de amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) que decresce rapidamente com o aumento da diferença de idade entre os documentos. Um elevado percentual (~85%) das correlações exibem pequena diferença de idade (até 4 anos) entre os documentos.
- Proporcionar o menor valor de percentil 95% (10 anos).
- Exibir um valor considerado adequado para a percentagem de amostras correlacionadas com $\rho > \rho_{NL}$ (23%).

Formulação	Nº de amostras	Nº máximo de correlações possíveis*	Faixa de anos	Nº de classes	ρ_L	ρ_{NL}	Percentil 95% (em anos)	Diferença máxima (em anos)	Diferença média (em anos)	Nº de correlações $\rho > \rho_{NL}$	% de correlações com $\rho > \rho_{NL}$
GC	165	13530	1962 a 2014	17	0,9363	0,9956	10	36	14,7	645	23%
CV	99	4851	1962 a 2014	21	0,9862	0,9997	11	14	7,0	52	8%
GRB	66	2145	1978 a 2000	2	0,9305	0,9675	18	22	11,0	1988	95%
G de GRB***	66	2145	1978 a 2000	11	0,9836	0,9975	6	8	4,0	190	46%
B	43	903	1962 a 2014	2	0,9508	0,9811	38	52	25,6	819	95%
C	40	780	1964 a 2014**	8	0,9860	0,9986	14	48	20,7	58	48%
CB	31	465	1962 a 2014	3	0,9297	0,9869	38	38	16,3	122	74%

Tabela 28 - Resultados obtidos para cada formulação

* Valor calculado pela expressão $N(N-1)/2$, onde N é número de amostras.

**Faltam amostras dos anos 1968, 1974 a 1992, 1996 e 2002.

*** 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina na formulação GRB.

6.4 Estudos de caso

Com o objetivo de verificar a aplicabilidade do método em casos reais, foram calculadas as correlações entre lançamentos gráficos de documentos questionados, enviados para a perícia criminal, com amostras do banco de dados gerado com tintas de laudos de data de elaboração conhecida. Para cada lançamento de caneta esferográfica extraído dos documentos questionados, foi obtido um espectro de massa e identificada a presença/ ausência dos corantes objetos desse estudo. Os dados de área dos picos desses corantes e de seus produtos de degradação foram adicionados à tabela do banco de dados que apresenta formulação equivalente, para o cálculo dos coeficientes de correlação entre as amostras. Após escolhido o número de classes conforme critério (ULT) anteriormente descrito, foi determinado o valor mínimo (ρ_{NL}) para estabelecer se as amostras estão ou não correlacionadas.

6.4.1 Estudo de caso 1 - Ano 1976

Nesse estudo de caso, foram encaminhados para exame pericial três documentos distintos, mostrados nas figuras de 53 a 56. Trata-se de uma comunicação interna (documento 1), um aviso prévio (documento 2) e um registro de empregados (documento 3). A investigação policial questionava se todas as assinaturas contidas nesses documentos tinham sido apostas no ano de 1976. As regiões de onde foram extraídas amostras de tinta para análise foram destacadas com a cor vermelha e numeradas de 1 a 6. Em todos os três documentos consta na data de emissão o ano de 1976 e todos manuscritos amostrados foram produzidos com tinta de caneta esferográfica azul. As regiões com retângulos pretos contidas nos documentos das Figuras 53 a 56 visam manter o sigilo da investigação policial.

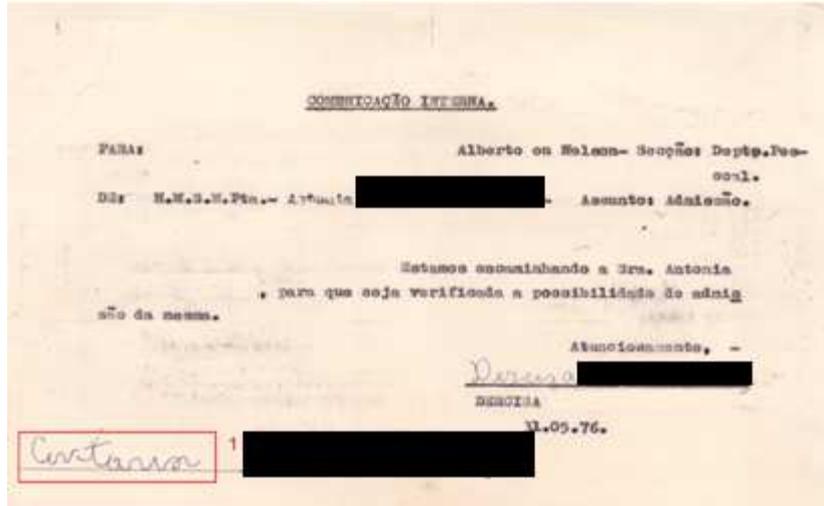


Figura 53 - Frente do documento 1 (Comunicação Interna)

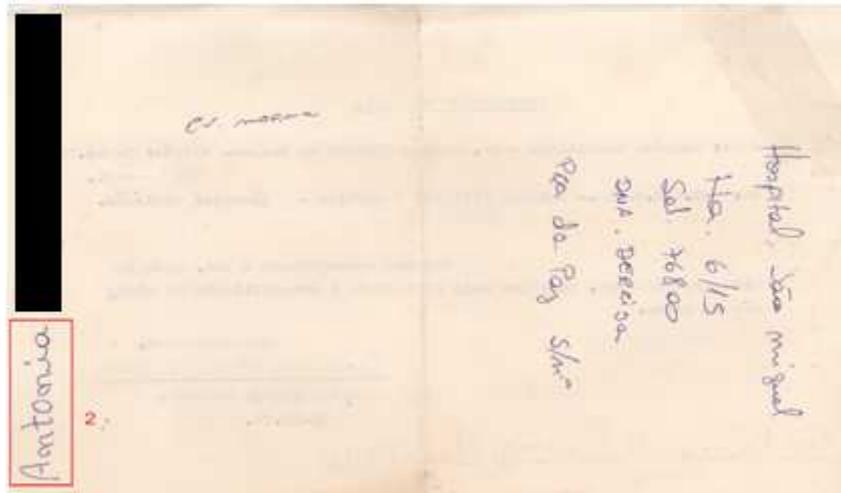


Figura 54 - Verso do documento 1 (Comunicação interna)

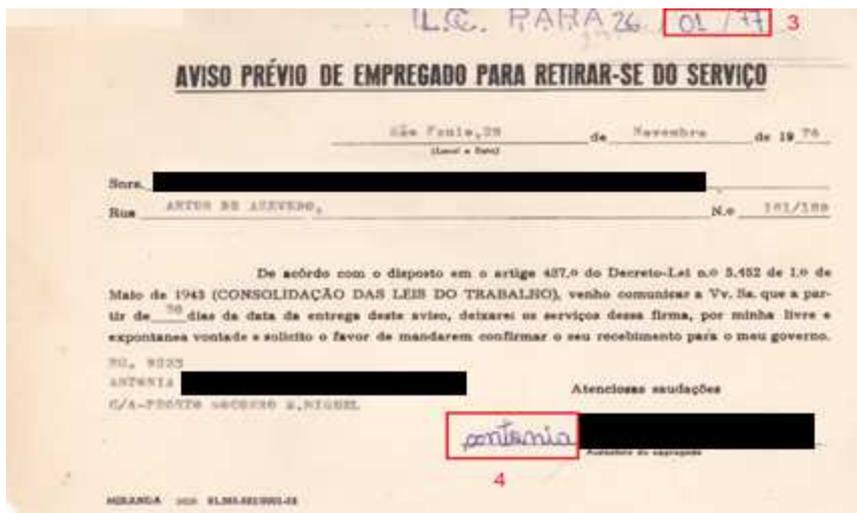


Figura 55 - Documento 2 (Aviso prévio)

The image shows a Brazilian 'REGISTRO DE EMPREGADOS' (Employee Registration Form). It contains various fields for personal and professional information. A handwritten signature 'Antonia' is visible in a red box, and the number '6' is also highlighted in a red box. Other fields include name, address, and identification numbers.

Figura 56 - Documento 3 (Registro de empregados)

Após realização do procedimento experimental descrito na seção 5.4.1, as amostras foram submetidas à análise de espectrometria de massas por meio do equipamento TOF (INC). No documento 1, foram extraídas amostras de tintas de duas regiões distintas (região 1 – frente e região 2 - verso) e os espectros obtidos mostram que essas duas assinaturas foram escritas com canetas diferentes, pois os corantes presentes não são os mesmos. A Figura 57 traz o espectro de massas da região 1, com indicação dos íons dos corantes detectados e a Figura 58 mostra o espectro de massas da região 2, evidenciando assim a diferença na formulação da tinta presente em cada parte analisada desse documento.

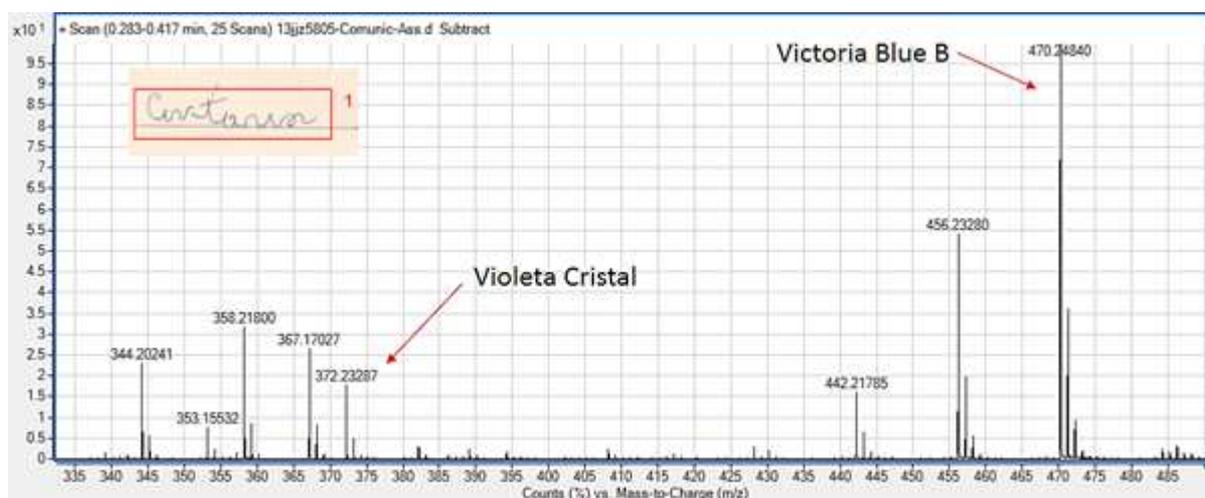


Figura 57 - Espectro de massas da região 1 do documento 1

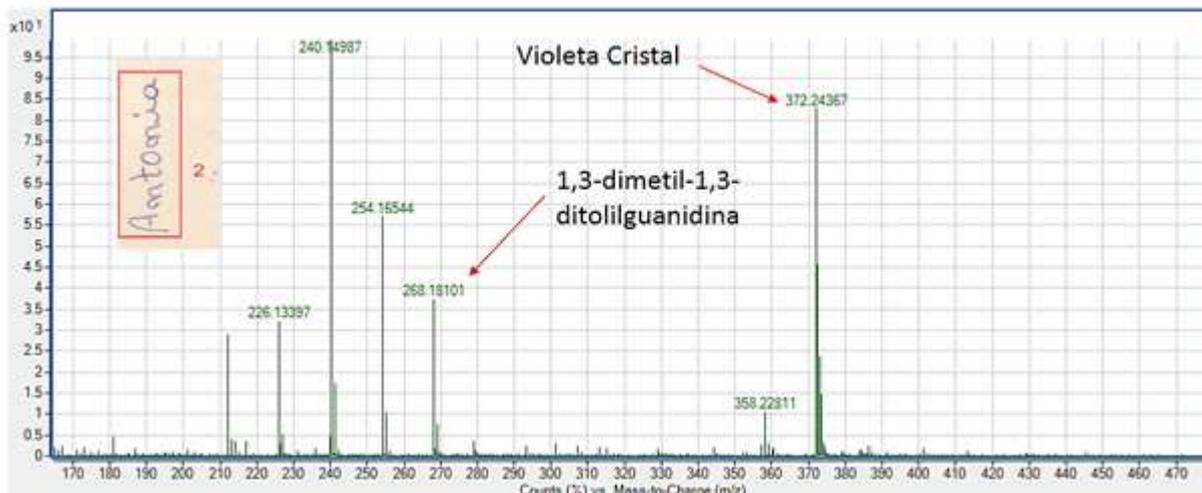


Figura 58 - Espectro de massas da região 2 do documento 1 (verso)

No documento 2 também foram extraídas tintas de duas regiões: uma assinatura e a anotação de uma data supostamente aposta dois meses depois da elaboração do documento em análise. Os espectros de massas comprovam que os dois lançamentos de tinta foram realizados com canetas diferentes, conforme mostrado nas figuras 59 e 60. De início, pode-se observar que os corantes Violeta Cristal e 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, presentes na tinta da região 2 do documento 1 (Figura 58) e da região 3 do documento 2 (Figura 59) apresentam perfis de degradação visualmente idênticos.

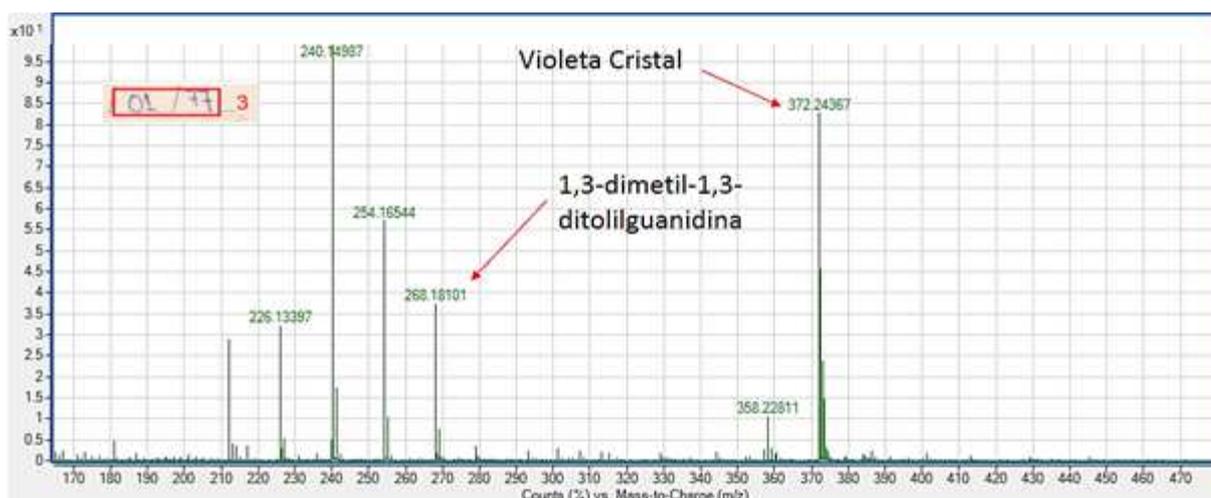


Figura 59 - Espectro de massas da região 3 do documento 2

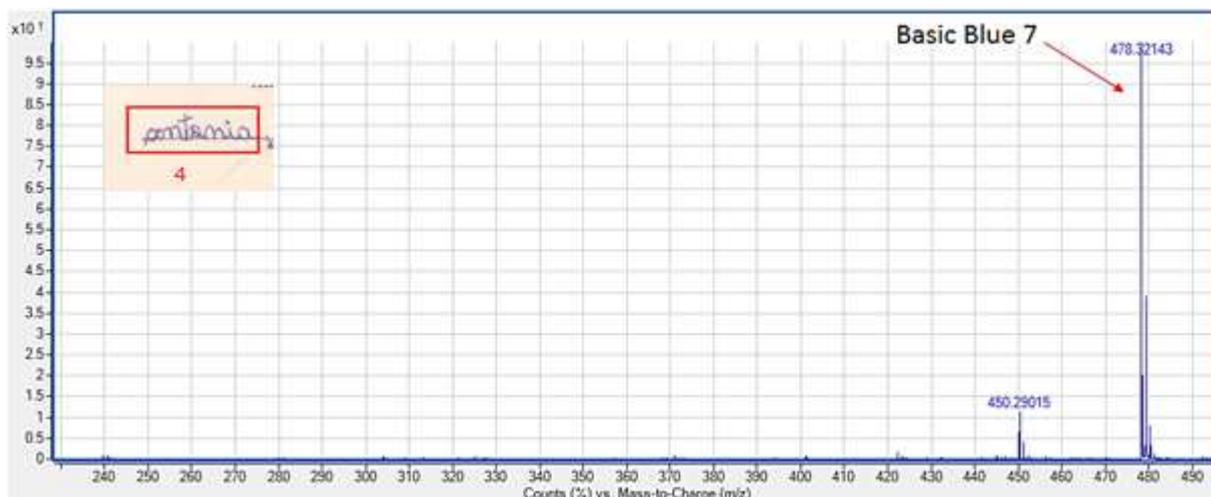


Figura 60 - Espectro de massas da região 4 do documento 2

No documento 3 foram retiradas amostras de tintas de duas regiões. O espectro de massas da região 5 é mostrado na Figura 61. É possível verificar a grande semelhança da degradação de corantes evidenciada nesse espectro quando comparado aos espectros das tintas das regiões 2 e 3 (Figuras 58 e 59).

Não foi identificada a presença de corantes na tinta utilizada na região 6, provavelmente devido ao solvente utilizado na extração (metanol) não ser adequado para solubilizar os colorantes de sua formulação ou pela presença de pigmentos que são insolúveis em solventes orgânicos.

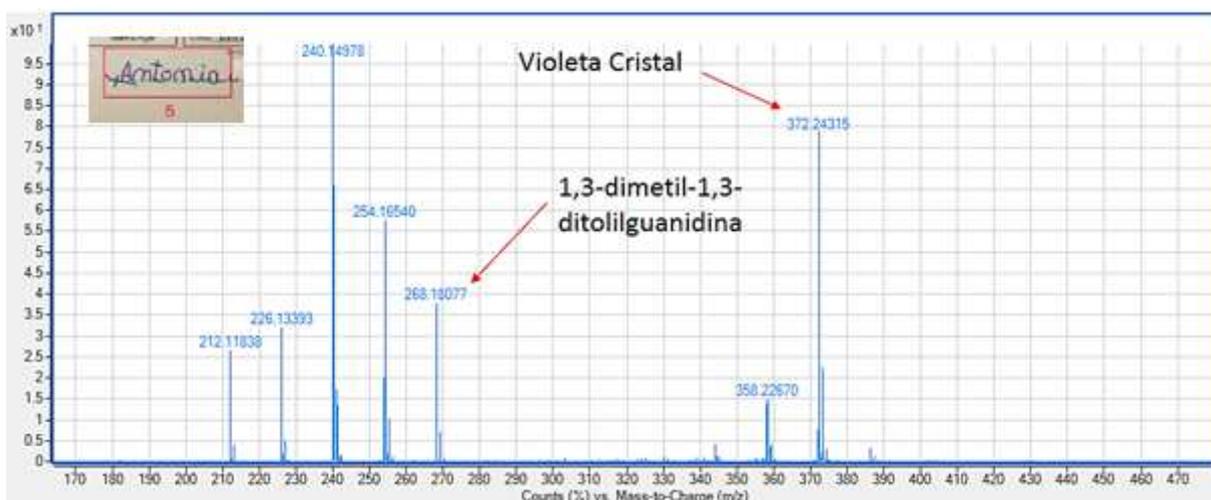


Figura 61 - Espectro de massas da região 5 documento 3

O perfil de degradação dos corantes apresentado nas regiões 2 (documento 1), 3 (documento 2) e 5 (documento 3) mostrou-se altamente compatível com os dados provenientes de lançamentos gráficos realizados no mesmo ano. A Figura 62 traz um espectro de massas de um documento (laudo) existente no arquivo do INC e produzido no ano de 1976.

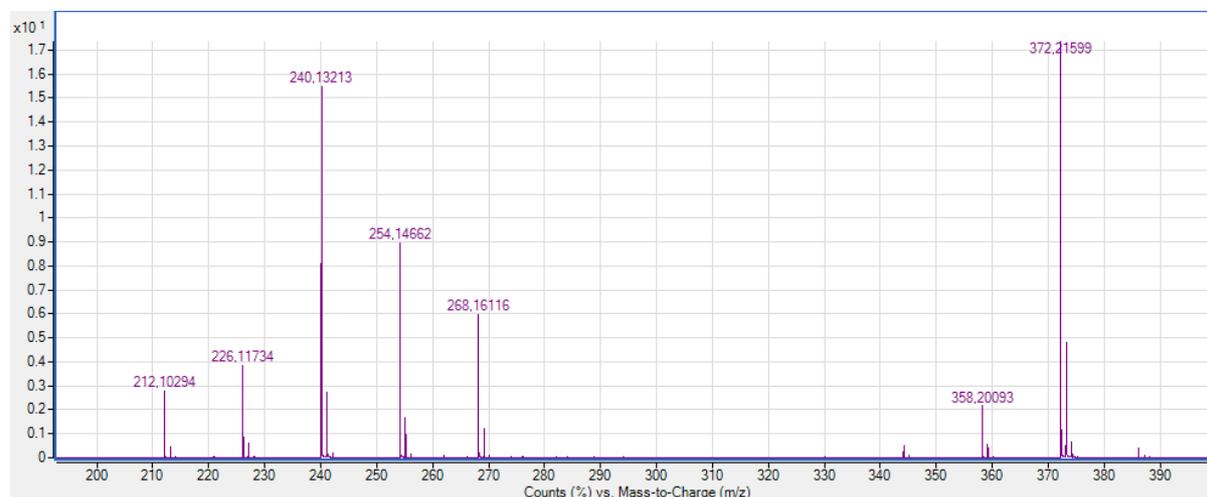


Figura 62 - Espectro de massas de uma tinta extraída de um laudo de 1976

A Tabela 29 traz os valores de ρ das correlações obtidas com a aplicação do método ULT para o caso em questão. Foram obtidas correlações ($\rho > \rho_{nL}$) das regiões 2, 3 e 5 dos documentos questionados com amostras de tinta de laudos produzidos em 1976. Considerando os resultados obtidos para a formulação GC (seção 6.3.2) e os apresentados na Tabela 28, com 95% de confiança, pode-se afirmar que os lançamentos de tinta da região 2, 3 e 5 foram apostos no papel entre 1976 e 1986.

Observa-se que a maioria das correlações obtidas entre essas tintas dos documentos questionados e o banco de dados foi com amostras de laudos de 1976. Do total de 11 amostras do ano de 1976 presentes no banco de dados com a formulação GC, 7 apresentaram correlação com as regiões 2, 3 e 5 dos documentos questionados (~63%). Já os demais anos (1978, 1980 e 1986) apresentaram uma porcentagem de correlações com os documentos questionados muito inferior, sendo de 11%, 25% e 33%, respectivamente, considerando o total de amostras do banco de dados de cada ano com essa formulação.

Tabela 29 - Valores de $\rho > \rho_{NL}$ para laudos correlacionados com algumas tintas dos documentos questionados no estudo de caso 1 ($\rho_{NL} = 0,9956$)

Laudos correlacionados	Documentos questionados		
	Região 2	Região 3	Região 5
Laudo 13666 – Ano 1976	0,99914	0,99863	0,99750
Laudo 13673 – Ano 1976	0,99800	0,99831	-
Laudo 13663 – Ano 1976	0,99676	0,99691	0,99839
Laudo 13672 – Ano 1976	0,99757	0,99766	-
Laudo 13673_1 – Ano 1976	0,99800	0,99831	-
Laudo 13673_2 – Ano 1976	-	-	0,99881
Laudo 16138 – Ano 1978	-	-	0,99743
Laudo 18744 – Ano 1980	0,99571	0,99645	-
Laudo 18775 – Ano 1980	0,99667	0,99670	0,99617
Laudo 27231 – Ano 1986	0,99645	0,99651	-
Laudo 27251 – Ano 1986	0,99591	0,99621	-
Laudo 27261 – Ano 1986	-	-	0,99665

Com relação a região 1 (documento 1) não foram obtidas correlações com as amostras do banco de dados com a mesma formulação (Violeta Cristal e Victoria Blue B). Uma provável explicação seria a baixa frequência de laudos dessa década (apenas 3 laudos) que apresentam apenas esses dois corantes. O estudo de datação ficou prejudicado pelo número pequeno de amostras encontradas nas décadas de 60, 70 e 80.

Para a região 4, cuja tinta continha apenas o corante Basic Blue 7, não foram obtidos bons resultados. Como já visto anteriormente, a degradação desse corante se dá de forma lenta com a perda de grupos etila, mesmo após quatro décadas. Para esse caso, observam-se muitas correlações com laudos de diversos anos (de 1962 a 1996), portanto essa formulação não se mostra muito interessante para o estudo de datação por intermédio de corantes.

Os resultados obtidos mostram que o método é adequado para estimar uma faixa de tempo de lançamento da tinta no papel para a formulação 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC), com um intervalo de confiança de 95%, mesmo sem o conhecimento prévio das condições ambientais às quais o documento foi submetido. Importante lembrar que essa formulação foi a mais comum entre as tintas estudadas, o que intensifica a relevância dos bons resultados para essa composição de corantes.

6.4.2 Estudo de caso 2 – Ano 2012

O segundo estudo de caso se trata de um recibo, datado de 17 de maio de 2012. Dentre as informações solicitadas à perícia criminal pelo delegado de polícia estava a existência de indícios de elaboração extemporânea do recibo e a confirmação de que a caneta utilizada foi a mesma para o preenchimento do texto e da assinatura. A Figura 63 ilustra esse documento questionado encaminhado para avaliação. As regiões destacadas e enumeradas correspondem às áreas amostradas submetidas à análise por TOF (INC/PF). A região sobreposta com um retângulo preto visa manter o sigilo da investigação policial.

RECIBO Nº VALOR # 195,00 #

Recebi (emos) de [redacted] 1

a quantia de Cento e Noventa e Cinco Reais

Correspondente a 3 metros de aproximadamente 2

Assinatura [signature] 3

Nome 1.883.117 4

Endereço [redacted] 5

Figura 63 - Documento questionado com regiões analisada por TOF/MS em destaque - Estudo de caso 2

Os exames visuais preliminares revelaram características similares, em termos de cor, espessura do traço e tipo de tinta, em todos os campos manuscritos do documento questionado, indicando que foi utilizada uma caneta do tipo esferográfica de tinta azul no seu preenchimento.

Nos espectros obtidos das cinco regiões analisadas foram detectados os corantes 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina ($m/z = 268$ Th) e Violeta Cristal ($m/z = 372$ Th), conforme ilustrado

nas Figura 64 a Figura 68. A Figura 69 evidencia a semelhança entre a degradação dos corantes observada em um laudo de 2012 com a obtida nos espectros de massas do documento questionado.

As análises por TOF estabeleceram que os lançamentos de tinta presentes nas regiões 1 a 5 apresentam idêntica composição química de corantes e perfis de degradação concordantes. Esses fatos indicam a possibilidade do documento ter sido escrito com a mesma caneta.

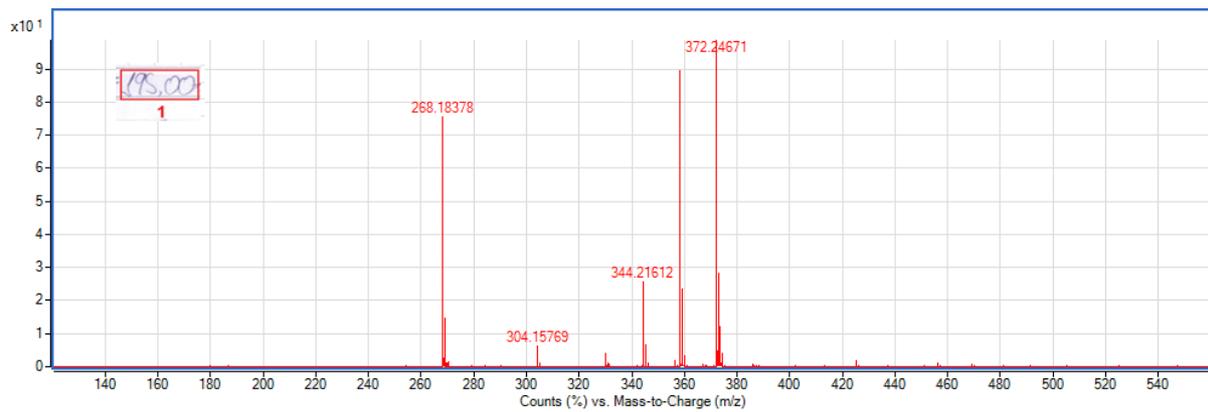


Figura 64 - Espectro de massas da região 1 do documento questionado - Estudo de caso 2

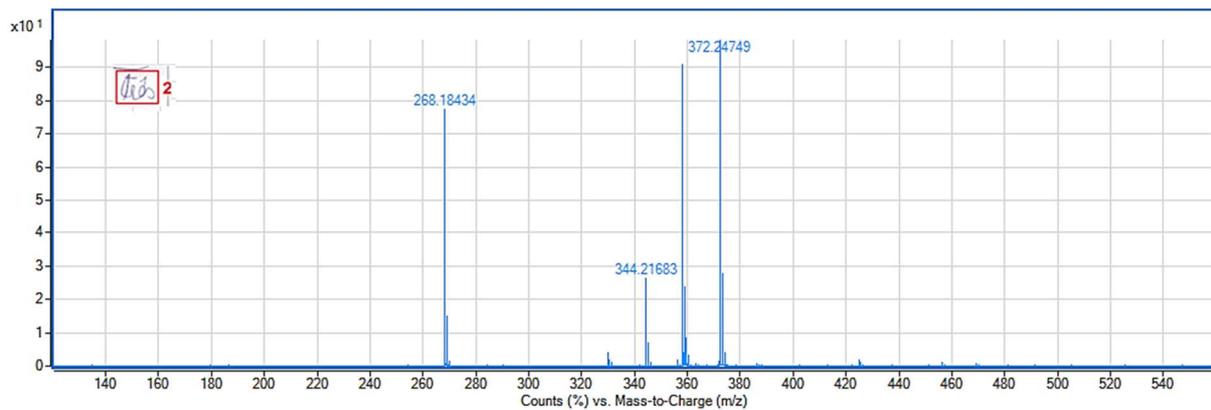


Figura 65 - Espectro de massas da região 2 do documento questionado - Estudo de caso 2

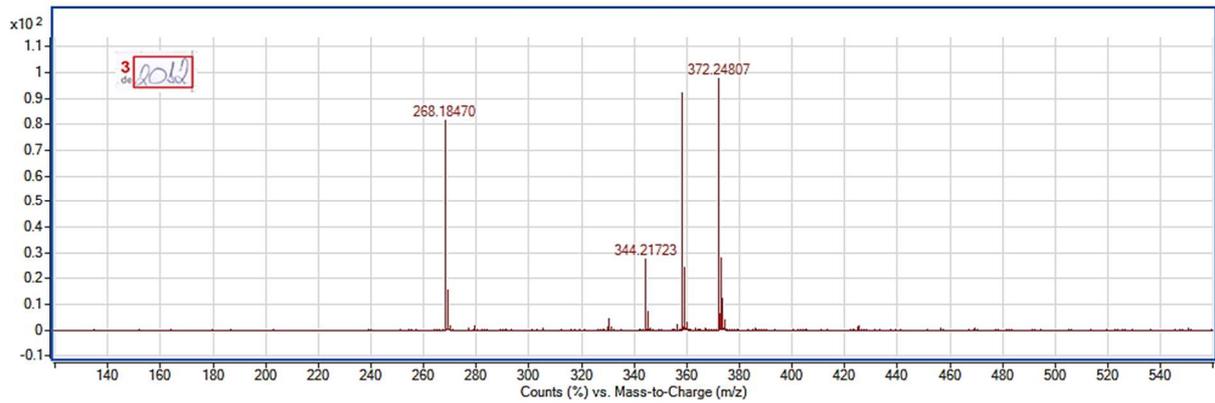


Figura 66 - Espectro de massas da região 3 do documento questionado - Estudo de caso 2

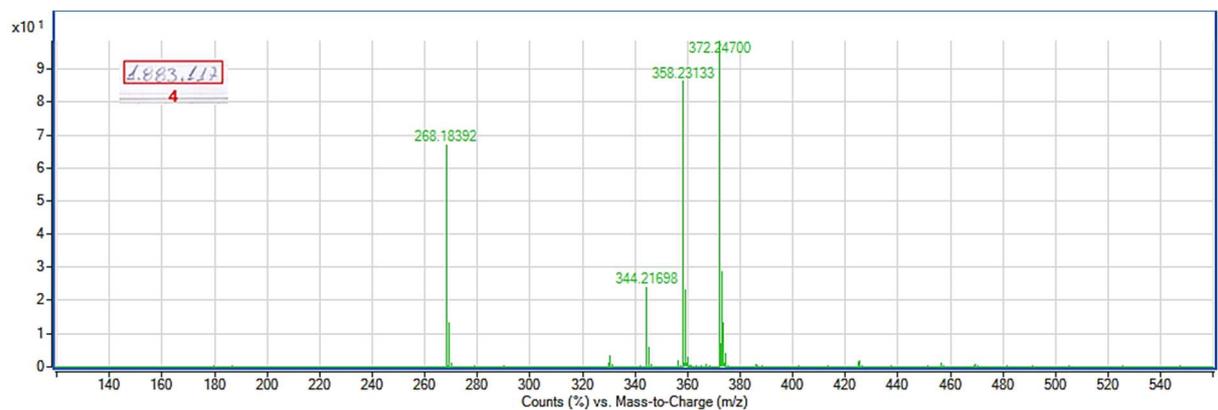


Figura 67 - Espectro de massas da região 4 do documento questionado - Estudo de caso 2

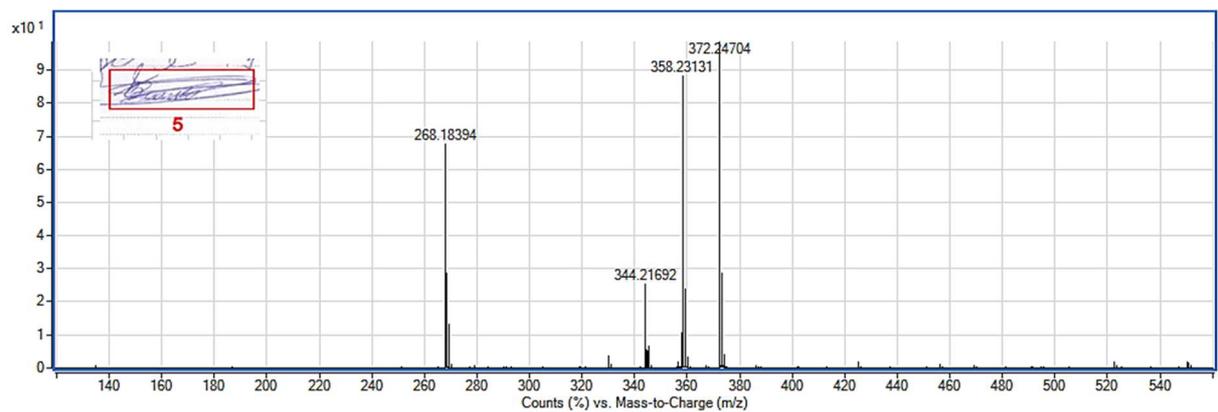


Figura 68 - Espectro de massas da região 5 do documento questionado - Estudo de caso 2

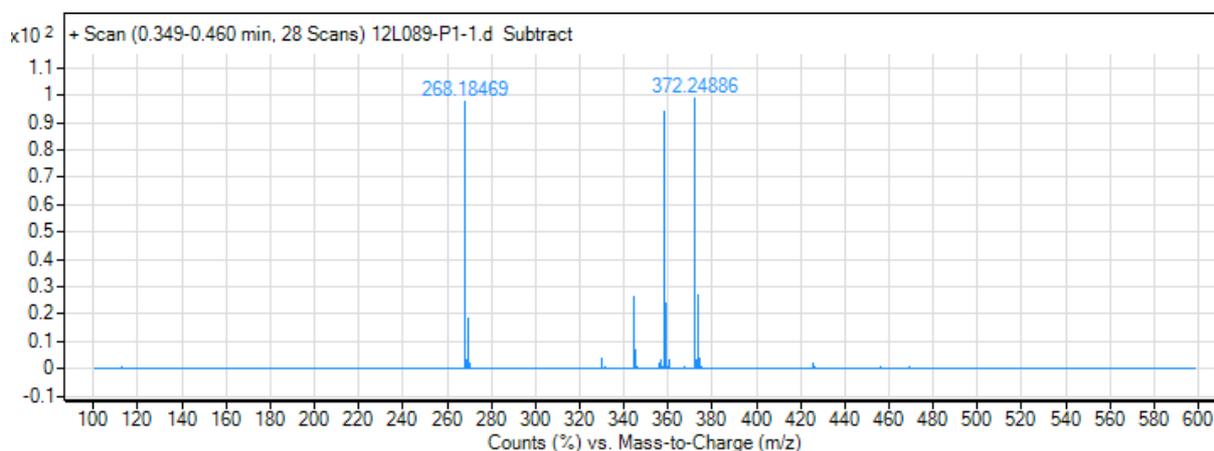


Figura 69 - Espectro de massas de um lançamento presente em um laudo de 2012.

O método ULT foi aplicado para análise das correlações das amostras do documento questionado com as do banco de dados, de mesma formulação (GC). A Tabela 30 traz os valores de ρ das correlações obtidas com a aplicação do método. Foram obtidas correlações ($\rho > \rho_{NL}$) das regiões 1 a 5 com amostras de tinta de laudos produzidos em 2004, 2006, 2010, 2012 e 2014. Observa-se que o erro de datação entre essas correlações foi de no máximo 8 anos, considerando que o documento questionado tenha sido realmente escrito em 2012. Esse resultado é compatível com o erro de datação obtido para 95% das amostras com a formulação GC (10 anos), presentes no banco de dados.

Com os dados de correlações mostrados na Tabela 30, é possível inferir, com 95% de confiança, que os corantes presentes nas regiões 1 a 5 possuem um perfil de degradação semelhante ao obtido para amostras produzidas entre 2004 e 2014. O banco de dados continha apenas 5 amostras de tinta com a formulação GC produzidas em 2014. Dessas, apenas uma não correlacionou com as tintas retiradas do documento questionado. Uma melhor estimativa a respeito da recentidade desse manuscrito pode ser obtida com o aumento do número de amostras com essa formulação no banco de dados de tintas. Além disso, a realização de análises adicionais, como, por exemplo, a determinação da perda de componentes voláteis das tintas, pode trazer informações sobre a recentidade das tintas, pois esse tipo de método é indicado para a datação de documentos com até 2 anos de idade.⁴⁸

Tabela 30 - Valores de $\rho > \rho_{NL}$ para laudos correlacionados com as tintas das regiões 1 a 5 do documento questionado - estudo de caso 2 ($\rho_{NL} = 0.9956$)

Laudos correlacionados	Região 1	Região 2	Região 3	Região 4	Região 5
Laudos 1096 – Ano 2004	0.9994	0.9998	0.9999	0.9984	0.9997
Laudos 1101 – Ano 2004	0.9988	0.9996	0.9999	0.9981	0.9996
Laudos 1119 – Ano 2004	0.9999	0.9980	0.9993	0.9956	0.9997
Laudos 1127 – Ano 2004	0.9972	0.9995	0.9988	0.9991	0.9979
Laudos 777 – Ano 2006	0.9984	-	0.9960	-	0.9971
Laudos 804 – Ano 2006	0.9982	-	0.9957	-	0.9969
Laudos 805 – Ano 2006	0.9999	0.9992	0.9997	0.9976	0.9998
Laudos 952 – Ano 2010	-	-	-	0.9960	-
Laudos 075 – Ano 2012	0.9983	0.9999	0.9995	0.9992	0.9989
Laudos 089 – Ano 2012	0.9998	0.9976	0.9990	0.9950	0.9995
Laudos 309 – Ano 2012	0.9995	0.9990	0.9999	0.9969	0.9999
Laudos 312 – Ano 2012	0.9969	0.9991	0.9982	0.9996	0.9971
Laudos 1000 – Ano 2014	0.9999	0.9992	0.9998	0.9975	0.9998

Conclusão

7 Conclusão

O método proposto para análise de tintas de canetas esferográficas por espectrometria de massas por tempo de voo permitiu a obtenção de informações úteis nas investigações forenses, como, por exemplo, o conhecimento das formulações de corantes predominantes nas tintas. O método se mostrou rápido, eficiente, além de apresentar a vantagem de envolver um procedimento de preparo de amostra relativamente simples que, apesar de ser minimamente destrutivo, não se mostrou um empecilho na aplicação em documentos questionados encaminhados para perícia.

As figuras de mérito avaliadas na etapa de validação apresentaram bons resultados. O método apresentou repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial, além de reprodutibilidade satisfatória em equipamentos distintos, com amostras produzidas por diferentes analistas. Considerando esses resultados, o método foi validado e atende os critérios de aceitação estabelecidos pelo sistema de gestão da qualidade do laboratório de química forense do INC.

O estudo populacional, por meio de um banco de dados construído com laudos provenientes do arquivo do INC/PF, permitiu identificar as diferentes composições presentes nas tintas de canetas apostas em documentos produzidos entre 1962 a 2014. Além disso, pôde-se verificar as formulações mais usuais em tintas de canetas azuis e pretas e a prevalência temporal de cada formulação encontrada.

Por meio dos espectros de massas adquiridos das tintas lançadas nos laudos, foi possível conhecer o comportamento de degradação com o tempo de 5 corantes considerados individualmente e de 6 formulações de tinta mais frequentes no conjunto de amostras estudado. A aplicação do método ULT⁷⁶ permitiu a identificação de correlações entre pares de amostras de tintas de caneta, de datas de lançamento conhecidas. Esse estudo estatístico possibilitou a definição de valores limites de correlação para cada corante individual ou formulação detectada. Os resultados obtidos apontam que os melhores candidatos a marcador de datação individual e por formulação, são respectivamente a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (G) e a combinação 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina com Violeta Cristal (GC). Essa informação é de suma importância para as investigações forenses de documentos, visto que a formulação GC se mostrou a mais abundante entre as 505 amostras analisadas.

A análise de correlação utilizada permitiu analisar o complexo fenômeno de datação de manuscritos por intermédio da degradação natural de corantes sem a necessidade de levar em conta variáveis não controladas e imprevisíveis como o histórico de armazenamento do documento, a composição inicial da tinta de caneta e as propriedades do suporte (papel) utilizado.

A metodologia proposta nesse trabalho é inovadora e pioneira, pois até o momento não há registros na literatura da criação de um banco de dados envolvendo amostras de tinta de caneta esferográfica produzidas em cinco décadas distintas e da aplicação a casos reais de um método de correlação estatística para estimar a idade de lançamentos gráficos em documentos.

Perspectivas Futuras

8 Perspectivas Futuras

Como sugestões de trabalhos futuros, recomenda-se o estudo cinético da foto-oxidação acelerada de corantes sob condições controladas (iluminação artificial intensa), com o objetivo de entender o fenômeno da degradação do ponto de vista químico e sua aplicação no contexto da datação química de documentos.

Além disso, sugere-se a realização de experimentos MS/MS para diferenciar a ocorrência dos corantes Rodamina 6G e B e para elucidar as estruturas correspondentes às amostras anômalas que foram excluídas do banco de dados. Esses casos incluíam perdas de grupamentos etila a partir do precursor m/z 268 e a ocorrência de um único pico (m/z 240) aparentemente não correspondente à série de degradação proposta para a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (G). Esse tipo de experimento, associado ao estudo cinético de degradação dos corantes, poderá permitir a elucidação dos comportamentos atípicos observados.

A realização de testes cegos, isto é, com amostras de origem e data de confecção desconhecidas pelos analistas, também é recomendada para aferir de maneira mais efetiva o desempenho do método desenvolvido neste trabalho. Além disso, outros solventes para extração deverão ser testados com o objetivo de otimizar essa etapa do trabalho.

A possibilidade de utilização de documentos-padrão com data de confecção conhecida e obtidos no contexto da própria investigação policial (ao invés de documentos-padrão provenientes do arquivo do INC) poderia reduzir significativamente os erros envolvidos, pela maior similaridade no histórico de armazenamento em relação aos documentos questionados. Os próximos estudos de casos devem, se possível, incorporar essas informações.

Datações de documentos mais recentes (tipicamente de até 02 anos de idade) necessitam envolver fenômenos físico-químicos mais rápidos como, por exemplo, a evaporação de solventes. A análise química de solventes residuais em amostras reais e controladas de lançamentos gráficos pode fornecer informações complementares ao método desenvolvido no presente trabalho. Além disso, para que se adquira um conhecimento mais completo do fenômeno de envelhecimento de tintas, uma outra possibilidade ainda pouco explorada na literatura seria o estudo da datação de manuscritos por meio da avaliação do endurecimento (polimerização) de resinas com o passar do tempo.

Referências Bibliográficas

9 Referências Bibliográficas

1. Bruni, A. T.; Velho, J. A.; Oliveira, M. F. de.; *Fundamentos de Química Forense: uma análise prática da química que soluciona crimes*. Millennium Editora: Campinas, Brasil, 2012.
2. Romão, W.; Schwab, N. V.; Bueno, M. I. M. S.; *Química Nova* **2011**, 34 (10), 1717-1728.
3. Velho, J. A.; Geiser, G. C.; Espindula, A. *et al.*; *Ciências Forenses - Uma Introdução às Principais Áreas da Criminalística Moderna*. Millennium: Campinas, Brasil, 2013.
4. Jones, R. W.; Cody, R. B.; McClelland, J. F.; *Journal of Forensic Sciences* **2006**, 51 (4), 915-918.
5. Ng, L.; Lafontaine, P.; Brazeau, L.; *Journal of Forensic Sciences* **2002**, 47 (6).
6. Mitchell, C. A.; *Inks: Their Composition and Manufacture*. Griffin: London, Inglaterra, 1907.
7. Silva, E. S. C.; Feuerharmel S.; *et al.*; *Documentoscopia: Aspectos científicos, técnicos e jurídicos*. Millennium Editora: Campinas, Brasil, 2013.
8. BRASIL. Ministério da Justiça. *Relatório Estatístico das Atividades do Sistema Nacional de Criminalística de 2014*. Brasília, 2015. 81p.
9. Gondra, M. E.; Grávalos, G. R.; *Instrumentos de escritura manual y sus tintas*. Buenos Aires, Argentina, 2010.
10. Fazenda, J. M. R.; *Tintas e vernizes: Ciência e Tecnologia*. Edgard Blücher Ltda.: São Paulo, Brasil, 2005.
11. Brunelle, R. L.; Crawford, K. R.; *Advances in the Forensic Analysis and Dating of Writing Ink*. Charles C. Thomas: Illinois, EUA, 2003.
12. Aginsky, V. N.; *Journal of the American Society of Questioned Document Examiners* **2006**, 9 (1), 19-27.
13. Ezcurra, M.; Góngora, J. M. G.; Maguregui, I.; Alonso, R.; *Forensic Science International* **2010**, 197, 1-20.
14. Brunelle, R. L.; *Journal of Forensic Sciences* **1992**, 37 (1), 113-124.
15. Monteiro, L. C.; Lobo, A. C. O.; *Programa de Análise de Produtos: Relatório sobre Análise em Canetas Esferográficas*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, 2010.
16. Denman, J. A.; Skinner, W. M.; Kirkbride, K. P.; Kempson, I. M.; *Applied Surface Science* **2010**, 256, 2155-2163.
17. Brunelle, R. L.; Reed., R. W.; *Forensic Examination of ink nad paper*. Charles C Thomas Pub Ltd: Illinois, EUA, 1984
18. Mazella, W. D.; Buzzini, P.; *Forensic Science International* **2005**, 152, 241-247.
19. Wilson, J. D.; LaPorte, G. M.; Cantu, A. A.; *Journal of Forensic Sciences* **2004**, 49 (2), 364-370.
20. Thanasoulas, N. C.; Parisi, N. A.; Evmiridis, N. P.; *Forensic Science International* **2003**, 138, 75-84.
21. Zieba-Palus, J.; Borusiewicz, R.; Kunicki, M.; *Forensic Science International* **2008**, 175, 1-10.

22. Lalli, P. M.; Sandivo, G. B.; Garcia, J. S.; Haddad, R.; Cosso, R. G.; Maia, D. R. J.; Zacca, J. J.; Maldaner, A. O.; Eberlin, M. N.; *Analyst* **2010**, *135* (4), 745-750.
23. Ifa, D. R.; Gumaelius, L. M.; Eberlin, L. S.; Manicke, N. E.; Cooks, R. G.; *Analyst* **2007**, *137*, 461-467.
24. Aginsky, V. N., *Journal of Forensic Sciences* **1993**, *38* (5), 1131-1133.
25. Jasuja, O. P.; Singla, A. K.; Mand, M. K.; Lyter, A. H.; *Journal of American Society of Questioned Document Examiners* **2005**, *83* (8), 83-86.
26. Lyter, A. H.; *Journal of Forensic Sciences* **1982**, *27* (1), 154-160.
27. Whiting, T. D.; *The American Society of Questioned Document Examiners* **1998**, *1* (1).
28. Halim, M. I. A.; Saim, N.; Osman, R.; Jasmani, H.; Abidin, N. N. Z.; *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* **2013**, *17* (2), 230-235.
29. Merrill, R. A.; Bartick, E. G., *Journal of Forensic Sciences* **1992**, *37* (2), 528-541.
30. Wang, J.; Luo, G.; Sun, S.; Wang, Z.; Wang, Y.; *Journal of Forensic Sciences* **2001**, *46* (5), 1093-1097.
31. Kher, A.; Mulholland, M.; Green, E.; Reedy, B.; *Vibrational Spectroscopy* **2006**, *40*, 270-277.
32. Causin, V.; Casamassima, R.; Marega, C.; Maida, P.; Schiavone, S.; Marigo, A.; Villari, A.; *Journal of Forensic Sciences* **2008**, *53* (6), 1468-1473.
33. Pachuta, S. J.; Staral, J. S.; *Analytical Chemistry* **1994**, *66* (2), 276-284.
34. Dunn, J. D.; Allison, J.; *Journal of Forensic Sciences* **2007**, *52* (5), 1205-1211.
35. Weyermann, C.; Marquis, R.; Mazzella, W.; Spengler, B.; *Journal of Forensic Sciences* **2007**, *52* (1), 216-220.
36. Williams, M. R.; Moody, C.; Arceneaux, L.; Rinke, C.; White, K.; Sigman, M. E.; *Forensic Science International* **2009**, *191*, 97-103.
37. Coumbaros, J.; Kirkbride, K. P.; Klass, G.; Skinner, W.; *Forensic Science International* **2009**, *193*, 42-46.
38. Jones, R. W.; McClelland, J. F.; *Forensic Science International* **2013**, *231*, 73-81.
39. Ferreira, P. S.; Silva, D. F. A.; Augusti, R.; Piccin, E.; *Analyst* **2015**, *140*, 811-819.
40. Weyermann, C.; Kirsch, D.; Costa-Vera, C.; Spengler, B.; *Journal of American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 297-306.
41. Weyermann, C.; Spengler, B.; *Forensic Science International* **2008**, *180*, 23-31.
42. Andrasko, J.; *Journal of Forensic Sciences* **2001**, *46* (1), 21-30.
43. Brunelle, R. L.; Cantu, A. A.; *Journal of Forensic Sciences* **1987**, *32* (6), 1522-1536.
44. Cantu, A. A.; Prough, R. S.; *Journal of Forensic Sciences* **1987**, *32* (5), 1151-1174.
45. Grim, D. M., Siegel, J.; Allison, J.; *Journal of Forensic Sciences* **2002**, *47* (6), 1265-1273.
46. Andrasko, J.; Kunicki, M.; *Journal of Forensic Sciences* **2005**, *50* (3), 542-547.
47. Weyermann, C.; Almog, J.; Bügler, J.; Cantu, A.A.; *Forensic Science International* **2011**, *210*, 52-62.

48. Brazeau, L.; Gaudreau, M.; *Journal of Forensic Sciences* **2007**, 52 (1), 209-215.
49. LaPorte, G. M.; Wilson, J. D.; Cantu, A. A.; Mancke, A.; Fortunato, S. L.; *Journal of Forensic Sciences* **2004**, 49 (1), 155-159.
50. Locicero, S.; Dujourdy, L.; Mazzella, W.; Margot, P.; Lock, E.; *Science & Justice* **2004**, 44 (3), 165-171.
51. Weyermann, C.; Kirsch, D.; Vera, C. C.; Spengler, B.; *Forensic Science International* **2007**, 168, 119-127.
52. Berger-Karin, C.; Hendriks, U.; Geyer-Lippmann, J.; *Journal of Forensic Sciences* **2008**, 53 (4), 989-992.
53. Bügler, J. H.; Buchner, H.; Dallmayer, A.; *Journal of Forensic Sciences* **2008**, 53 (4), 982-988.
54. Koenig, A.; Magnolon S.; Weyermann, C.; *Forensic Science International* **2015**, 252, 93-106.
55. Koenig, A.; Bügler, J.; Kirsch, D.; Köhler, F.; Weyermann, C.; *Journal of Forensic Sciences* **2015**, 60 (S1), S152-S161.
56. Román, I. S.; Bartolomé, L.; Alonso, M. L.; Alonso, R. M.; Ezcurra, M.; *Analytica Chimica Acta* **2015**, 892, 105-114.
57. Egan, J. M.; Brewer, J. D.; Hagan, K. A.; Strelko, C. L.; *Journal of the American Society of Questioned Document Examiners* **2006**, 9 (1), 37-45.
58. Grim, D. M.; Siegel, J.; Allison, J.; *Journal of Forensic Sciences* **2001**, 46 (6), 1411-1420.
59. Andrasko, J., *Journal of Forensic Sciences* **2001**, 47 (2), 324-327.
60. Grim, D. M.; Siegel, J.; Allison, J.; *Journal of Forensic Sciences* **2002**, 47 (6), 1294-1297.
61. Hofer, R., *Journal of Forensic Sciences* **2004**, 49 (6), 1353-1357.
62. Samanidou, V. F.; Nikolaidou, K. I.; Papadoyannis, I. N.; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2004**, 27 (2), 215-235.
63. Siegel, J.; Allison, J.; Mohr, D.; Dunn, J.; *Talanta* **2005**, 67, 425-429.
64. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R.; *Introdução à Espectroscopia*. Cengage Learning: São Paulo, Brasil, 2013.
65. Hoffmann, E.; Stroobant, V.; *Mass Spectrometry: Principles and applications*. John Wiley & Sons, LTD: Chichester, Inglaterra, 2002.
66. Weyermann, C. B., L.; Majcherczyk, P.; Mazzella, W.; Roux, C.; Esseiva, P.; *Forensic Science International* **2012**, 217 (127-133).
67. Dass, C.; *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons: New Jersey, EUA, 2007.
68. Banerjee, S.; Mazumdar, S.; *Int. J. of Anal. Chem.* **2012**, 2012, 40 p.
69. Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; *Química Nova* **2006**, 29 (2), 287-292.
70. <http://qopn.iqsc.usp.br/files/2008/05/cursoem-2.pdf>, acessado em outubro de 2015.
71. Cotter, R. J.; *Analytical Chemistry* **1999**, 71 (13), 445 a 447.

72. Andrews, G. L.; Simons, B. L.; Young, J. B.; Hawkrigde, A. M.; Muddiman, D. C.; *Analytical Chemistry* **2011**, 83, 5442-5446.
73. Cass, Q. B.; Cassiano, N.; *Cromatografia líquida*. Elsevier: Rio de Janeiro, Brasil, 2015.
74. Esseiva, P. D., L.; Anglada, F.; Taroni, P. M., *Forensic Science International* **2003**, 132, 139-152.
74. Esseiva, P.; Dujourdy, L.; Anglada, F.; Taroni, P. M.; *Forensic Science International* **2003**, 132, 139-152.
75. Dujourdy, L.; Besacier, F.; *Forensic Science International* **2008**, 179, 111-122.
76. Zacca, J. J.; Grobério, T. S; Maldaner, A. O.; Vieira, M. L.; Braga, J. W. B.; *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 2457-2464.
77. Fawcett, T.; *Pattern Recognition Letters* **2006**, 27, 861-874.
78. Djovan, D.; Baheri, T.; Kaeimian, G.; Shahidi, M.; *Forensic Science International* **2008**, 179, 199-205.
79. Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; *Química Nova* 2009, 32 (5), 1278-1287.
80. Albano, F. M.; Raya-Rodriguez, M. T.; Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais. Rede Metrológica RS: Porto Alegre, Brasil, 2009.
81. INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003, Brasil, 2003.

Anexos

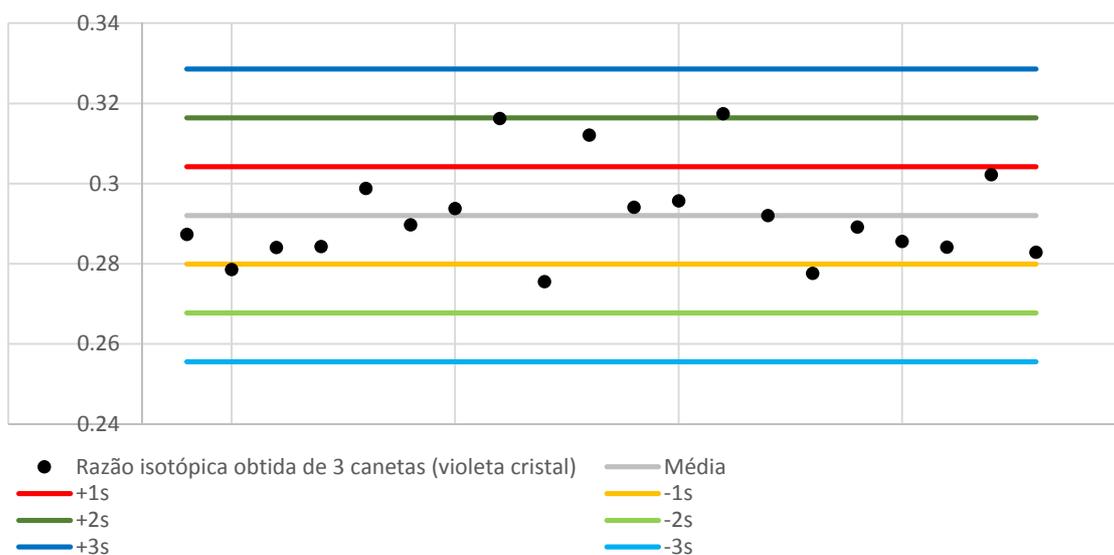
10 Anexos

10.1 Anexo 1 – Razão isotópica para amostras de validação

- Violeta Cristal

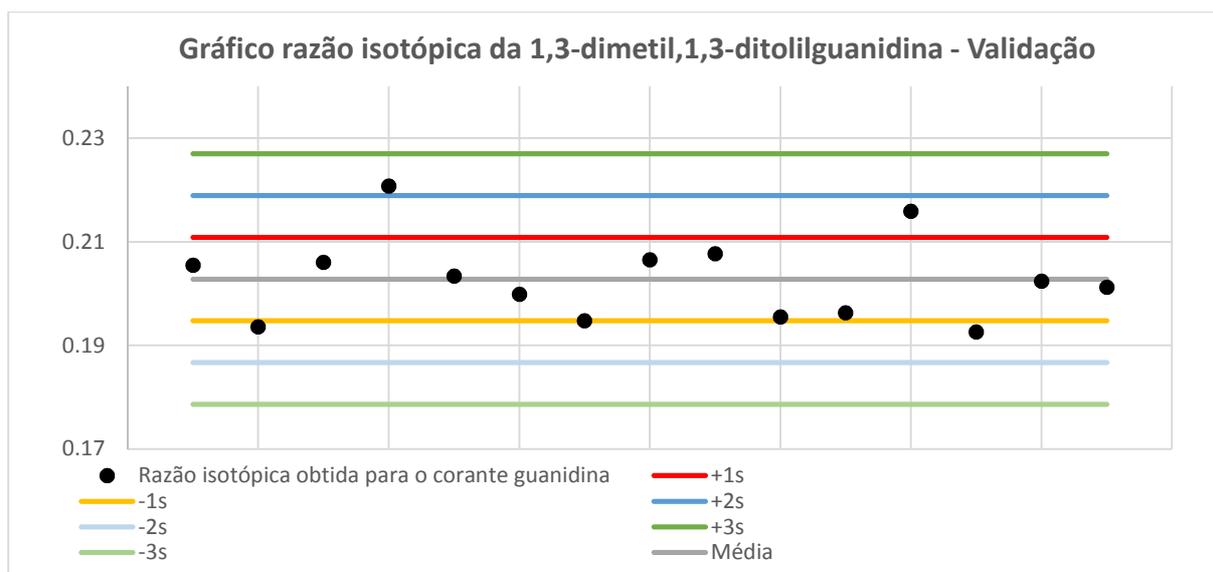
Corante	Caneta	A_{M+1}/A_M	A_M	A_{M+1}
Violeta Cristal	Ve2.1	0.2873204	4803	1380
	Ve2.2	0.2785666	4437	1236
	Ve2.3	0.2840887	5097	1448
	Ve2.4	0.2843291	3816	1085
	Ve2.5	0.2987996	3832	1145
	Ve2.6	0.2897008	5447	1578
	Ve5.0	0.2937905	1079	317
	Ve5.1	0.316209	1129	357
	Ve5.2	0.2755633	1154	318
	Ve5.3	0.3121186	1147	358
	Ve5.4	0.2940724	1299	382
	Ve5.5	0.2956811	1204	356
	Ve5.6	0.3174487	1364	433
	Ve6.0	0.2919977	3524	1029
	Ve6.1	0.2775848	3743	1039
	Ve6.2	0.2891534	3697	1069
	Ve6.3	0.2855912	4643	1326
	Ve6.4	0.2841441	4276	1215
	Ve6.5	0.3022411	4953	1497
Ve6.6	0.2828454	4133	1169	
Média		0.2920623		
Valor teórico		0,270		
Desvio padrão		0.0121662		
Média +1desvio		0.3042285		
Média -1desvio		0.2798962		
Média +2desvio		0.3163946		
Média -2desvio		0.26773		
Média +3desvio		0.3285608		
Média -3desvio		0.2555639		

Gráfico razão isotópica do Violeta Cristal - Validação



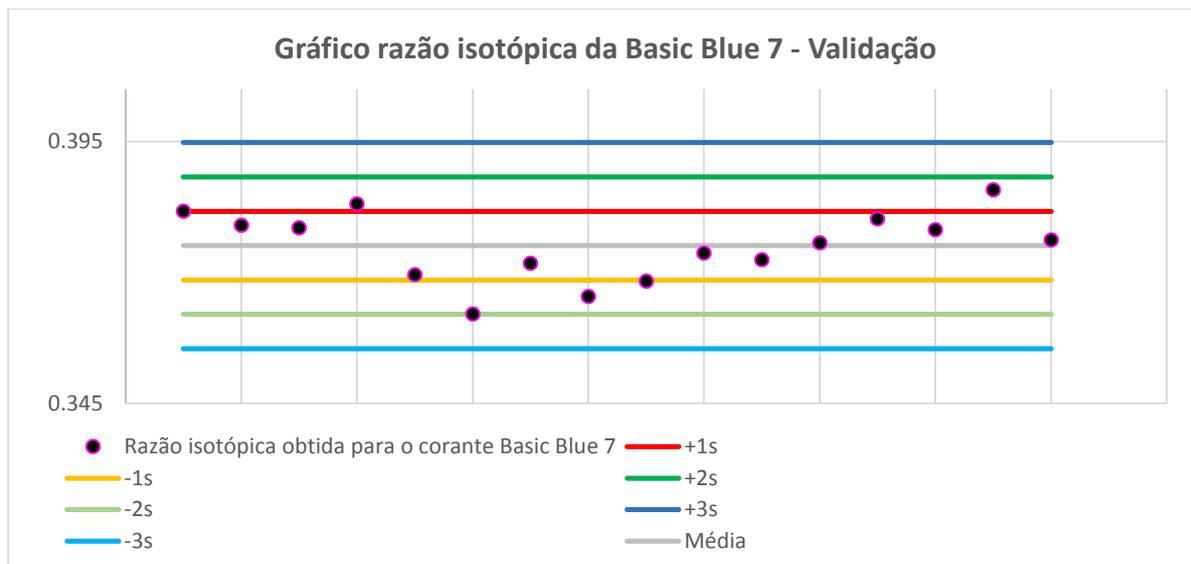
• **1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina**

Corante	Caneta	A_{M+1}/A_M	A_M	A_{M+1}
1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina	Ve2.1	0.2055046	2180	448
	Ve2.2	0.1936312	1947	377
	Ve2.3	0.2060349	2121	437
	Ve2.4	0.2207569	1744	385
	Ve2.5	0.2033988	1883	383
	Ve2.6	0.1999138	2321	464
	Ve2.0K	0.1947764	2259	440
	Ve2.1K	0.2065681	3045	629
	Ve2.2K	0.2077452	2763	574
	Ve2.0Z	0.1954858	2614	511
	Ve2.1Z	0.1962932	2374	466
	Ve2.2Z	0.2158847	3261	704
	Ve2.0M	0.1926084	2814	542
	Ve2.1M	0.2024155	2070	419
	Ve2.2M	0.2012222	2291	461
Média		0.202816		
Valor teórico		0.195		
Desvio padrão		0.0080603		
Média +1desvio		0.2108763		
Média -1desvio		0.1947557		
Média +2desvio		0.2189366		
Média -2desvio		0.1866953		
Média +3desvio		0.2269969		
Média -3desvio		0.178635		



- **Basic Blue 7**

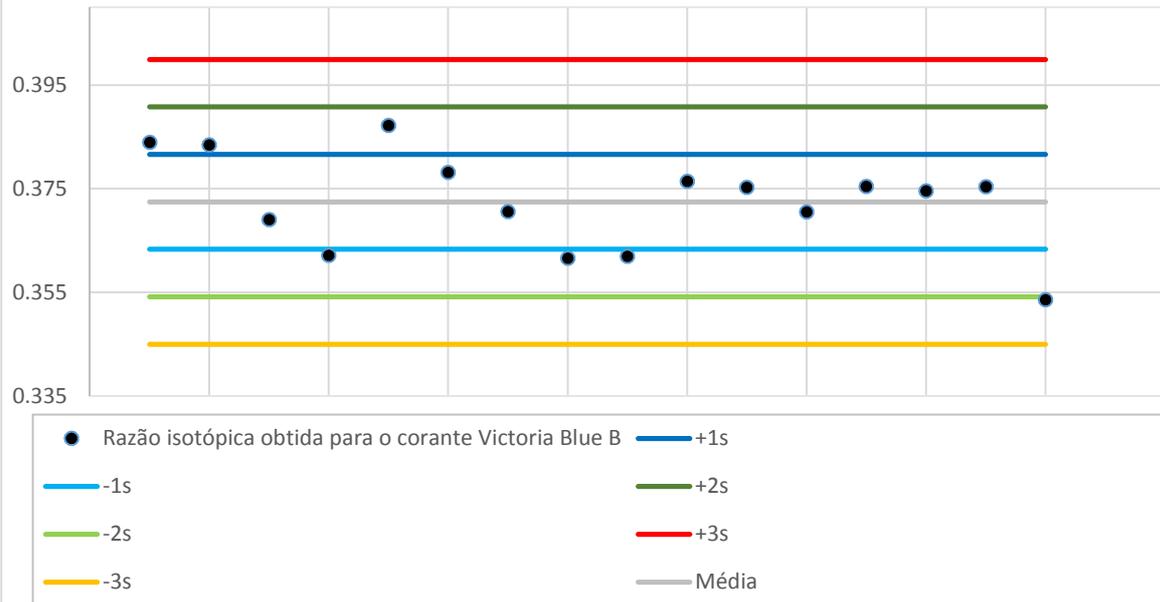
Corante	Caneta	A_{M+1}/A_M	A_M	A_{M+1}
Basic Blue 7	Ve5.0	0.381722	6620	2527
	Ve5.1	0.379004	7087	2686
	Ve5.2	0.378543	6879	2604
	Ve5.3	0.383137	7282	2790
	Ve5.4	0.369565	8326	3077
	Ve5.5	0.362094	7545	2732
	Ve5.6	0.371805	8725	3244
	Ve5.0K	0.365463	15282	5585
	Ve5.1K	0.368353	14706	5417
	Ve5.2K	0.37374	13191	4930
	Ve5.0Z	0.372438	13809	5143
	Ve5.1Z	0.37568	10839	4072
	Ve5.2Z	0.38026	11692	4446
	Ve5.0M	0.378152	15306	5788
	Ve5.1M	0.38577	12790	4934
Ve5.2M	0.376228	20570	7739	
Média		0.375122		
Valor teórico		0.357		
Desvio padrão		0.006557		
Média +1desvio		0.381679		
Média -1desvio		0.368565		
Média +2desvio		0.388236		
Média -2desvio		0.362008		
Média +3desvio		0.394793		
Média -3desvio		0.355451		



- **Victoria Blue B**

Corante	Caneta	A_{M+1}/A_M	A_M	A_{M+1}
Victoria Blue B	Ve6.0	0.383934	4967	1907
	Ve6.1	0.383487	5523	2118
	Ve6.2	0.36903	5360	1978
	Ve6.3	0.362184	6886	2494
	Ve6.4	0.387206	6206	2403
	Ve6.5	0.378162	6997	2646
	Ve6.6	0.37057	5926	2196
	Ve6.0K	0.361577	8344	3017
	Ve6.1K	0.361992	7851	2842
	Ve6.2K	0.376443	5892	2218
	Ve6.0Z	0.375253	5932	2226
	Ve6.1Z	0.370539	7454	2762
	Ve6.2Z	0.375432	6651	2497
	Ve6.0M	0.37458	6853	2567
	Ve6.1M	0.375416	8420	3161
Ve6.2M	0.353604	5854	2070	
Média		0.372463		
Valor teórico		0.368		
Desvio padrão		0.009155		
Média +1desvio		0.381618		
Média -1desvio		0.363309		
Média +2desvio		0.390772		
Média -2desvio		0.354154		
Média +3desvio		0.399927		
Média -3desvio		0.344999		

Gráfico razão isotópica do Victoria Blue B - Validação



10.2 Anexo 2 – Espectros de massa obtidos para as amostras de validação

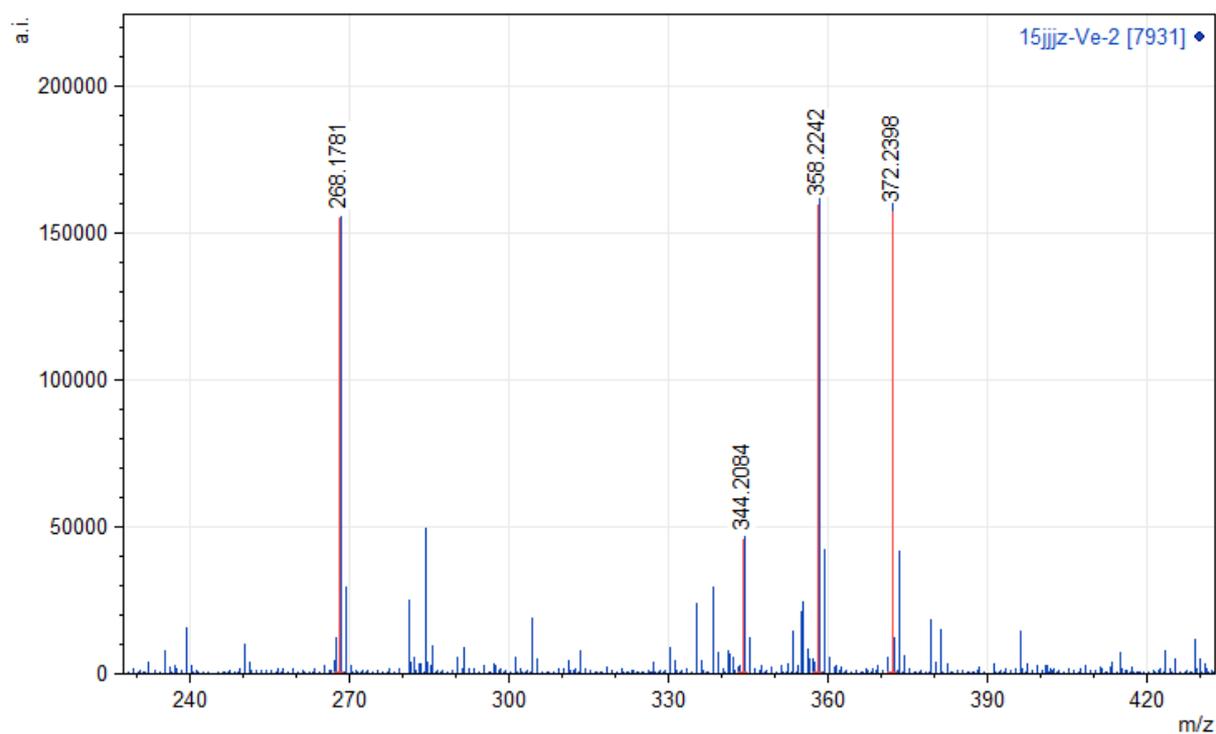


Figura 2.1a – Espectro de massa da tinta da caneta esferográfica 2

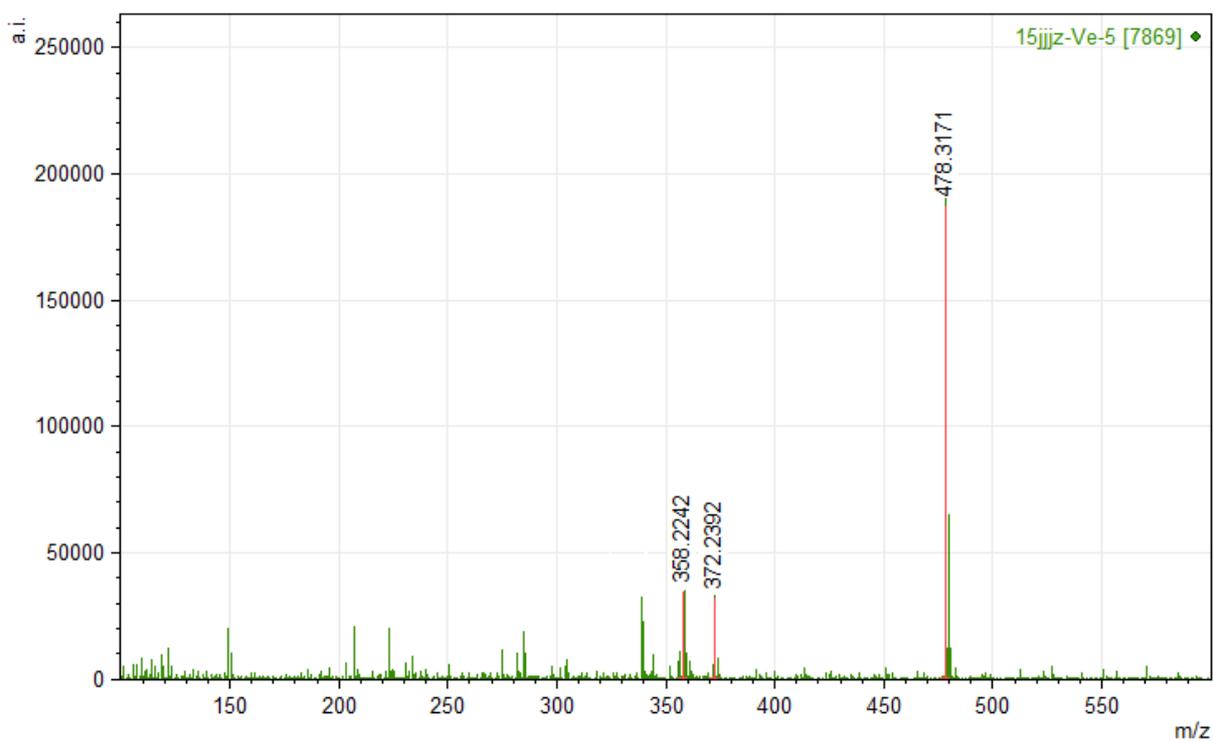


Figura 2.2a – Espectro de massa da tinta da caneta esferográfica 5

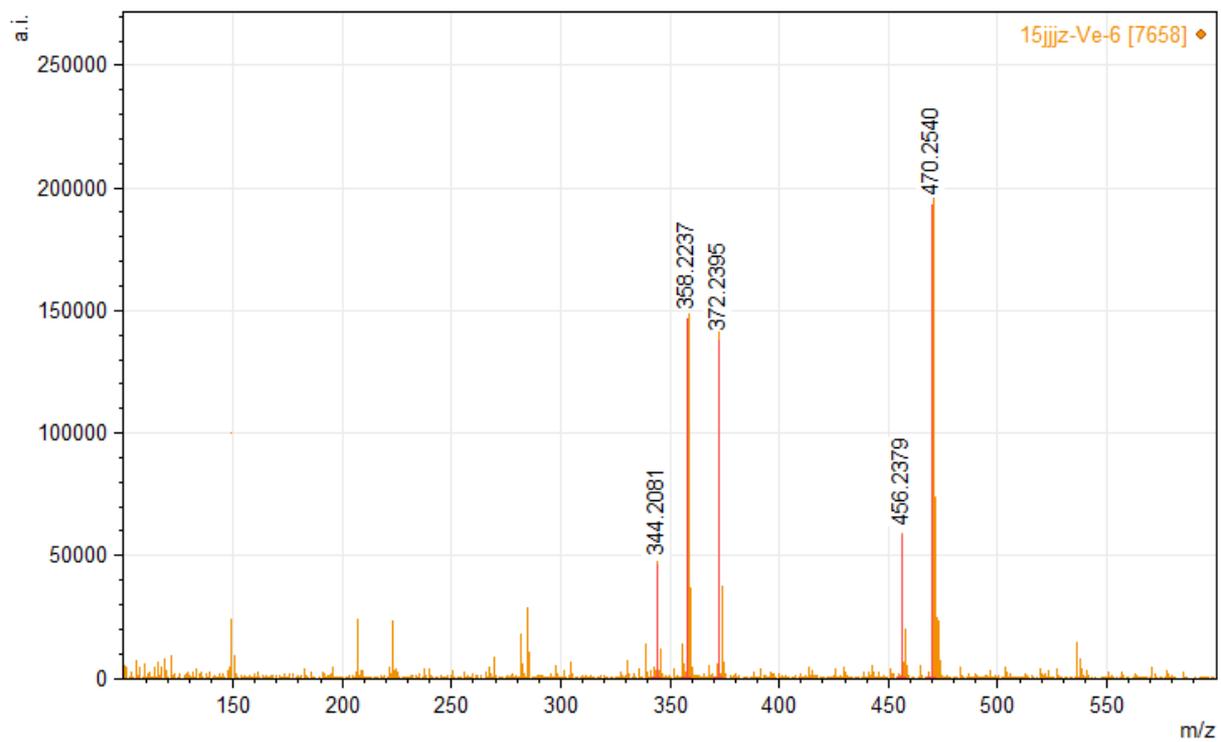


Figura 2.3a – Espectro de massa da tinta da caneta esferográfica 6

10.3 Anexo 3 – Tabelas para escolha do número de classes contendo nclass, AUC, ρ_{NL} e ρ_L para cada corante/ formulação

Tabela 3.1 – Tabela para escolha do número de classes do Violeta Cristal (C) por corante. Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.872814	0.999745	0.507142
3	0.878513	0.999745	0.598523
4	0.880328	0.999745	0.598523
5	0.971812	0.999745	0.802595
6	0.971863	0.999745	0.802595
7	0.972387	0.999745	0.825130
8	0.976350	0.999745	0.875444
9	0.981450	0.999745	0.909286
10	0.981457	0.999745	0.909286
11	0.981635	0.999745	0.909286
12	0.981687	0.999745	0.909286
13	0.980637	0.999745	0.940532

Tabela 3.2 – Tabela para escolha do número de classes da 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (G) por corante. Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.992942	0.689487	0.011038
3	0.998388	0.911391	0.467725
4	0.998342	0.911391	0.528123
5	0.852788	0.997648	0.725572
6	0.854698	0.997648	0.725572
7	0.856450	0.997648	0.725572
8	0.869204	0.997648	0.725572
9	0.934578	0.997648	0.863248
10	0.934897	0.997648	0.878090
11	0.935086	0.997648	0.878090
12	0.942094	0.997648	0.894500
13	0.839585	0.997648	0.898258
14	0.839799	0.997648	0.908910
15	0.839804	0.997648	0.908910
16	0.838863	0.997648	0.935303

Tabela 3.3 – Tabela para escolha do número de classes do Basic Blue 7 (B) por corante. Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.998493	0.982477	0.945898
3	0.997228	0.996980	0.976427

Tabela 3.4 – Tabela para escolha do número de classes do Victoria Blue B (V) por corante. Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.946512	0.999696	0.809727
3	0.959349	0.999696	0.809727
4	0.963550	0.999696	0.936639
5	0.963635	0.999696	0.936639
6	0.965331	0.999696	0.955686
7	0.891111	0.999978	0.968586

Tabela 3.5 – Tabela para escolha do número de classes do Rodamina (R) por corante. Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.99882714	0.998486	0.997521
3	1.0000000	0.999291	0.999369
4	0.96299139	0.999882	0.999758

Tabela 3.6 – Tabela para escolha do número de classes da formulação 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC). Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.9982490	0.599056	0.2467382
3	0.9722226	0.958126	0.5311309
4	0.9879199	0.989095	0.7315526
5	0.9879823	0.989095	0.7315526
6	0.9845996	0.989095	0.8039274
7	0.9845833	0.989095	0.8039274
8	0.9797658	0.993305	0.8039274
9	0.9745772	0.993305	0.8199700
10	0.9742787	0.993305	0.8199700
11	0.9742296	0.993305	0.8199700
12	0.9736762	0.995603	0.8989883
13	0.9784283	0.995603	0.9134995
14	0.9788332	0.995603	0.9134995
15	0.9793005	0.995603	0.9362782
16	0.9794381	0.995603	0.9362782
17	0.9794483	0.995603	0.9362782
18	0.9794398	0.995603	0.9362782

Tabela 3.7 – Tabela para escolha do número de classes da formulação Violeta Cristal e Victoria Blue B (CV). Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.996024	0.940739	0.795811
3	0.752394	0.999317	0.856015
4	0.765268	0.999317	0.856015
5	0.865069	0.999353	0.912451
6	0.875867	0.999353	0.944219
7	0.885295	0.999353	0.944219
8	0.887839	0.999353	0.944219
9	0.925241	0.999353	0.960393
10	0.926501	0.999353	0.964262
11	0.937503	0.999353	0.968177
12	0.943322	0.999686	0.976035
13	0.943535	0.999686	0.976035
14	0.944819	0.999686	0.976035
15	0.945142	0.999686	0.976035
16	0.956183	0.999686	0.977672
17	0.962218	0.999686	0.984249
18	0.963342	0.999686	0.984249
19	0.963798	0.999686	0.984249
20	0.964121	0.999686	0.984249
21	0.967568	0.999686	0.986227
22	0.969412	0.999686	0.987191

Tabela 3.8 – Tabela para escolha do número de classes da formulação 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rodamina e Basic Blue 7 (GRB). Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.999287	0.9674824	0.930456
3	0.988537	0.9898500	0.959032

Tabela 3.9 – Tabela para escolha do número de classes do corante 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina da formulação GRB. Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.9998447	0.755687	0.669820
3	0.9355437	0.966043	0.719837
4	0.9721535	0.966043	0.898476
5	0.9711185	0.966043	0.898476
6	0.8755405	0.991383	0.922884
7	0.8952614	0.997489	0.952282
8	0.8956878	0.997489	0.952282
9	0.8958383	0.997489	0.952282
10	0.9911278	0.997489	0.966416
11	0.9940414	0.997489	0.983612
12	0.9936585	0.997489	0.984040

Tabela 3.10 – Tabela para escolha do número de classes da formulação Basic Blue 7 (B). Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.991535	0.981107	0.950819
3	0.985225	0.996269	0.981865

Tabela 3.11 – Tabela para escolha do número de classes da formulação Violeta Cristal (C). Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.9963344	0.902408	0.7994307
3	0.9827258	0.995485	0.9286140
4	0.9837479	0.995485	0.9480151
5	0.9903160	0.998608	0.9722109
6	0.9929292	0.998608	0.9799898
7	0.9935387	0.998608	0.9828061
8	0.9947973	0.998608	0.9859970
9	0.9935926	0.998608	0.9897846

Tabela 3.12 – Tabela para escolha do número de classes da formulação Violeta Cristal e Basic Blue 7 (CB). Em destaque (cor vermelha, negrito) estão nclass, ρ_{NL} e ρ_L escolhidos de acordo com os critérios mostrados na seção 4.1.5.

nclass	AUC	ρ_{NL}	ρ_L
2	0.808414	0.944630	0.748868
3	0.992812	0.986884	0.929676
4	0.990255	0.986884	0.929676

10.4 Anexo 4 – Histogramas obtidos para – 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (G por corante) e para a formulação 1,3- dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC)

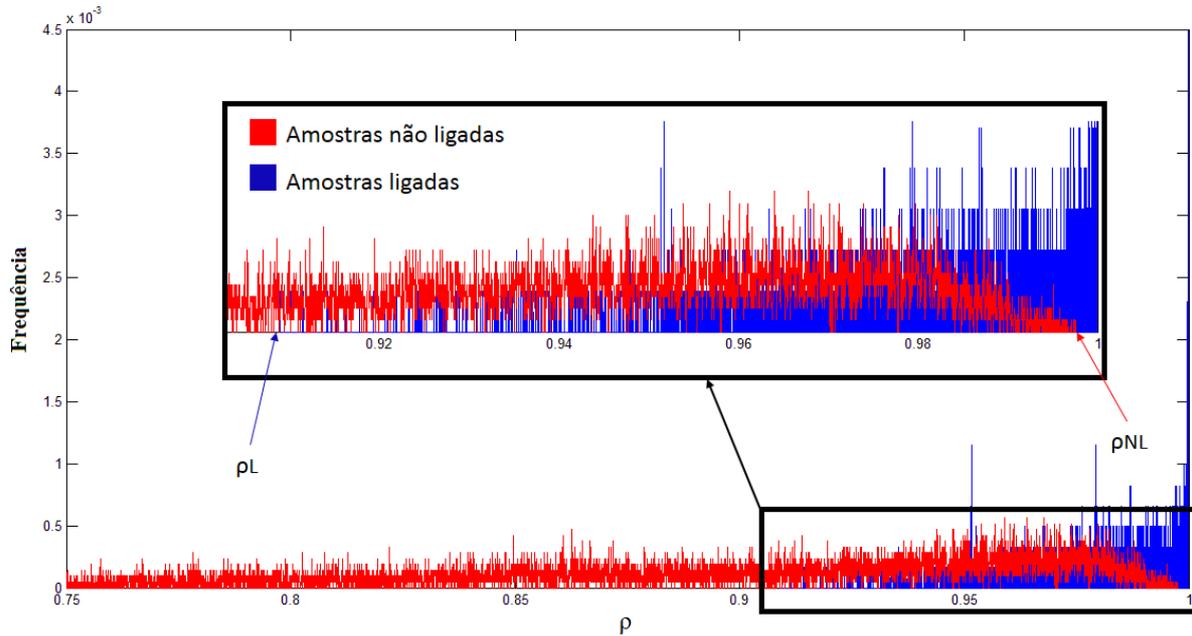


Figura 4.1a – Histograma obtido para 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (G por corante) para número de classe (nclass) igual a 15 ($\rho_L = 0,9093$ e $\rho_{NL} = 0,9997$) e ampliação da região de sobreposição

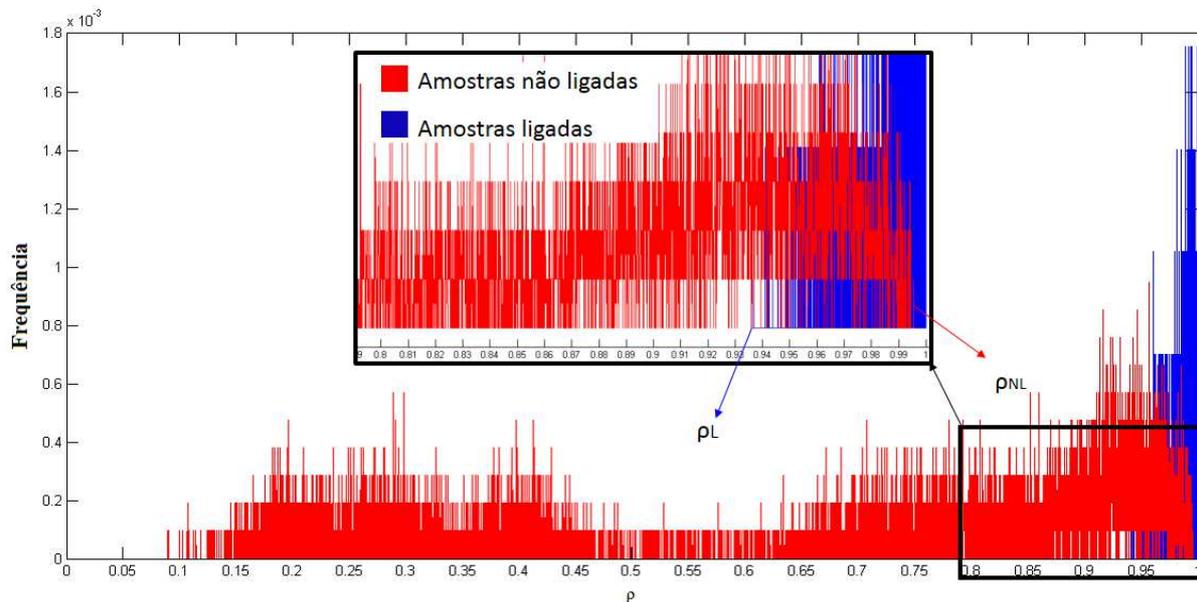


Figura 4.2b – Histograma obtido para a formulação 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Violeta Cristal (GC) para número de classe (nclass) igual a 17 ($\rho_L = 0,9363$ e $\rho_{NL} = 0,9956$) e ampliação da região de sobreposição