



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA DATAÇÃO DE DOCUMENTOS E
ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL DE LANÇAMENTOS DE TINTA DE CANETA
ESFEROGRÁFICA POR LC-MS/TOF**

GRAZIELA SILVA CAIADO

ORIENTADOR: Dr. JORGE JARDIM ZACCA

COORIENTADOR: Prof. Dr. JEZ WILLIAN BATISTA BRAGA

Brasília, DF

2018



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA DATAÇÃO DE DOCUMENTOS E
ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL DE LANÇAMENTOS DE TINTA DE CANETA
ESFEROGRÁFICA POR LC-MS/TOF**

GRAZIELA SILVA CAIADO

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

Coorientador: Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Brasília, DF

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Graziela Silva Caiado**, matrícula nº **16/0096006**, intitulada "**AVALIAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA DATAÇÃO DE DOCUMENTOS E ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL DE LANÇAMENTOS DE TINTA DE CANETA ESFEROGRÁFICA POR LC-MS/TOF**", apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 8 de fevereiro de 2018.

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

Prof. Dr. Adriano Otávio Maldaner
Membro Titular (INC/PF)

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

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 8 de fevereiro de 2018.

Agradecimentos

Aos meus pais, Gabriel e Graça. Obrigado pelo amor, pelos bons exemplos, pela dedicação e pelo apoio sempre, incondicionalmente;

A minha irmã Gabriela, e ao meu cunhado Ramon, obrigado pelo incentivo, carinho e força;

Ao meu parceiro, Heitor Rodrigues, que esteve presente durante todo o processo;

Ao meu orientador Dr. Jorge Jardim Zacca e ao meu coorientador Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga, pelos ensinamentos, paciência, atenção, amizade e apoio;

Aos poucos verdadeiros amigos que possuo, mesmo que nem todos estejam aqui em Brasília, e que alguns estejam espalhados pelo mundo, vocês se fazem sempre presentes, obrigada pelo incentivo e amizade;

Ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, pela oportunidade.

À CAPES, pela bolsa de estudos e pelo financiamento dessa dissertação através do projeto PROFORENSE (processo AUXPE nº 3509/2014);

Ao Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal, por toda a infraestrutura para a realização dos experimentos.

E a todos que, de alguma forma colaboraram ao longo do trabalho, meu sincero obrigado.

Resumo

A determinação da idade de manuscritos em documentos questionados pode ser uma informação importante nos casos forenses. A datação pode ser realizada analisando o comportamento químico dos corantes presentes na tinta da caneta. Atualmente, ainda não existem métodos que consigam a datação absoluta de tintas de caneta em papel que possam ser amplamente usados. Um objetivo deste trabalho foi desenvolver um método quimiométrico de regressão por mínimos quadrados parciais para a datação de lançamentos de tinta de caneta esferográfica em papel e compará-lo com outro método que foi desenvolvido anteriormente pelo mesmo laboratório. Os métodos quimiométricos se mostraram complementares e a sua escolha dependerá da formulação da tinta da caneta a ser analisada. O segundo objetivo desse estudo foi explorar a cinética da degradação de corantes (em especial do corante Cristal Violeta) por intermédio de envelhecimento artificial. Os resultados obtidos mostram que a taxa de degradação dos corantes é função da composição inicial da tinta de caneta. A degradação natural de manuscritos em documentos reais envolvendo uma faixa de tempo de 14 anos foi modelada a partir das constantes cinéticas obtidas experimentalmente no envelhecimento artificial, assumindo-se reações de primeira ordem.

Palavras chaves: Caneta esferográficas; Corante; Cristal Violeta; Quimiometria; ULT; PLSR; Envelhecimento artificial.

Abstract

Age determination of manuscripts on a questioned document is extremely relevant from a forensics point of view. Dye degradation through photo-oxidation processes may be used as proxy for this purpose by tracking ink dye composition along time. The first aim of this work was to develop a new chemometrics (PLSR) method for the age determination of ballpoint ink strokes on paper and compare it with a previous one (ULT) available in the literature. The two methods turned out to be complementary depending on specific ink formulations. The second aim of this study was to investigate dye degradation kinetics (especially that of Crystal Violet) using an artificial aging chamber. It has been shown that degradation kinetics is a function of the ink initial composition. A real case 14 year period natural degradation of documents has been modelled by means of the artificial aging kinetic constants and a first order reaction assumption.

Key words: Ballpoint ink; Dyes; Crystal violet; Chemometrics; ULT; PLSR; Artificial aging.

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

ANOVA: Análise de variância (do inglês *analysis of variance*)

ATF: Agency Bureau of Alcohol, Tobacco and Fire

B: Basic Blue 7

C: Cristal Violeta

CB: Cristal Violeta e Basic Blue 7

CE: Eletroforese capilar (do inglês *Capillary Electrophoresis*)

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

CV: Cristal Violeta e Victoria Blue B

DI: Ionização por dessorção (do inglês *Desorption Ionization*)

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

EI: Ionização eletrônica (do inglês *Electron Ionization*)

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

FAB: Bombardeamento rápido de átomos (do inglês *Fast Atom Bombardment*)

G: 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina

GC: 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Cristal Violeta

GRB: 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rhodamina e Basic Blue 7

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

INC/PF: Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal

IR: Infravermelho (do inglês, *InfraRed*)

LC: Cromatografia líquida (do inglês *Liquid Chromatography*)

LDI: espectrometria de massas assistida por dessorção/ionização a laser (do inglês, *Laser Desorption/Ionization*)

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

MCP: placas de micro canal (do inglês *Microchannel plate*)

MS: Espectrômetro de massas (do inglês, *Mass Spectrometry*)

PE: 2-Phenoxyethanol

PLSR: Regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês *Partial Least Squares Regression*)

R: Rhodamina

RMSECV: Raiz quadrada do erro quadrático médio da validação cruzada (do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation*)

RMSEP: Raiz quadrada do erro quadrático médio de predição (do inglês *Root Mean Squared Error of Prediction*)

SNV: Transformação para variável normal padrão (do inglês *Standard normal variate*)

TDC: Conversor analógico para digital (do inglês *time-to-digital conversor*)

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

TOF: Espectrometria de massas com analisador por tempo de voo (do inglês, *Time-of-flight*)

ULT: Do inglês *Unsupervised Linkage Threshold*

UnB: Universidade de Brasília

UV-Vis: Ultravioleta visível (do inglês *Ultra-Violet Visible*)

V: Victoria Blue B

Vis-NIR: Luz visível - infravermelho próximo (do inglês *Visible - Near InfraRed*)

VL: Variáveis Latentes

VSC: Comparadores videoespectrais (do inglês *Video Spectral Comparator*).

Sumário

Apresentação e Objetivos	3
1 Revisão Bibliográfica.....	7
1.1 Análise físico-química de tintas de caneta	7
1.2 Canetas esferográficas	8
1.3 A datação do lançamento da tinta de caneta em papel	10
1.4 A degradação do corante Cristal Violeta.....	16
2 Fundamentação Teórica	21
2.1 Espectrometria de Massas	21
2.1.1 Unidade de introdução da amostra	22
2.1.2 Fonte de ionização	22
2.1.3 Analisador de massas	25
2.1.4 Detector	28
2.1.5 Processador de sinais	29
2.2 Quimiometria	29
2.2.1 Método ULT para datação de manuscritos.....	30
2.2.2 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR)	33
3 Datação quimiométrica de documentos	39
3.1 Materiais e métodos	39
3.1.1 Amostras.....	39
3.1.2 Preparação das amostras.....	40
3.1.3 Análise dos dados	41
3.2 Resultados e discussão	42
3.2.1 Método quimiométrico - ULT	42
3.2.2 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR)	44
3.2.3 Comparação entre os métodos.....	51

3.3	Conclusão	52
4	Estudo da cinética de degradação artificial de corantes.....	57
4.1	Materiais e métodos	57
4.1.1	Obtenção das amostras	57
4.1.2	Preparo das amostras e obtenção dos dados	61
4.1.3	Análise dos dados	63
4.2	Resultados e discussão	65
4.2.1	Teste de homogeneidade	66
4.2.2	Cinética do envelhecimento artificial.....	67
4.2.3	Cinética da degradação natural.....	81
4.2.4	Estudo da variação da composição inicial da caneta esferográfica azul da marca Bic	84
4.2.5	Cinética artificial versus cinética natural de degradação	87
4.3	Conclusão	90
	Conclusões	95
	Referências Bibliográficas	99
	Apêndice 1	107
	Apêndice 2	109
	Apêndice 3	111
	Apêndice 4	113
	Apêndice 5	115

Índice de Tabelas

Tabela 1: Siglas e íons moleculares característicos dos corantes que foram estudados.	40
Tabela 2: Distribuição das formulações de corantes por década. Adaptado [34].....	40
Tabela 3: Síntese dos resultados obtidos no método ULT.....	42
Tabela 4: Número máximo de picos, número de variáveis latentes e os principais íons utilizados na modelagem do PLSR com centramento na média para cada formulação.....	44
Tabela 5: Resultados obtidos no método por PLSR com dados centrados na média.	45
Tabela 6: Número máximo de picos, número de variáveis latentes e os principais íons utilizados na modelagem do PLSR com normalização SNV e centramento na média para cada formulação.....	48
Tabela 7: Resultados obtidos no método por regressão PLSR – dados centrados na média e normalização SNV.....	49
Tabela 8: Comparação do percentil 95% das amostras entre os métodos quimiométricos testados.....	52
Tabela 9: Comparação da diferença máxima entre os métodos quimiométricos testados.....	52
Tabela 10: Canetas esferográficas selecionadas para estudo cinético da degradação dos corantes presentes na tinta.....	57
Tabela 11: Planejamento amostral para 24h de envelhecimento artificial.	59
Tabela 12: Planejamento amostral para 300h de envelhecimento artificial.	60
Tabela 13: Parâmetros do equipamento: cromatografia líquida e espectrometria de massa.....	62
Tabela 14: Valores de intensidades normalizadas para o corante C na tinta da caneta esferográfica da marca Cis após 12h de degradação artificial.	66
Tabela 15: Teste-F para cada pico após 12 horas de degradação artificial.....	67
Tabela 16: Valores do R^2 para os ajustes de curvas cinéticas considerando primeira e segunda ordem de reação.	76

Tabela 17: Valores das constantes cinéticas para reação de primeira ordem na degradação do corante Cristal Violeta.....	78
Tabela 18: Número, local de aquisição, lote e ano das amostras de caneta esferográfica da marca Bic.....	85
Tabela 19: Intensidades normalizadas do pico 372 obtidas para cada amostra de caneta esferográfica Bic.	86
Tabela 20: Constantes cinéticas para a degradação do corante Cristal Violeta obtidas experimentalmente em envelhecimento forçado por 300 horas.	87
Tabela 21: Valores dos parâmetros de relação entre a degradação artificial e natural. ..	88
Tabela 22: Constantes cinéticas para a degradação do corante Cristal Violeta obtidas para o envelhecimento natural	89
Tabela 23: Intensidades relativas dos íons do corante cristal Violeta para a degradação natural e intensidades relativas estimadas (formulação GC).	89

Índice de Figuras

Figura 1: Exemplos de estruturas dos corantes encontrados em tintas de caneta esferográfica. Adaptado [7].....	9
Figura 2: Estrutura molecular do corante Cristal violeta e da sua forma degradada Violeta de Metila 6B.....	17
Figura 3: Mecanismo de n-demetilação do Cristal Violeta (C) [3].	17
Figura 4: Diagrama dos componentes básicos de um espectrômetro de massas.....	22
Figura 5: Aplicabilidade das técnicas de ionização. Adaptado [31].....	23
Figura 6: Representação esquemática de uma fonte de ionização ESI. Adaptado [28]..	24
Figura 7: Esquema simples de um analisador de massas do tipo TOF. Adaptado [33]..	27
Figura 8: Esquema de um analisador TOF equipado com íons refletores [34].	27
Figura 9: Seção transversal de um MCP e elétron multiplicação dentro do micro canal [30].....	28
Figura 10: Representação ilustrativa da construção dos vetores para o método ULT a partir dos espectros de massa.	32
Figura 11: Síntese das etapas para o método ULT. Adaptado [36]	33
Figura 12: Organização dos dados em uma matriz a partir dos espectros de massas. (a) Espectro de massas que representará uma linha na matriz de dados representado em (b).	34
Figura 13: Esquema da fase de calibração para o modelo PLSR.	35
Figura 14: Esquema da fase de validação para modelo PLSR.	35
Figura 15: Procedimento experimental para análise de tintas de canetas em papel [34].	41
Figura 16: Histograma de amostras correlacionadas obtido no método ULT para a formulação GC [34].	43
Figura 17: Histograma de amostras correlacionadas obtido no método ULT para a formulação B [34].	43
Figura 18: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação GRB (PLSR – dados centrados na média).	46

Figura 19: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação GC (PLSR – dados centrados na média).....	46
Figura 20: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação CV (PLSR – dados centrados na média).....	46
Figura 21: Histograma obtido no método por PLSR – dados centrados na média para a formulação GRB.	47
Figura 22: Histograma obtido no método por PLSR – dados centrados na média para a formulação CV.....	47
Figura 23: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação GRB (PLSR – dados centrados na média e normalização SNV).....	49
Figura 24: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação CV (PLSR – dados centrados na média e normalização SNV).....	50
Figura 25: Histograma obtido no método por com SNV e dados centrados na média para a formulação a formulação GRB.....	50
Figura 26:Histograma obtido no método por PLSR com SNV e dados centrados na média para a formulação a formulação CV.	51
Figura 27: Exterior da caixa de envelhecimento [44].....	58
Figura 28: Interior da caixa de envelhecimento artificial forçado.....	58
Figura 29: Esquema das posições dos lançamentos de tinta para o teste de homogeneidade no interior da câmara de envelhecimento artificial.	61
Figura 30: Espectro de massas obtido para a tinta da caneta esferográfica da marca Cis.	65
Figura 31: Espectros do envelhecimento da caneta Bic a) no instante inicial e b) após 300 horas de envelhecimento artificial.....	68
Figura 32: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Bic Clássica. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.	69
Figura 33: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Cis. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.....	69

Figura 34: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Compactor. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.	70
Figura 35: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Acrilex. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.	70
Figura 36: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Bic Preta. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.	71
Figura 37: Comparação das intensidades do íon molecular característico (m/z 372) do Cristal Violeta em 5 canetas esferográficas diferentes por 24 horas.....	72
Figura 38: Degradação do corante Victoria Blue B (V) na caneta Acrilex. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.	72
Figura 39: Degradação do corante Victoria Blue B (V) na caneta Compactor. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.	73
Figura 40: Degradação do corante Victoria Blue B (V) na caneta Molin. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.....	73
Figura 41: Comparação das intensidades do íon molecular característico (m/z 470) do Victoria Blue B em 3 canetas esferográficas por 24 horas.	74
Figura 42: Degradação do corante Basic Blue 7 (B) na caneta Pilot. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.....	75
Figura 43: Gráficos de $\ln[A]$ e $1/[A]$ vs o tempo para todas as canetas estudadas.....	77
Figura 44: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Acrilex.....	78
Figura 45: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Bic Preta.	79
Figura 46: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Cis.....	79

Figura 47: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Compactor.	79
Figura 48: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Bic.	80
Figura 49: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Bic Cristal.	80
Figura 50: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Molin.	80
Figura 51: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Pilot.	81
Figura 52: Degradação do corante Cristal Violeta (C) de lançamentos de tinta de caneta contendo apenas o corante Cristal Violeta (C) em sua formulação.	82
Figura 53: Degradação do corante Cristal Violeta (C) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Victoria Blue B (CV) em sua formulação.	82
Figura 54: Degradação do corante Cristal Violeta (C) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Basic Blue 7 (CB) em sua formulação.	83
Figura 55: Degradação do corante Cristal Violeta (C) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Guanidina (GC) em sua formulação.	83
Figura 56: Degradação do corante Victoria Blue B (V) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Victoria Blue B (CV) em sua formulação.	83
Figura 57: Degradação do corante Basic Blue 7 (B) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Basic Blue 7 (CB) em sua formulação.	84
Figura 58: Valores de intensidades normalizadas do íon molecular m/z 372 do corante Cristal Violeta em duplicata. Barras de erro representam o desvio padrão com 1 grau de liberdade entre essas medidas.	87

Apresentação e Objetivos

Apresentação e Objetivos

A datação de documentos tem relevância como exame pericial, pois pode contribuir de forma decisiva para a investigação policial e a elucidação de crimes que envolvem documentos. Porém, por depender de variáveis não conhecidas *a priori* em documentos envolvidos em inquéritos policiais (ex: composição inicial da tinta de caneta, condições de armazenamento do documento, etc.) e envolver diferentes fenômenos físico-químicos (ex: secagem de solventes, degradação de corantes e pigmentos, endurecimento de resinas etc.), faz-se necessário o desenvolvimento e a aplicação de técnicas analíticas e métodos estatísticos capazes de propor soluções práticas e aplicáveis aos casos forenses.

Essa dissertação de mestrado tem dois objetivos principais. O primeiro objetivo é aplicar um método por calibração multivariada empregando regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) à datação de documentos e compará-lo com um método quimiométrico já existente (ULT) que utiliza a função cosseno quadrado para correlacionar a degradação da tinta da caneta lançada no papel com o ano do seu lançamento. O segundo objetivo é estudar a degradação artificial sob condições controladas dos corantes comumente encontrados em formulações comerciais, com o emprego de uma câmara de degradação por radiação na faixa do VIS-NIR e da técnica analítica LC-MS/TOF, com o intuito de tentar simular e entender melhor o processo natural de envelhecimento em condições reais de armazenamento.

O presente trabalho foi dividido em seções: revisão bibliográfica, fundamentação teórica, duas aplicações práticas e as conclusões. A ‘Revisão bibliográfica’ apresenta uma revisão de diversos artigos encontrados na literatura sobre o que é documentoscopia, canetas esferográficas, o corante Cristal Violeta e o que já se conhece sobre degradação e datação de lançamentos de tinta de caneta em papel.

A seção de ‘Fundamentação teórica’ apresenta um embasamento sobre os equipamentos (espectrômetro de massas e seus principais componentes) e as ferramentas quimiométricas que serão utilizados.

Na sequência é apresentada a primeira aplicação na seção ‘Datação quimiométrica de documentos’. Nessa seção é mostrado como foram obtidos os dados experimentais e comparam-se os resultados de dois modelos quimiométricos diferentes utilizando os mesmos dados, sendo um método baseado na função cosseno quadrado (ULT) e outro na regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR).

A segunda aplicação encontra-se na seção intitulada 'Estudo da cinética de degradação artificial de corantes' e apresenta a parte experimental e os resultados da cinética de degradação que foram obtidos através do envelhecimento artificial de lançamentos de tinta de caneta esferográfica em papel diferentes corantes, com ênfase no corante Cristal Violeta, provenientes de lançamentos de tinta de caneta esferográfica em papel.

Revisão Bibliográfica

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Análise físico-química de tintas de caneta

O exame pericial de documentos, também conhecido como Documentoscopia, é empregado para verificar a autenticidade, avaliar possíveis falsificações e indicar a provável autoria de documentos questionados [1]. Essas questões, as quais são de extrema relevância em nível judicial, são tradicionalmente abordadas por técnicas não destrutivas ou minimamente invasivas de exame documentoscópico envolvendo análise da escrita (grafoscopia), busca de inconsistências nas informações (anacronismos), ampliação ótica e imageamento do documento sob diferentes radiações eletromagnéticas (infravermelho, visível e ultravioleta). Esses procedimentos são normalmente conduzidos com o auxílio de lupas, microscópios óticos ou comparadores videoespectrais (VSC, do inglês *Video Spectral Comparator*).

A medida que as adulterações e falsificações tornaram-se mais elaboradas, a investigação policial passou a demandar respostas a questões mais desafiadoras do ponto de vista técnico-científico. Essas questões, usualmente formuladas à Perícia sob a forma de quesitos, podem envolver a comparação de tintas (de canetas, impressoras etc.), a ordem de sobreposição (cruzamento) de traços e/ou impressões e a datação de lançamentos manuscritos em documentos questionados [2]. A fim de atender essas novas demandas, a análise físico-química de colorantes (corantes e pigmentos) e solventes em tintas tem se tornado cada vez mais importante no apoio à elucidação de crimes que deixam documentos como vestígios.

Apesar da rápida evolução da tecnologia digital, documentos em papel ainda são uma importante fonte de informação [3]. Assim, a análise de tintas de caneta continua sendo relevante em aspectos forenses mesmo que a tendência atual seja os meios eletrônicos de comunicação [4].

Em um estudo sobre as publicações já realizadas, observa-se que, 60% das publicações nos últimos 17 anos foram focadas em tinta de caneta, enquanto 40% englobam impressoras, papel, entre outros. Dessas publicações sobre tinta de caneta, 60% são referentes a canetas esferográficas [5]. Dentre as técnicas analíticas empregadas, destacam-se a espectroscopia, como por exemplo IR (do inglês *Infra-Red*), Raman e UV-Vis (do inglês *Ultra-Violet Visible*) e a espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) [4, 5]. Frequentemente, os métodos analíticos aplicados na documentoscopia requerem que a tinta da caneta seja extraída do papel utilizando solventes orgânicos [1].

Do ponto de vista prático, existem dois problemas comumente encontrados na análise química de um lançamento de tinta de caneta em um documento questionado. O primeiro consiste em determinar a composição de colorantes e/ou voláteis com a finalidade de caracterizar, identificar e/ou comparar diferentes tintas de canetas. O segundo objetiva determinar a idade de um lançamento de tinta, por intermédio da degradação de corantes ou da evaporação de solventes. Apesar da utilidade de determinar a idade de um documento, a maioria dos estudos buscam métodos de identificar os componentes de diferentes tintas de canetas para posteriormente compará-las [5], isto é, ambos acabam sendo abordados de forma integrada, já que é preciso estudar as características da degradação dos componentes da tinta da caneta em diferentes condições pode trazer informações para identificar e datar a tinta de documentos questionados.

Por muitos anos, a técnica mais comumente empregada para a discriminação e caracterização das tintas de caneta esferográfica foi a TLC (do inglês *Thin Layer Chromatography*). Outras técnicas também são empregadas, como cromatografia gasosa, eletroforese capilar e cromatografia líquida [6], muitas vezes acoplados a um espectrômetro de massas [1]. Essas técnicas analíticas hifenadas de alto poder de identificação e discriminação envolvem técnicas destrutivas de preparação de amostras, pois requerem a solubilização ou dessorção dos analitos com técnicas de ionização/injeção apropriadas [6, 7, 8, 9].

1.2 Canetas esferográficas

Existem diversos tipos de canetas presentes no mercado, como por exemplo as canetas esferográficas, rollerball, canetas gel etc. O tipo de caneta que será estudado nessa dissertação é a esferográfica, que é o instrumento escritor mais comumente utilizado atualmente [10]. As tintas usadas nessas canetas são constituídas basicamente por solventes (água, óleo ou glicol), pigmentos, corantes, resinas e aditivos (estabilizantes, lubrificantes, surfactantes, etc.). Essa mistura de componentes forma um complexo homogêneo responsável pela cor, a densidade e a fluidez da tinta [4, 5]. Se, por um lado, a diversidade de composição química existente na formulação das tintas comerciais de caneta pode dificultar um estudo padronizado da degradação dos corantes, por outro lado, pode facilitar a tarefa de diferenciação entre lançamentos gráficos [4].

Em caneta esferográfica, os solventes podem constituir aproximadamente 50% da composição da tinta, as resinas 25% e os corantes e pigmentos completam os 25% restantes [10]. Aditivos diversos, como estabilizantes, compõem os componentes minoritários com menos de 1% da formulação.

Os compostos químicos responsáveis pela cor em uma tinta são denominados colorantes. Esses compostos contêm grupos funcionais cromóforos capazes de absorver e transmitir determinadas faixas de comprimento de onda do espectro da luz visível. Os colorantes são classificados em corantes e pigmentos, de acordo com a solubilidade que possuam no veículo (solvente) empregado. Os corantes são solúveis ao passo que os pigmentos são insolúveis e normalmente presentes sob a forma de suspensão. As tintas de caneta podem conter apenas corantes, apenas pigmentos, ou conter uma mistura de ambos [11].

Os solventes utilizados podem envolver água, óleos ou solventes à base de glicol. Dentre aqueles mais comumente utilizados nas tintas de caneta esferográfica podem ser citados: fenoxietanol (2-fenoxietanol), 2-(2-fenoxietoxi)etanol, dipropilenoglicol, ácido oleico, álcool benzílico, 1,3 butilenoglicol [12].

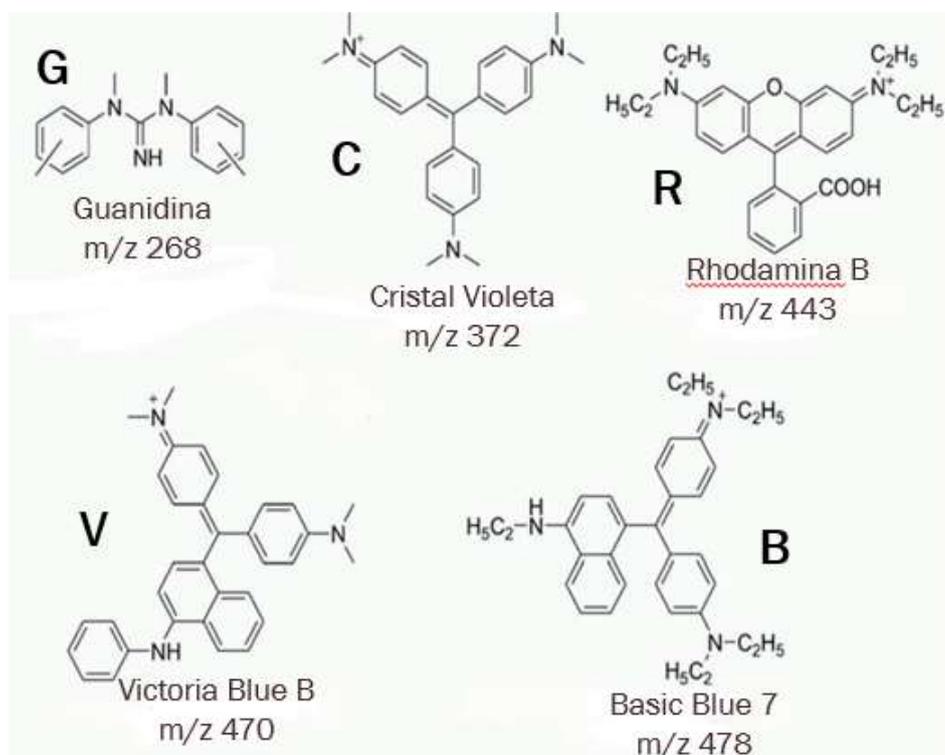


Figura 1: Exemplos de estruturas dos corantes encontrados em tintas de caneta esferográfica. Adaptado [7]

As resinas podem ser tanto naturais como sintéticas. Possuem alto peso molecular, são líquidas e, no envelhecimento de uma tinta, endurecem lentamente. Em seu estudo Ezcurra

et al. [12] registraram alguns tipos de resina como: alquídicas, poliéster, resinas extraídas de plantas (ex: breu, colofônia), fenólicas etc.

Os corantes mais comumente encontrados em tintas de canetas esferográficas são 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina (Guanidina - G), Basic Violet 3 (Cristal Violeta - C), Basic Violet 10 (Rhodamina B - R), Basic Blue 26 (Victoria Blue B - V) e Basic Blue 7 (B) [7]. Esses corantes têm as suas estruturas apresentadas na

Figura 1.

1.3 A datação do lançamento da tinta de caneta em papel

A partir do momento em que a tinta da caneta é lançada no papel, essa tinta começa a sofrer diversos processos [9] como por exemplo volatilização e difusão dos solventes, degradação dos corantes (a cor começa a desbotar), polimerização das resinas (fixação da tinta no papel), etc. [4, 13, 11]. A avaliação do grau de evolução desses processos é utilizada na tentativa de datar os lançamentos gráficos. Dentre os processos que foram citados, a degradação dos corantes é o que ocorre de forma mais lenta [3] e será o foco deste trabalho.

Em geral, o estudo da datação de tintas de caneta apresenta dificuldades intrínsecas associadas a fatores ambientais não conhecidos em situações reais tais como temperatura, umidade, exposição à luz e ao ar [11]. Assim, lançamentos da mesma caneta e feitos numa mesma data podem exibir resultados diferentes dependendo das condições em que os documentos foram armazenados [4]. Além disso existem diversas marcas diferentes de canetas esferográficas no mercado, com composições iniciais diferentes e, a princípio, desconhecidas. Devido a essas dificuldades, a única maneira considerada confiável de datar documentos tem sido comparar dois lançamentos de tinta originados da mesma caneta esferográfica, no mesmo papel e armazenado sob as mesmas condições [11]. Contudo, na prática, o preenchimento desses requisitos quase nunca é atingido, de tal modo que a datação de documentos resulta em um dos problemas mais difíceis e desafiadores a ser abordado na área de perícias forenses [12].

Dentre os métodos de datação existentes, há aqueles que dependem da quantidade de massa de tinta extraída (extensivos) e aqueles que independem dessa informação (intensivos ou “*mass independent*”). No primeiro caso, faz-se imperativo extrair sempre a mesma quantidade de tinta de caneta do papel [10], fato esse que dificulta a obtenção dos níveis de precisão requeridos em exames periciais. Métodos intensivos são preferíveis, por permitirem uma comparação mais reprodutível entre as amostras. Esse é o caso do método analítico empregado

neste trabalho (ver seções 3.1.3 e 4.1.3), que emprega a normalização de áreas por família de corantes.

Uma outra forma de classificar os métodos de datação é quanto à referência de tempo utilizada. Nesse aspecto, existem dois tipos de métodos: o relativo e o absoluto. Métodos relativos baseiam-se na comparação dos perfis de composição química entre lançamentos gráficos contendo os mesmos corantes e sujeitos às mesmas condições de armazenamento, a fim de determinar qual deles seria o mais antigo. Nos métodos absolutos, o objetivo é estabelecer a data de produção de um documento ou do lançamento de manuscritos, baseando-se em referências absolutas. Essas referências podem ser desde as informações constantes do documento até marcadores químicos ou a utilização de curvas de envelhecimento em função do tempo com o auxílio de padrões de tinta de caneta adequados [10, 14, 15]. Os métodos quimiométrico (seção 3) e cinético (seção 4) desenvolvidos no presente trabalho podem ser classificados como absolutos.

Até o ano de 1968, os procedimentos para a datação de manuscritos de tinta de caneta envolviam o conhecimento das datas em que novas canetas eram introduzidas no mercado consumidor ou em que grandes mudanças na composição das tintas eram feitas pelas indústrias [16]. A partir daquele ano, protocolos de datação passaram a comparar a composição de uma tinta desconhecida frente a uma biblioteca de padrões de tintas de caneta fornecidos pelos fabricantes e mantida pela agência ATF (Bureau of Alcohol, Tobacco and Fire).

Em 1969, a ATF, em parceria com a indústria, adotou um método direto de datação baseado na adição de marcadores químicos (ex: terras raras ou composto fluorescentes) à composição das tintas de caneta [2, 17]. Essa estratégia acabou não prosperando e foi descontinuada no ano de 1991 [2]. Dentre os motivos para o abandono do projeto, podem ser citados os altos custos envolvidos e a falta de consenso quanto à formulação dos marcadores químicos a serem utilizados [17], além da amplificação do mercado de fornecedores (ex: China) que não atendiam à regulamentação.

A degradação de tintas de caneta esferográfica pode ocorrer tanto de forma natural como induzida artificialmente [4, 5]. No processo natural, o documento manuscrito é armazenado em condições habituais tais como sobre uma bancada, exposto à luz, ou em gavetas e arquivos. A principal motivação ao estudo do envelhecimento artificial é a analogia de que, nesse processo acelerado, ocorreriam as mesmas mudanças químicas que no envelhecimento natural, porém em uma escala de tempo muito mais reduzida [18]. Estudos de envelhecimento

acelerado podem auxiliar no entendimento do envelhecimento natural de tintas bem como melhorar a estimativa da idade de lançamentos manuscritos no papel [19] e são rotineiramente utilizados por laboratórios nos Estados Unidos e na Europa [18]. Embora ainda não totalmente elucidada [5], a cinética de degradação acelerada pode ser estudada sob o efeito de temperaturas elevadas e exposição à radiação eletromagnética [11].

Estudos prévios indicam que a tinta, ainda dentro da caneta, envelhece com o tempo, e que esse envelhecimento dependeria da formulação [18]. Contudo, a degradação da tinta dentro do cartucho é muito lenta, e frequentemente pode ser considerada inexistente [2]. Ainda assim, ao datar a tinta de caneta de um documento questionado, é interessante estar ciente de que os corantes da tinta podem ter sofrido alguma degradação antes mesmo do lançamento no papel.

A primeira menção na literatura a um estudo empregando processo de envelhecimento forçado foi resultado de um questionamento levantado pela corte judicial, nos Estados Unidos, sobre a possibilidade de documentos estarem sendo envelhecidos artificialmente, com o propósito de parecerem mais antigos do que são na realidade [11].

A maioria das tintas degradam em diferentes velocidades, e essa degradação é fortemente dependente da sua composição inicial [10]. Esse é um fator complicador adicional à datação de tintas por algumas razões. Uma delas tem a ver com a diferença de teores iniciais de corantes apresentada por lotes e marcas de canetas diferentes [7]. Outra dificuldade relaciona-se à não disponibilidade ou ao sigilo de informações por parte dos fabricantes quanto à formulação detalhada da composição inicial de uma tinta [4, 11]. A presença, por exemplo, de aditivos estabilizadores de cor pode afetar na velocidade de degradação dos corantes.

A evolução do envelhecimento de uma tinta de caneta pode ser monitorada de três maneiras [12]: (1) pela degradação dos corantes e pigmentos, (2) pela taxa de evaporação dos solventes e (3) pelo endurecimento ou polimerização das resinas. Estudos referentes a modificações físico-químicas de resinas resultantes do envelhecimento de tintas de caneta são praticamente inexistentes na literatura científica, requerendo o emprego de técnicas analíticas específicas para polímeros de alto peso molecular [10]. Esse assunto, que representa uma oportunidade de pesquisas futuras, não será abordado nesta revisão bibliográfica, cujo foco será a degradação de corantes e a volatilização de solventes.

Os corantes são moléculas orgânicas, cuja absorção de fótons produz um estado molecular excitado que leva à degradação [3] [11]. Reações fotoquímicas são influenciadas por

diversos fatores, como concentração dos reagentes, temperatura, comprimento de onda da luz incidida [11]. Esses fatores influenciadores, e previamente desconhecidos, podem ser o motivo para que existam tantos dados conflitantes no que se refere à datação de lançamentos de tintas de caneta em documentos reais [9]. O processo de degradação natural dos corantes ocorre em escala de décadas [3].

Analisando o espectro de massas dos corantes de tinta de caneta, pode-se observar uma diminuição de abundância do íon molecular característico e o aparecimento e/ou aumento de picos de massa mais baixa, indicando produtos de degradação. Se um corante for muito estável, talvez não ocorram mudanças no respectivo espectro de massas com o decorrer do tempo.

Em 2002, Andrasko [8] analisou a degradação de corantes de caneta esferográfica em documentos não expostos à luz, como livros e diários. Foi utilizado HPLC para a análise dos corantes em função do tempo. O estudo mostrou diferenças nos cromatogramas obtidos para lançamentos de tinta fresca em comparação com aqueles de lançamentos com 9 e 22 meses de idade. A proporção de áreas cromatográficas entre o Cristal Violeta e o Metil Violeta mostrou-se mais elevada no caso da tinta fresca.

No ano de 2006, Weyermann et al. [9] estudaram o processo de degradação de dois corantes presentes em tintas de caneta: o metil violeta e o etil violeta. Utilizaram LDI-MS e MALDI-MS/TOF como técnicas analíticas e estudaram a dependência desse processo com as condições de armazenamento e ambientais. A vantagem da técnica LDI-MS é a mínima preparação de amostra requerida. Em adição ao estudo da degradação natural, foram feitos envelhecimentos artificiais de até 336 horas com a incidência de lâmpada de xenônio e aquecimento de até 100° C. Os autores concluíram que as condições de armazenamento do documento questionado e a composição inicial da tinta da caneta analisada têm que ser conhecidos para uma interpretação correta da idade do lançamento de tinta de caneta no papel.

Grim et al. [19], em 2001, estudaram a degradação de tintas de caneta esferográfica e tintas de impressoras. Foi feito um envelhecimento artificial da tinta da caneta usando lâmpada de luz ultravioleta (faixa de comprimento de onda: 254nm a 760nm) e análises foram feitas com intervalos de 12 horas num total de 24 horas. A técnica analítica empregada foi LDI-MS/TOF. O estudo confirmou a formação de produtos de degradação do corante Violeta de Metila 2B após irradiação UV.

Em 2005, Siegel et al. [18] estudaram a datação de tintas de caneta esferográficas e o envelhecimento artificial das mesmas por LDI-MS. O envelhecimento artificial foi feito usando luz ultravioleta por 24 horas. Os resultados demonstraram sucessivas perdas de grupamentos metila do corante Cristal Violeta em função do tempo.

Weynermann et al. [11], em 2008, estudaram o envelhecimento forçado de tintas de caneta, empregando uma lâmpada de alta pressão de xenônio (irradiação na faixa de 250nm até 1000nm). As amostras foram posicionadas de forma padronizada há uma distância de 17cm da fonte de luz. O envelhecimento artificial teve duração de 50h e observou-se pouca degradação da tinta de caneta. A análise química da degradação dos corantes foi feita usando LDI-MS/TOF. Concluíram que os fenômenos envolvidos na degradação de corantes são mais complexos que aqueles referentes à evaporação dos solventes nas tintas de caneta e que ambos processos possuem em comum a questão da dependência das condições de armazenamento. Foi concluído que qualquer modelo de comparação entre envelhecimento artificial e natural necessita levar em conta as condições a que os documentos foram submetidos.

Em 2010, Lalli et al. [7] utilizaram EASI-MS para monitorar a degradação de corantes de tinta de caneta esferográfica envelhecidas artificialmente. Por utilizar um método de dessorção por spray *in situ*, diretamente na superfície do documento, o método utilizado dispensa a preparação de amostras, sendo minimamente destrutivo e preservando a integridade do documento questionado. O envelhecimento foi realizado usando lâmpada incandescente de 60W por até 19 horas. Esses pesquisadores partem da premissa que escritas em um documento devem apresentar perfis de degradações iguais, se forem produzidos com a mesma marca de caneta e no mesmo momento. Foi obtida experimentalmente uma curva para a degradação artificial do corante Cristal Violeta com o passar do tempo.

Além da degradação de corantes, a determinação da concentração de solventes residuais remanescentes da secagem de tintas de caneta representa outro objeto importante de pesquisas na datação de documentos questionados. Conforme citado anteriormente, os solventes podem representar aproximadamente 50% do peso da tinta da caneta, e evaporam com o tempo [20]. Em alguns estudos [21], a curva de evaporação do componente volátil com o tempo é obtida com referência a outro componente estável na formulação da tinta. Isso implica em resultados independentes da quantidade de tinta nas amostras analisadas. O processo de secagem de uma tinta de caneta, após o lançamento da mesma no papel, é um fenômeno muito complexo e sensível às condições ambientais e de armazenamento que se

caracteriza pela evaporação simultânea dos solventes e a adsorção/difusão dos mesmos no papel. Essas condições precisam ser consideradas para uma interpretação confiável dos resultados [20].

Do ponto de vista de datação de documentos, uma diferença importante entre os processos de degradação de corantes e a evaporação de solventes é a escala de tempo envolvida. Ao contrário dos corantes, que levam muito tempo (anos) para degradar, os solventes evaporam rapidamente após o lançamento da tinta da caneta no papel, exibindo uma curva de decaimento do tipo exponencial. Dependendo das condições de armazenamento, os solventes continuam evaporando a taxas observáveis por um período que pode variar entre alguns dias até 18 meses, após o qual ocorre uma estabilização de sua concentração com o passar do tempo [22].

Em 2004, LaPorte et al. [14] analisaram 633 tintas de canetas esferográficas usando GC-MS para determinar a ocorrência do solvente 2-Phenoxyethanol (PE) nas composições das tintas. O PE foi identificado em mais de 80% das canetas analisadas indicando que esse é o solvente mais encontrado nesse tipo de canetas.

Em 2004, Loriciro et al. [23] utilizaram GC-MS para analisar a evaporação dos componentes voláteis de tinta de caneta esferográfica. O estudo teve como objetivo verificar a possibilidade de datar tintas de caneta por intermédio da curva de volatilização do PE em função do tempo. Foram analisados lançamentos de tinta de duas canetas esferográficas de coloração azul, de marcas e composições diferentes, por um período de até 200 dias. Segundo os autores, houve uma perda de 98% de solvente nos 2 primeiros minutos após o lançamento, e portanto, esse método não seria capaz de datar tinta de caneta no exame de documentos questionados reais.

Em 2006, Xu e et al. [26] estudaram a datação de canetas rollerball e gel, a partir da evaporação de solventes usando GC e UV-vis. A idade relativa foi obtida comparando a quantidade de solvente entre documentos questionados e documentos usados como padrões. Eles concluíram que os métodos foram precisos e confiáveis, salientando, porém, a necessidade de que as tintas comparadas estejam no mesmo papel e possuam a mesma formulação.

No ano de 2007, Weyermann et al. publicaram um estudo sobre a datação de tintas da caneta analisando a volatilização de solventes presentes na tinta [22]. A técnica analítica escolhida para a quantificação dos solventes foi GC-MS. Os autores mostraram que foi possível diferenciar tinta fresca (com até duas semanas após o lançamento no documento) de tintas mais

antigas, em condições de armazenamento controladas. Tintas com idade de lançamento superior a duas semanas não poderiam ser diferenciadas cronologicamente por esse método.

Este capítulo mostrou que, apesar de existirem alguns métodos desenvolvidos e testados, o envelhecimento da tinta de caneta ainda é um fenômeno que necessita ser estudado. Vários métodos de datação já foram propostos, porém ainda não existe um método considerado amplo e eficaz. Na literatura existem poucos estudos procurando prever o envelhecimento de lançamentos gráficos utilizando ferramentas quimiométricas [3]. Também permanece não resolvida a questão de como correlacionar os procedimentos rápidos de envelhecimento artificial com o processo natural de envelhecimento de manuscritos, sujeito a condições imprevisíveis de armazenagem e exposição ambiental. O presente trabalho visa avançar o conhecimento científico nessas duas áreas de pesquisa.

1.4 A degradação do corante Cristal Violeta

Corantes têm grande aplicabilidade no nosso dia-a-dia, e podem ser encontrados em indústrias de tecidos, impressões, cosméticos, alimentos, papéis, tintas, canetas esferográficas, fármacos, etc. [23]. Apesar das utilidades, muitos corantes são tóxicos na natureza [24], sendo que aproximadamente de 10% a 15% dos corantes produzidos são descartados em água residual da fabricação de produtos coloridos [25]. Por isso, o desenvolvimento de métodos que visem diminuir a poluição causada por corantes são encontrados na literatura especializada [24, 25, 26]. Esses métodos envolvem a degradação completa do corante, utilizando catalisadores.

O corante Cristal Violeta é solúvel em água, venenoso para animais e mutagênico [24, 26]. Devido à solubilidade desse corante em água e a sua toxicidade, ele é considerado poluente e precisa ser removido do descarte industrial.

A molécula do Cristal Violeta não é estável e a degradação pode ocorrer mesmo sem a presença de irradiação de luz, devido à oxidação pelo oxigênio atmosférico [3].

A reação de fotodegradação do corante Cristal Violeta (Figura 2a) começa quando ocorre absorção de luz tanto ultravioleta, quanto luz visível, que geram o desbotamento da cor [2]. A degradação desse corante, que possui a razão massa carga m/z 372, é caracterizada pela demetilação oxidativa progressiva, na qual ocorre a perda sucessiva de um grupamento metila ($-CH_3$), o qual é substituído por um átomo de hidrogênio (H), resultando numa diminuição

líquida de massa de 14 Da. Assim sendo, o primeiro produto de degradação é o Violeta de Metila 6B com m/z 358 (Figura 2b) e o segundo produto de degradação é a Violeta de Metila 2B com m/z 344 [25]. Esse processo de demetilação está representado da Figura 3. O Cristal Violeta possui, em sua estrutura inicial, 6 grupos metila ligados a nitrogênios da molécula e, sendo assim, pode formar até 6 produtos de demetilação

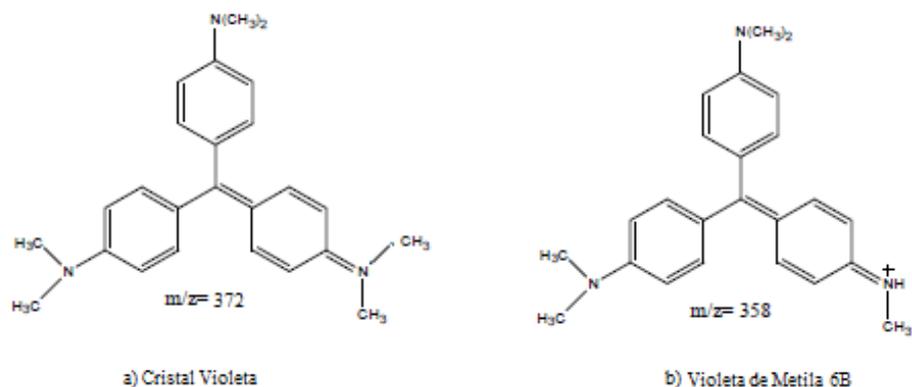


Figura 2: Estrutura molecular do corante Cristal violeta e da sua forma degradada Violeta de Metila 6B.

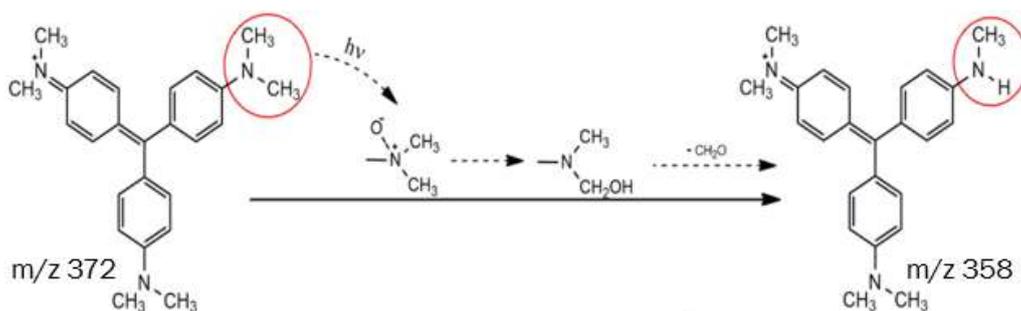


Figura 3: Mecanismo de n-demetilação do Cristal Violeta (C) [3].

Estudos indicam que a degradação do Cristal Violeta segue uma cinética aparente de primeira ordem e que os valores das constantes cinéticas variam em função das condições reacionais, como por exemplo exposição à luz e calor [24, 27].

Fundamentação teórica

2 Fundamentação Teórica

2.1 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas teve início em 1890, com os trabalhos de J. J. Thompson e W. Wien. Em 1906, Thompson ganhou prêmio Nobel por um trabalho relacionado à espectrometria, em que conseguiu determinar a razão massa/carga do elétron. Em 1911, Wien recebeu o Nobel por um estudo sobre deflexão magnética de raios anódicos, no qual determinou que esses eram carregados positivamente. O primeiro espectrômetro de massas foi construído por A. J. Dempster em 1918, porém, o uso desse equipamento apenas tornou-se comum há aproximadamente 60 anos, por motivos de custo e confiabilidade [28].

Essa técnica utiliza medidas da relação massa/carga de átomos ou moléculas ionizadas, permitindo a determinação da massa molecular e a quantificação de compostos químicos. A técnica também é extremamente útil para a identificação de estruturas químicas de substâncias que possuam padrões de fragmentação característicos resultantes dos processos de ionização a que necessitam ser submetidas.

A espectrometria de massas difere de outras formas de espectrometria orgânica existentes, como por exemplo infravermelho e ultravioleta, visto que a amostra não absorve a radiação eletromagnética. Além disso, trata-se de um método destrutivo em que ao menos parte da amostra não pode ser recuperada em sua forma original após a análise. Em contrapartida, a espectrometria de massas possui alta especificidade na identificação de compostos químicos (especialmente quando acoplada a uma técnica de separação), é muito sensível e requer uma quantidade pequena de amostra [29].

Características de desempenho dos espectrômetros de massas, como acurácia, resolução, sensibilidade, limites de detecção, rapidez e variedade de aplicações tornam esse tipo de equipamento muito importante dentre os métodos analíticos mais utilizados atualmente [30]. Sendo assim, torna-se relevante conhecer os princípios de funcionamento de um espectrômetro de massas.

Um espectrômetro de massas é constituído basicamente por cinco componentes: a unidade de introdução de amostras, a fonte de ionização, o analisador de massas, o detector e o processador de sinais [28], como mostrado na Figura 4.

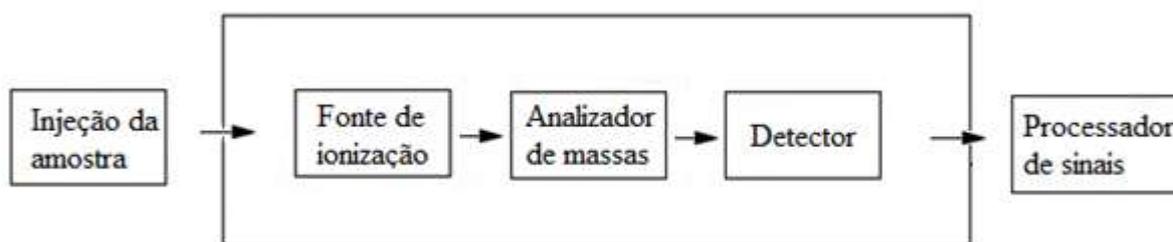


Figura 4: Diagrama dos componentes básicos de um espectrômetro de massas.

2.1.1 Unidade de introdução da amostra

Esta unidade tem a função de introduzir as amostras na fonte de ionização. As amostras, que usualmente estão sob pressão atmosférica, precisam ser submetidas a pressões menores, de acordo com a necessidade da fonte de ionização. Após a ionização, vácuo (da ordem de 10^{-3} a 10^{-6} torr) se faz necessário, afim de evitar a fragmentação dos íons recém-formados por colisão intermolecular e diminuir a corrosão da fonte, do analisador e do sistema de detecção por exposição ao ar e à umidade.

De modo geral, espectrômetros de massa são acoplados (hifenados) a equipamentos de separação, normalmente cromatógrafos gasosos ou líquidos. A justificativa para a utilização de um método de separação anterior à fonte de ionização é a presença simultânea de diferentes compostos no momento da ionização, o que poderia dificultar a identificação em misturas muito complexas [28, 29]. Dessa maneira, a cromatografia (líquida ou gasosa) é o meio mais usual de introdução da amostra no espectrômetro de massas. Mesmo em situações em que uma coluna cromatográfica não seja necessária, é muito comum optar-se pela utilização de toda a infraestrutura de injeção do cromatógrafo, visando automatizar e tornar mais reprodutível o método analítico como um todo.

2.1.2 Fonte de ionização

As moléculas do analito necessitam ser ionizadas, para que a análise e a detecção por espectrometria de massas sejam possíveis [29]. Cátions podem ser produzidos por mecanismos de impacto de elétrons (alta energia: 50-70eV), protonação, ionização dissociativa com ou sem rearranjos, ionização múltipla etc. Ânions, por sua vez, podem ser gerados por captura de

elétrons (baixa energia: $\sim 0,1\text{eV}$), desprotonação etc. Íons positivos ou negativos também podem ser gerados pela transferência de espécies carregadas da fase condensada para a fase gasosa [30]. A depender do pH escolhido para a fase móvel (HPLC), da polaridade utilizada na fonte de ionização, nas placas seletoras/focalizadoras de íons e nos detectores, um espectrômetro de massas pode operar em modo positivo (detecção de cátions) ou em modo negativo (detecção de ânions). Devido ao caráter básico e catiônico dos corantes estudados, a espectrometria de massas utilizada neste trabalho concentrou-se no modo positivo de ionização e detecção.

Existem várias técnicas de ionização como, por exemplo: impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), fotoionização à pressão atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photo Ionization*), dessorção/ionização assistida por spray (DESI, do inglês *Desorption ElectroSpray Ionization*), bombardeamento com átomos de alta energia (FAB, do inglês *Fast Atom Bombardment*), dessorção/ionização por laser (LDI, do inglês *Laser Desorption Ionization*), dessorção/ionização por laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *Matrix-Assisted LDI*), ionização por eletrospray (ESI, do inglês *ElectroSpray Ionization*) etc. [28, 29, 30]. As faixas de aplicabilidade de cada técnica dependem da estrutura do analito envolvido e podem ser esquematizadas conforme a Figura 5. Por sua ampla utilização, destacam-se a ionização por impacto de elétrons (EI), comumente associada a GC/MS, e a ionização por eletrospray (ESI), frequentemente escolhida para HPLC/MS. No presente trabalho, a fonte de ionização empregada foi do tipo ESI, que será descrita a seguir.

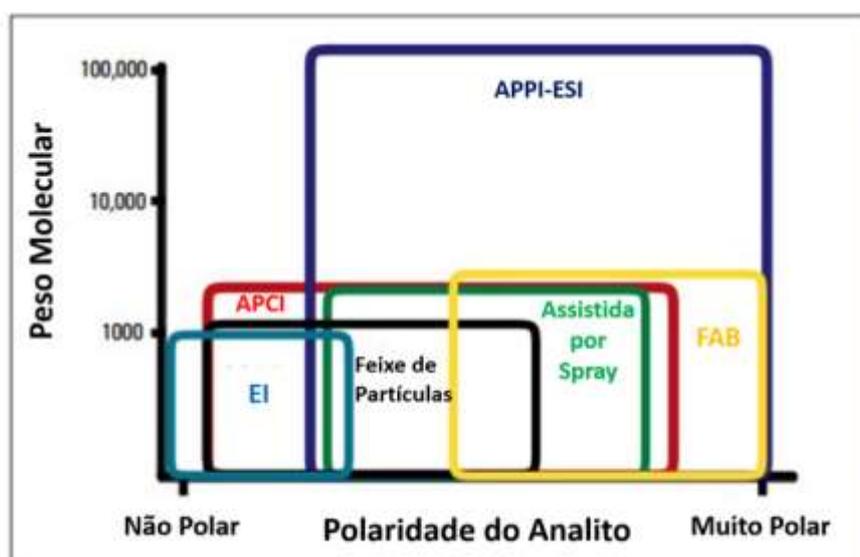


Figura 5: Aplicabilidade das técnicas de ionização. Adaptado [31]

Um grande número de compostos, devido à sua elevada massa molecular ou carga elétrica, não são voláteis nem termicamente estáveis. Este tipo de substância não pode ser vaporizado para a separação por GC nem para a utilização de fontes de ionização em fase gasosa. Esses compostos são mais facilmente separáveis por HPLC ou CE, que tiveram seu campo de aplicação ampliado com o desenvolvimento da ionização por eletrospray (ESI). Ela permite uma alta sensibilidade e é facilmente acoplada a HPLC [29, 30]. Na ESI, uma solução contendo a amostra é injetada em forma de spray, através de um capilar, em uma câmara aquecida e mantida à pressão aproximadamente atmosférica. O capilar é dotado de um alto potencial voltaico em sua superfície de tal forma que pequenas gotas carregadas eletricamente são expelidas na câmara de ionização. As gotas carregadas são submetidas a um contra fluxo de gás, normalmente o nitrogênio, para secar o solvente presente. Com a evaporação do solvente, a densidade de carga das gotas aumenta até o momento em que forças eletrostáticas repulsivas quebram a tensão superficial das gotas, rompendo-as em gotas ainda menores. Esse processo continua até que os íons da amostra sejam desorvidos na fase gasosa, sem a presença de solvente, para então serem transferidos ao analisador de massas [28, 30]. O processo de ionização por eletrospray encontra-se esquematizado na Figura 6.

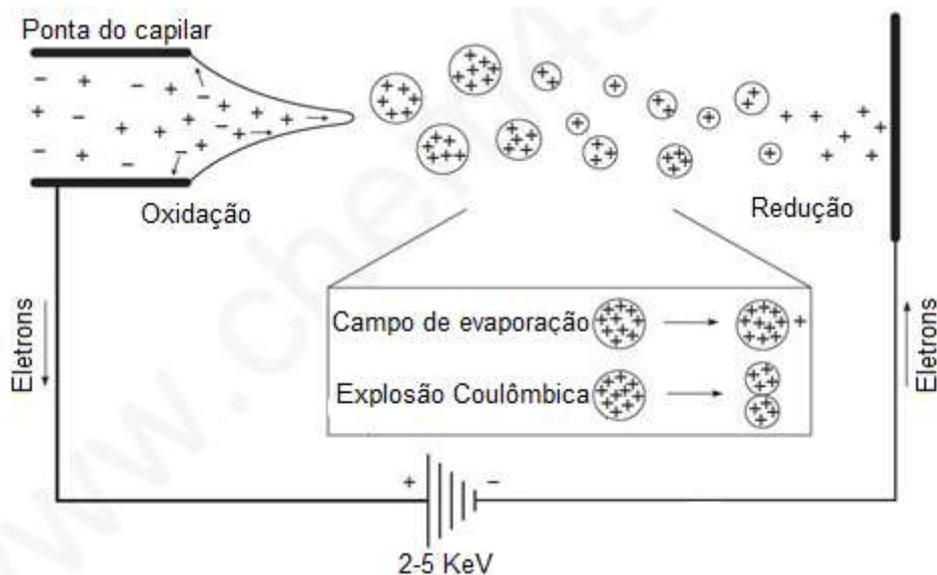


Figura 6: Representação esquemática de uma fonte de ionização ESI. Adaptado [28].

A carga dos íons gerados pela fonte ESI pode não corresponder à carga original das moléculas da amostra em solução. A carga, normalmente em forma de prótons, transferida para

as moléculas da amostra resulta de um balanço entre a concentração de carga nas gotas durante a evaporação do aerossol e o processo eletroquímico resultante do potencial eletrostático aplicado ao capilar [28].

2.1.3 Analisador de massas

Após a passagem pela fonte de ionização, os íons da amostra precisam ser separados no analisador de massas de acordo com sua relação massa/carga (m/z) [28, 29, 30].

Toda partícula (ex: átomos, moléculas) eletricamente carregada, quando em movimento em uma região do espaço submetida a um campo magnético (\mathbf{B}), é submetida a uma força (\mathbf{F}), denominada força de Lorentz, calculada pela seguinte equação.

$$\mathbf{F} = z(\mathbf{E} + \mathbf{v} \times \mathbf{B}) \quad (1)$$

Onde: z = carga elétrica da partícula; \mathbf{v} = velocidade da partícula; \mathbf{E} = campo elétrico.

Essa mesma força atuando sobre a partícula carregada deve se igualar à força associada à lei de Newton do movimento, conforme a equação a seguir.

$$\mathbf{F} = m \mathbf{a} \quad (2)$$

Onde: m = massa da partícula; \mathbf{a} = aceleração da partícula.

A igualdade entre as duas equações anteriores resulta em:

$$\left(\frac{m}{z}\right) \mathbf{a} = \mathbf{E} + \mathbf{v} \times \mathbf{B} \quad (3)$$

A equação (3) evidencia as principais variáveis envolvidas em um analisador de massas: a relação massa/carga (m/z) é a variável medida e o movimento da partícula (\mathbf{a}) é estabelecido pelos campos elétricos (\mathbf{E}) e magnéticos (\mathbf{B}) envolvidos, sendo a forma de estabelecer esses campos a principal diferença entre os equipamentos comerciais.

Existem diferentes tipos de analisadores de massas, dentre os quais merecem destaque o setor magnético, o quadrupolo, analisador por tempo de voo (TOF), armadilha de íons (*ion traps*) e analisador baseado em ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR, do inglês *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*). Os analisadores de massa também podem ser hifenados com a finalidade de aumentar a versatilidade a permitir a execução de múltiplos experimentos (MS^n) [30].

A performance de um analisador de massas pode ser medida de cinco maneiras: limite de alcance de massa (*mass range*), rapidez da análise, transmissão, acurácia (*mass accuracy*) e resolução. O alcance de massa determina o limite da razão m/z que pode ser medido. A rapidez de análise está relacionada à taxa de contagem de íons com a qual o analisador de massas consegue fazer as medições. A transmissão é a razão do número de íons que alcançam o detector pelo número de íons que entraram no analisador de massas. A acurácia é medida pela diferença observada entre a razão m/z teórica e aquela observada experimentalmente. Por último, a resolução (R) é a capacidade que analisador de massas possui em distinguir os sinais de diferentes íons que possuam pequena diferença na razão massa carga: $\Delta(m/z)$ [30].

$$R = \frac{(m/z)}{\Delta(m/z)} \quad (4)$$

O equipamento utilizado neste trabalho possui o analisador de massas TOF (do inglês *time-of-flight*). O TOF é baseado no princípio de que a velocidade de dois íons criados no mesmo instante e com a mesma energia cinética irá depender apenas de suas relações massa/carga [28, 29, 32]. Um balanço de energia na molécula ionizada permite escrever as seguintes relações:

$$zV = \frac{mv^2}{2} \quad (5)$$

$$v = \frac{L}{t} \quad (6)$$

Onde z é a carga, V o potencial elétrico, m a massa, v a velocidade, L a distância e t o tempo. Substituindo (2) em (1) e rearranjando a equação chegamos ao valor do tempo de voo como função da razão massa carga (m/z) e do percurso (L):

$$t = L \sqrt{\frac{m/z}{2V}} \quad (7)$$

A equação anterior demonstra que, quanto maior a relação massa/carga de um íon, mais tempo ele levará para percorrer o comprimento (L) do analisador de massas. Dessa maneira, o tempo de voo está diretamente relacionado à relação m/z , possibilitando a separação de íons em uma mistura. Esse princípio encontra-se ilustrado na Figura 7.

Em um analisador do tipo TOF, os íons são lançados em pulsos curtos e bem definidos, a fim de que sua energia inicial em direção ao detector seja o mais uniforme possível.

O analisador TOF apresenta como características principais sua alta resolução, acurácia e amplo alcance de massas.

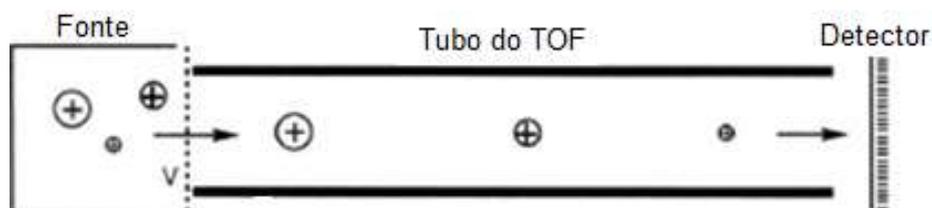


Figura 7: Esquema simples de um analisador de massas do tipo TOF. Adaptado [33].

A diferença de tempos de voo (Δt) existente entre dois íons, pode ser calculada a partir da equação (8) como sendo:

$$\Delta t = \frac{L}{\sqrt{2V}} \Delta(\sqrt{m/z}) \quad (8)$$

Quanto maior a diferença de tempos de voo existente entre íons de relação massa/carga similares, tanto maior a capacidade do analisador em distingui-los, ou seja, tanto maior a sua resolução e a sua acurácia. Dessa forma, a equação (4) demonstra que uma maneira de aumentar a resolução e a acurácia em um TOF é aumentar o seu percurso de voo, por isso, é comum encontrar analisadores possuindo entre 1 a 2 metros de comprimento. Um benefício adicional de um maior trajeto do tubo de voo é o aumento do alcance de massas (*mass range*), visto que íons com relação massa/carga mais elevadas (maiores tempos de voo) poderão ser analisados [28, 30].

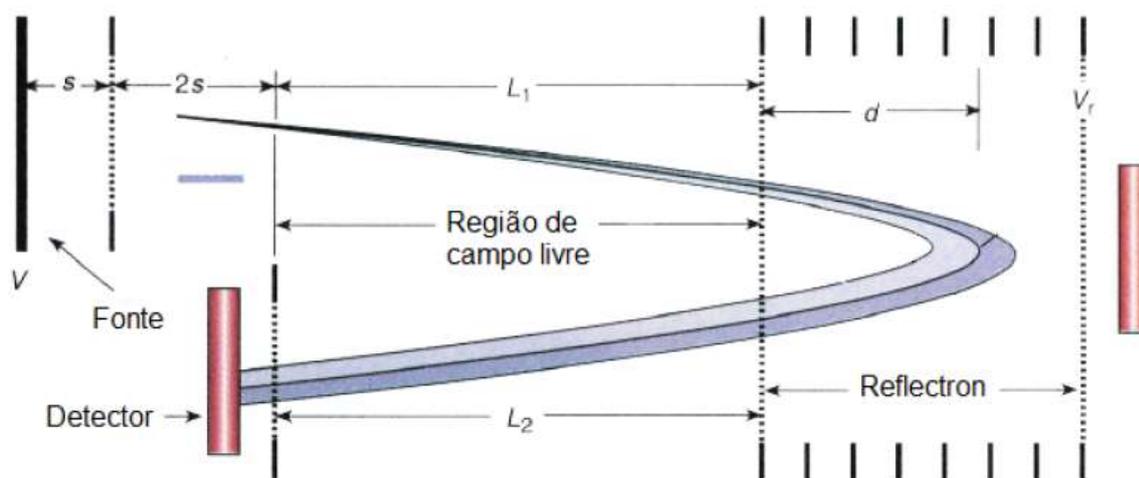


Figura 8: Esquema de um analisador TOF equipado com íons refletores [34].

Para aumentar o tempo do voo, e conseqüentemente melhorar as características de desempenho mencionadas, o TOF pode ser modificado com o uso de refletores eletrostáticos, chamados refletores de íons ou também *reflectrons*, que são utilizados para gerar um campo elétrico repulsivo em seu trajeto [28, 30]. Os refletores de íons são compostos de uma série de grades e eletrodos nos quais é promovido um aumento progressivo do potencial repulsivo. Ao entrarem no tubo de voo, os íons são desacelerados por esse campo elétrico, mudam a direção de movimento e retornam ao tubo no sentido contrário, como ilustrado na Figura 8. Isso permite dobrar o percurso de voo original [28].

2.1.4 Detector

Após a passagem pelo analisador de massas, o fluxo de íons é convertido pelo detector em sinais de corrente elétrica de maneira proporcional a sua abundância. Existem diferentes tipos de detectores e a escolha depende do instrumento e das aplicações desejadas. Alguns detectores, chamados de *Faraday cup*, são baseados na medida direta da carga produzida quando os íons se encontram com a superfície do detector. Outros detectores, como por exemplo eletromultiplicadoras ou fotomultiplicadoras, são baseados na energia cinética transferida pelos íons na colisão com a superfície do detector [30].

Atualmente detectores do tipo eletromultiplicadoras são os mais utilizados na espectrometria de massas. Possuem a capacidade de aumentar a sensibilidade, pois, quando um íon colide com a superfície do detector, 2 elétrons são emitidos amplificando o sinal medido [28]. No presente trabalho, o detector utilizado foi *Microchannel plate* (MCP), uma forma de eletromultiplicadora, que possui eletrodos (*dynodes*) contínuos. Esse tipo de detector é uma placa constituída por vários microcanais individuais, cilíndricos e de tamanho microscópico (tamanho do diâmetro varia de 4 até 25 μ m). [30]

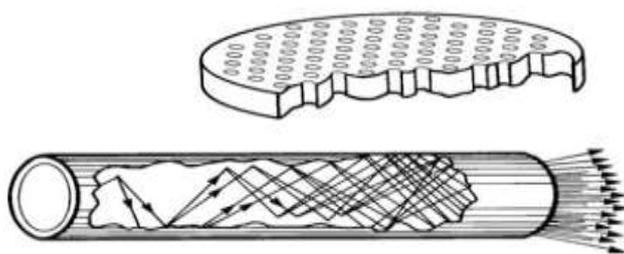


Figura 9: Seção transversal de um MCP e elétron multiplicação dentro do micro canal [30].

A multiplicação de elétrons ocorre por intermédio de uma substância semicondutora que reveste cada microcanal. Elétrons secundários são emitidos, causando um efeito cumulativo, como mostra a ilustração da Figura 9.

2.1.5 Processador de sinais

A informação fornecida pelo espectrômetro de massas não tem significado se não houver um processamento desses dados [29]. O sistema de detecção utilizado no TOF opera com o conversor do tipo tempo-digital (TDC, do inglês *time-to-digital conversor*). Cada íon que colide com a placa do detector gera um pulso de elétrons e o TDC contabiliza o tempo do pulso e o resultado é armazenado na memória e transferido para o computador [30].

O computador para o processamento de sinais precisa ser capaz de operações como, por exemplo, controlar o espectrômetro de massas, adquirir e processar os dados do espectrômetro [34]. Assim, é necessária uma interface que converta informações fornecidas digitalmente, para informações analógicas para controlar o equipamento, como também seja capaz de tratar os dados recebidos pelo MS. Os dados recebidos são registrados pelo computador e convertidos então para valores de massas ou intensidades de picos. A posição do pico é dada pelo valor do tempo, que é convertido em valor de massa. Essa conversão necessita de uma calibração prévia com padrões pré-estabelecidos [30].

2.2 Quimiometria

A Quimiometria tem como finalidade planejar e/ou otimizar procedimentos experimentais e aplicar a análise multivariada para obter informação química, a partir da grande quantidade de dados produzidos pelos instrumentos de análise. Aplicam-se, então, ferramentas matemáticas e estatísticas capazes de converter esses dados no máximo de informação útil possível [35].

Os métodos de classificação em quimiometria podem ser divididos em supervisionados e não supervisionados. Em métodos supervisionados, a informação sobre a que

classes (categorias) pertencem as amostras está disponível e é usada na construção dos modelos matemáticos.

O contrário ocorre com métodos quimiométricos ditos não supervisionados, em que não se conhece *a priori* a que classes pertencem as amostras, ou essa informação não é utilizada na construção de modelos matemáticos. Possuem a vantagem de não necessitar informações prévias sobre o conjunto de dados, característica essa muito conveniente à aplicação em casos forenses, nos quais frequentemente não se dispõe desse tipo de controle ou padronização sobre o material a ser analisado.

Em trabalho de pesquisa anterior [34], o método não supervisionado ULT (*Unsupervised Linkage Treshold*), que havia sido originalmente desenvolvido para outras aplicações forenses [36] (ex: correlação de apreensões de cocaína), foi aplicado na datação de lançamentos gráficos de tintas de caneta em documentos. O método permitiu a determinação de intervalos de confiança envolvidos na datação de cada formulação de tinta estudada. Por esse motivo, ele foi escolhido como método de referência para a comparação com a regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) utilizada no presente trabalho. A fundamentação teórica desses dois métodos é abordada a seguir.

2.2.1 Método ULT para datação de manuscritos

O método ULT pode ser resumido pelas seguintes etapas [36, 34]:

- 1) Os espectros de massa dos manuscritos de interesse são obtidos e as áreas dos picos são normalizadas para cada corante dentro de sua sequência de produtos de degradação. Dessa forma, os espectros de massa são convertidos em vetores característicos, cujas componentes são as áreas normalizadas dos picos de corante (Fig. 11);
- 2) A similaridade entre dois espectros é avaliada pelo cosseno quadrado do ângulo θ formado entre os seus vetores característicos. Por brevidade de notação, convencionou-se que $\rho = \cos^2\theta$. Dessa forma, ρ representa uma medida de similaridade entre amostras que apresenta valores no intervalo $[0;1]$. Para amostras muito parecidas $\rho \cong 1$, ao passo que para amostras muito diferentes $\rho \cong 0$.

- 3) Cálculo do dendrograma, gráfico de análise hierárquica que exhibe o agrupamento das amostras em classes de acordo com a sua similaridade (ρ). O dendrograma permite agrupar as amostras em crescente grau de separação de acordo com o detalhamento requerido. O número de classes (N_{class}) resultante poderá variar de 2 até o número total de amostras.
- 4) Variando o número de classes (N_{class}), calcular tanto as correlações intraclasse como as interclasse para cada par de amostras comparadas. Para um dado valor de N_{class} , amostras são ditas ligadas se elas se encontram agrupadas em uma mesma classe. Caso contrário, elas são consideradas não-ligadas. A partir dessa informação, os histogramas das amostras ligadas e não-ligadas são construídos.
- 5) Com base nos histogramas das amostras ligadas e não-ligadas, para cada N_{class} construir a curva característica do receptor (ROC, do inglês *Receiver Operating Characteristic*) e calcular a correspondente área sob a curva (AUC, do inglês *Area Under the Curve*). A ROC é um gráfico que possibilita avaliar a qualidade de um método de classificação de amostras à medida que seu limite de discriminação é variado. Em geral, não ocorre uma completa separação entre os histogramas das amostras ligadas e não-ligadas, existindo uma zona de sobreposição entre eles. Quanto maior o valor de AUC, menor a sobreposição. Um método de classificação ideal é aquele em que o valor de AUC é máximo (AUC=1).
- 6) O valor final para N_{class} é determinado de acordo com o seguinte critério sequencial:
 - a. Em ordem crescente, iniciando pelo menor valor possível ($N_{\text{class}} = 2$), escolha o valor de N_{class} que apresente o valor mais alto de AUC;
 - b. Para o N_{class} escolhido, verifique se o menor valor de ρ encontrado para a população de amostras ligadas (ρ_L) satisfaz à desigualdade $\rho_L \geq 0,9$. Se esse for o caso, o valor final de N_{class} está escolhido. Caso contrário, obtenha o próximo valor de N_{class} para o qual AUC alcance o seu próximo máximo valor. Repita esse procedimento até que o critério $\rho_L \geq 0,9$ seja

atingido. O valor crítico de 0,9 foi estabelecido de modo a garantir uma similaridade mínima requerida para amostras ligadas.

- 7) Os valores-limite de correlação entre amostras são determinados. O menor valor de ρ encontrado para a população de amostras ligadas é denominado ρ_L , ao passo que o maior valor de ρ encontrado para amostras não-ligadas é designado ρ_{NL} . Valores de cosseno quadrado acima de ρ_{NL} indicam amostras que estão correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$). Valores de cosseno quadrado abaixo de ρ_L indicam amostras que não estão correlacionadas ($\rho < \rho_L$). A zona de sobreposição entre ρ_L e ρ_{NL} representa uma região de incerteza ($\rho_L \leq \rho \leq \rho_{NL}$).
- 8) Construir o histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) em função da diferença de datas existente entre elas.
- 9) Determinar o intervalo de confiança de datação, por intermédio do cálculo do percentil 95% do histograma das amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$).

Uma representação esquemática e geral do método ULT pode ser vista na Figura 10 e na Figura 11.

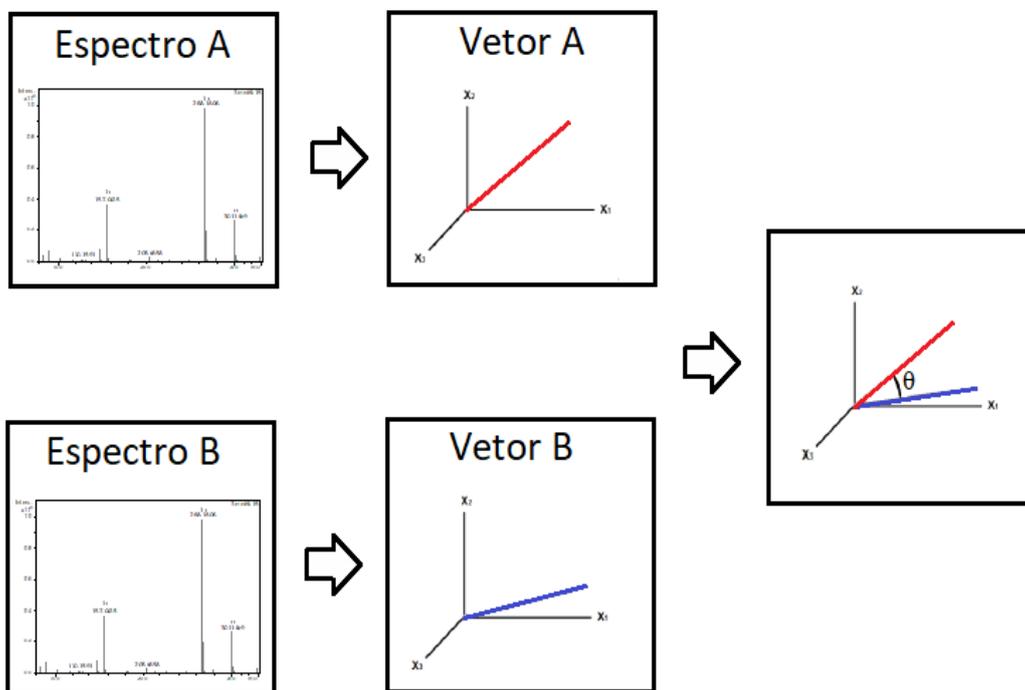


Figura 10: Representação ilustrativa da construção dos vetores para o método ULT a partir dos espectros de massa.

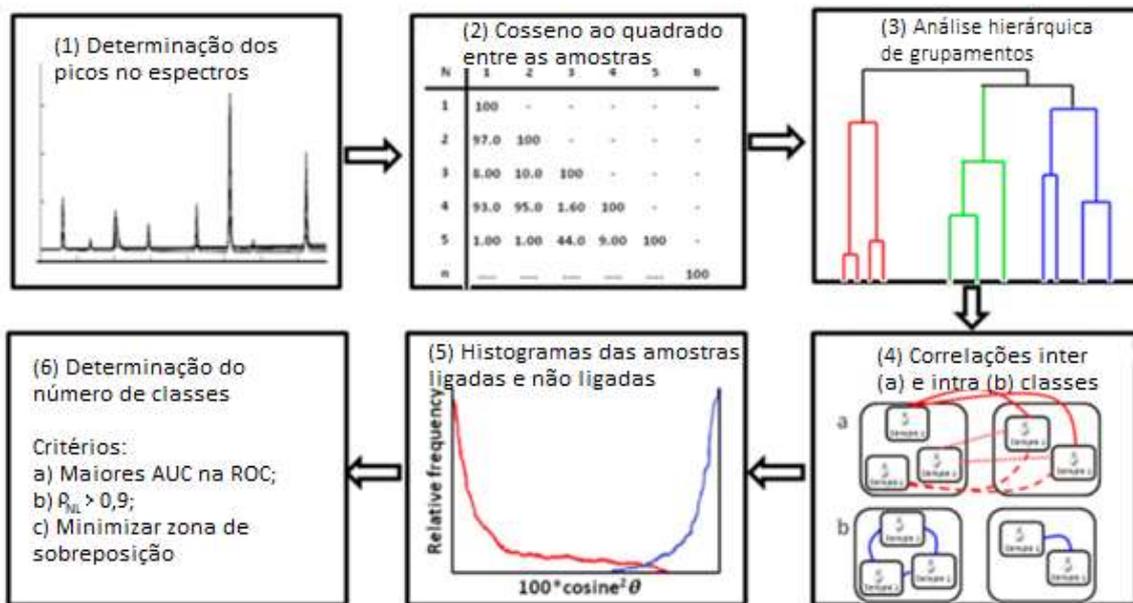


Figura 11: Síntese das etapas para o método ULT. Adaptado [36]

2.2.2 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR)

Existem diversas linhas de pesquisa na quimiometria e, dentre elas, a calibração multivariada destaca-se como uma das principais. No caso de uma calibração de primeira ordem, os dados são representados por um vetor para cada amostra. Diferentemente da calibração univariada, esse tipo de calibração permite a construção de modelos de regressão mesmo na presença de interferentes, desde que os mesmos estejam presentes nas amostras utilizadas na construção do modelo, e também proporcionam a identificação de anomalias. Dentre os métodos de calibração multivariada de primeira ordem, a regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR, do inglês *Partial Least Squares Regression*) é o mais utilizado [37] e é o método que será avaliado nessa dissertação.

Análises de regressão são usadas para estimar variáveis. Se duas variáveis se encontram significativamente correlacionadas, é possível estimar os valores de uma a partir da outra [2]. A regressão por PLSR é um método de calibração multivariada na qual a matriz de dados \mathbf{X} , nesse trabalho, é formada pelas áreas dos picos dos espectros de massa dos corantes existentes em cada amostra de tinta de caneta esferográfica, como esquematizado na Figura 12. O vetor \mathbf{y} é composto pelos valores de referência [38], que correspondem aos anos de lançamento da tinta da caneta esferográfica no documento. Na construção do modelo, *outliers*

são identificados e eliminados com base em medidas de influência e erros de modelagem das amostras.

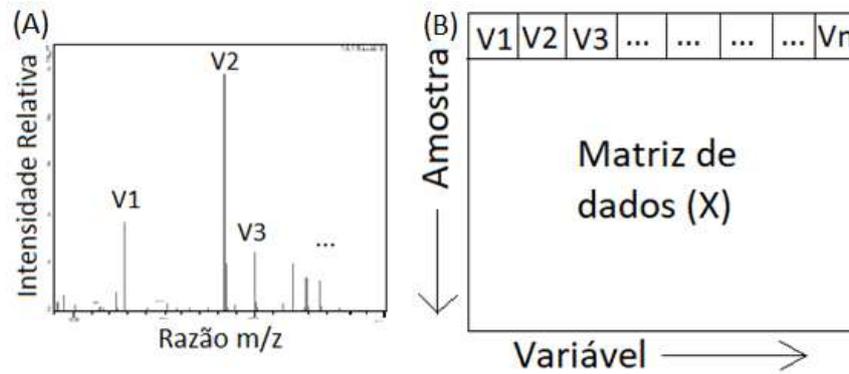


Figura 12: Organização dos dados em uma matriz a partir dos espectros de massas. (a) Espectro de massas que representará uma linha na matriz de dados representado em (b).

Para determinar quantas e quais variáveis serão utilizadas na construção do modelo, são criadas novas variáveis, chamadas de Variáveis Latentes (VL), de forma a maximizar a covariância entre a matriz \mathbf{X} e o vetor \mathbf{y} . As VL são definidas de maneira a obter a melhor relação entre \mathbf{X} e \mathbf{y} , ou seja, a relação que resulte no valor do resíduo o mais próximo possível de zero [33]. Em uma regressão por PLSR, quanto maior o número de variáveis latentes, mais complexo é o modelo.

Para escolher o número adequado de variáveis latentes, pode ser utilizado o método de validação cruzada. Um tipo comum de validação cruzada é a denominada “deixe uma fora” (*leave one out*) [39]. Esse tipo de validação consiste em várias rodadas. Em cada rodada, ocorre a remoção de uma amostra do conjunto de calibração, sendo o modelo quimiométrico construído com as demais. Este procedimento se repete até que todas as amostras tenham sido deixadas de fora uma vez do conjunto de calibração. Assim, serão obtidos n modelos com $n-1$ amostras, e o erro de previsão será avaliado através da raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV, do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation*) [40].

No PLSR os dados da matriz \mathbf{X} e do vetor \mathbf{y} são decompostos linearmente nas somas de produtos exibidas nas equações (9) e (10) [41].

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \sum \mathbf{t}_i \mathbf{p}_i^T + \mathbf{E} \quad (9)$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{Tq}^T + \mathbf{f} = \sum \mathbf{t}_i \mathbf{q}_i^T + \mathbf{f} \quad (10)$$

Onde \mathbf{E} e \mathbf{f} contém partes de \mathbf{X} e \mathbf{y} que não são explicadas pelo modelo (resíduo de modelagem). O vetor \mathbf{t}_i inclui as colunas de \mathbf{T} e é chamado de vetor escore. Os vetores \mathbf{p}_i e \mathbf{q}_i são chamados de pesos, e a soma \sum tem limite em “ A ”, número de variáveis latentes usados no modelo. A propriedade de interesse (y_{pred}) de um conjunto de amostras é estimada pela multiplicação dos dados da matriz \mathbf{X} (nesse caso as áreas dos picos dos espectros de massa dos corantes existentes em cada amostra) pelo vetor de regressão (\mathbf{b}) apropriado como na equação (11) onde \mathbf{W} é a matriz de pesos determinada no algoritmo do PLSR [41].

$$y_{pred} = \mathbf{T}\mathbf{q}^T = \mathbf{X}\mathbf{W}(\mathbf{P}^T\mathbf{W})^{-1} \mathbf{q}^T = \mathbf{X}\mathbf{b} \quad (11)$$

Esse processo pode ser representado de maneira esquematizada, pela Figura 13 que ilustra a fase de calibração para o modelo PLSR.

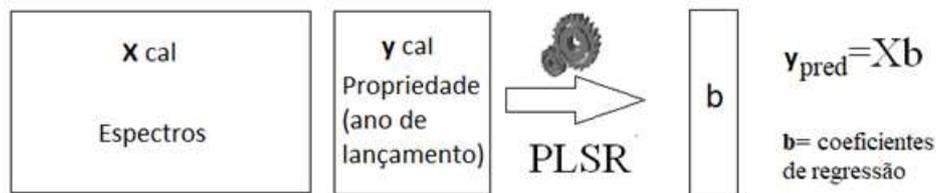


Figura 13: Esquema da fase de calibração para o modelo PLSR.

A

Figura 14 esquematiza a fase de validação do modelo PLSR. Nesse modelo, em termos médios, a exatidão pode ser expressa pelo RMSEP (do inglês *Root Mean Squared Error of Prediction*), que inclui tanto os erros sistemáticos como os erros aleatórios [41]. A exatidão avalia a concordância dos valores estimados pelo modelo com os valores ditos como verdadeiros ou de referência.



Figura 14: Esquema da fase de validação para modelo PLSR.

É comum realizar-se algum tipo de pré-processamento nos dados na tentativa de reduzir as interferências de parâmetros espectrais antes do desenvolvimento do modelo PLSR.

Esses pré-processamentos são realizados com a finalidade de minimizar efeitos indesejáveis e que não estão relacionados com a propriedade de interesse, como por exemplo: variação de linha de base, variações devido à fonte de radiação, tamanho de partícula, rugosidade da superfície da amostra, etc. Em geral, essas operações são aplicadas às variáveis da matriz de dados \mathbf{X} , antes da construção do modelo de calibração multivariada, mas alguns pré-processamentos podem ser aplicados também no vetor \mathbf{y} [42], como por exemplo centrar os dados na média.

A definição do pré-processamento a ser utilizado deve levar em consideração as características das amostras e dos dados. A escolha é usualmente feita em favor do pré-processamento que resultar no menor erro associado a uma avaliação por validação cruzada. É importante salientar que, o pré-processamento a ser utilizado na etapa de validação deve ser o mesmo que aquele empregado na etapa de calibração [40].

Dois importantes métodos de pré-processamento passíveis de utilização com dados de espectrometria de massas são o o centramento de dados na média e a padronização normal de variáveis (SNV, do inglês *Standard Normal Variate*). O centramento na média consiste na subtração do valor médio de intensidade/área, calculado para uma amostra, de cada valor de intensidade/área dessa mesma amostra [40]. Assim, esse pré-processamento elimina um fator constante (offset) e translada os dados da origem natural para a origem na média, preservando a sua estrutura [35]. Já a normalização SNV é geralmente usada para corrigir a variação espectral causada por erros sistemáticos e de linha de base e o objetivo é melhorar a correlação entre os dados espectrais e os valores de interesse.

Durante a modelagem, é necessário estar atento para a possível presença de *outliers*, pois eles influenciam negativamente a performance do modelo, resultando em altos valores de erro e, conseqüentemente, baixa capacidade de previsão [43]. Portanto, essas amostras devem ser detectadas, examinadas e, se necessário, removidas dos conjuntos de dados.

Existem diferentes métodos utilizados para a identificação de *outliers*. Para esse trabalho, será utilizado a análise gráfica da influência (*leverage*) em conjunto com os erros nos resíduos referentes à propriedade de interesse. A medida de *leverage* se baseia na análise da influência de uma determinada amostra no conjunto de regressão quando comparada com as restantes. Quando uma amostra possui ao mesmo tempo alto *leverage* e alto erro, ela influencia demasiado negativamente o desempenho do modelo [43]. Neste trabalho, os *outliers* foram

excluídos de acordo com esses 2 critérios simultâneos, ou seja, foram excluídos amostras com alto *leverage* e alto erro, usando 99% de confiança.

Datação quimiométrica de documentos

3 Datação quimiométrica de documentos

Nesse capítulo será avaliada a aplicação da regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) a dados previamente obtidos por LC-MS/TOF na estimativa da data de lançamentos de tintas de caneta esferográfica em documentos envelhecidos naturalmente. Os dados obtidos por PLSR serão comparados com aqueles obtidos por Karina F. F. Costa, que utilizou o método ULT para o mesmo tipo de aplicação em sua dissertação de mestrado [34]. O objetivo foi estudar diferentes métodos a fim de encontrar aquele que fornecesse o menor valor de percentil 95%.

3.1 Materiais e métodos

Os dados experimentais, mostrados nesse capítulo, foram obtidos do estudo realizado por Karina F. F. Costa, cujas informações detalhadas podem ser encontradas em sua dissertação de mestrado, intitulada "Datação de lançamentos gráficos por espectrometria de massas e análise do perfil de degradação natural de corantes", que foi realizada na Universidade de Brasília e defendida no ano de 2016. A seguir, serão descritos de forma sumária os aspectos referentes à coleta e preparo das amostras obtidos no estudo prévio e que servirão de base à comparação dos dois métodos quimiométricos supracitados.

3.1.1 Amostras

A amostragem abrangeu laudos periciais, com diferentes datas de produção, localizados no arquivo do Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal (INC/PF). Tais documentos selecionados continham manuscritos de tintas de canetas esferográficas nas cores azul e preta. Foram coletados lançamentos gráficos produzidos entre os anos de 1962 e 2014, com intervalo médio de dois anos entre as amostras. Um total de 505 amostras de tintas de caneta foram selecionadas para o estudo, sendo 384 (76%) da cor azul enquanto que 121 (24%) da cor preta. Os principais corantes detectados encontram-se na Tabela 1, juntamente com a relação m/z dos íons observáveis experimentalmente por espectrometria de massas. As combinações dos corantes (formulações) de maior ocorrência nas amostras (Tabela 2) foram utilizadas na comparação entre o método ULT e PLSR.

Tabela 1: Siglas e íons moleculares característicos dos corantes que foram estudados.

Corante	Sigla	Íons moleculares característicos*
1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina	G	268, 254, 240, 226, 212
Cristal Violeta	C	372, 358, 344, 330, 316
Rodamina	R	443, 415
Victoria Blue B	V	470, 456, 442, 428, 414
Basic Blue 7	B	478, 450, 422, 394

*Valores de relação massa carga apresentados **sem as casas decimais**.

Tabela 2: Distribuição das formulações de corantes por década. Adaptado [34]

Formulação	Nº de picos máx.	% conforme coloração da tinta		Quantidade de lançamentos de tinta por década						Total de canetas por formulação
		Canetas Azuis	Canetas Pretas	1960	1970	1980	1990	2000	2010	
				a 1968	a 1978	a 1988	a 1998	a 2008	a 2014	
GC	13	98,2%	1,8%	12	26	42	56	18	11	165
CV	13	96%	4,0%	2	3	2	21	32	39	99
GRB	10	0%	100%	-	7	27	31	1	-	66
B	3	88,4%	11,6%	9	24	5	3	-	2	43
C	5	12,5%	87,5	3	7	-	3	17	10	40
CB	10	96,8%	3,2%	11	6	3	1	2	8	31

3.1.2 Preparação das amostras

Foram extraídos dois pequenos confetes (diâmetro ~2mm cada um) da região do documento contendo manuscritos. Esse mesmo procedimento foi repetido para a obtenção de amostras do suporte (papel) sem tinta, funcionando como branco. Para extração de cada amostra, foi utilizado um alicate monofurador (Figura 15) e os confetes foram posteriormente extraídos com 500 µL de metanol (grau HPLC) sob vórtex por 30 segundos. As amostras, lacradas em vials apropriados, estavam prontas para a análise por LC-MS/TOF com fonte de ionização ESI.

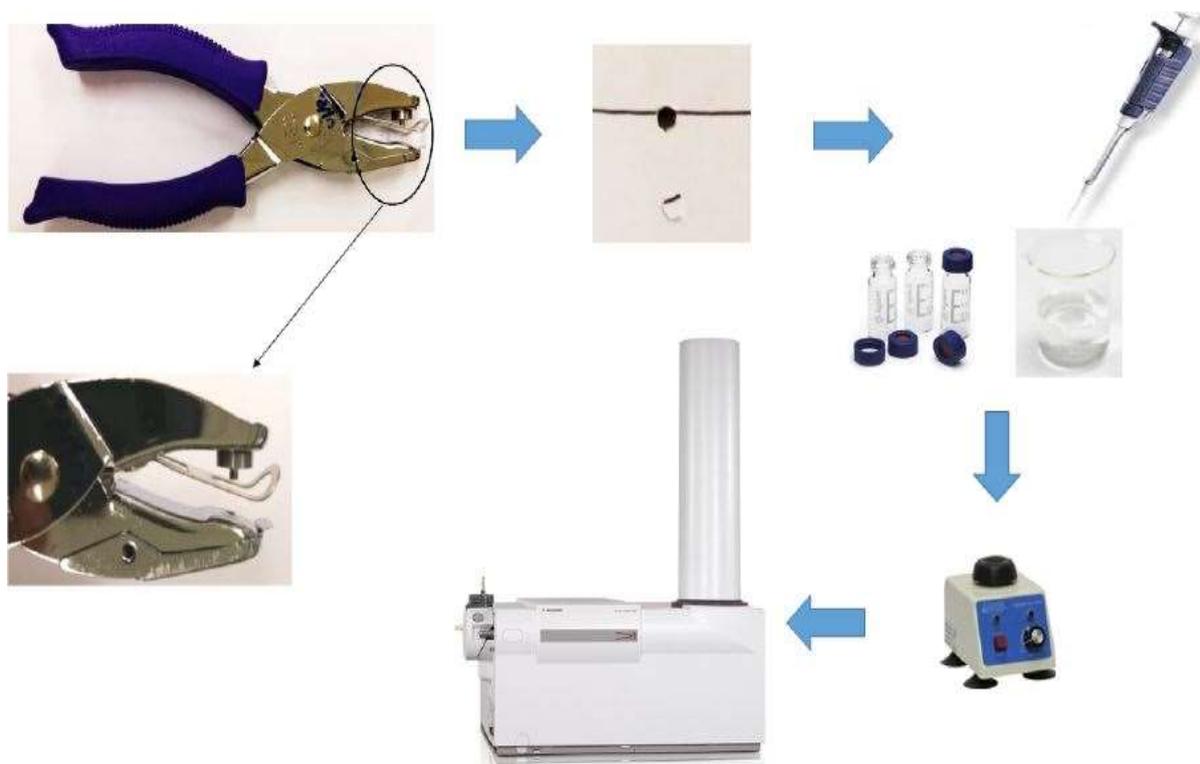


Figura 15: Procedimento experimental para análise de tintas de canetas em papel [34].

Durante o preparo das amostras, o perfurador e a pinça foram higienizados com papel toalha umedecido com álcool etílico a cada amostra, para evitar contaminação cruzada. Além disso, foi observado se no verso de todas as folhas onde se pretendia amostrar havia alguma tinta. A intenção era amostrar apenas partes do documento que não possuíssem no seu verso algum tipo de marcação, impressão, ou qualquer elemento que pudesse interferir nos resultados das análises.

3.1.3 Análise dos dados

Os métodos quimiométricos abordados no presente trabalho (ULT e PLSR) foram construídos utilizando o programa *Matlab*® versão 8.0.0.783 (R2012b), *PLS toolbox* 7.0.3 e funções do *toolbox statistics*.

O modelo PLSR foi desenvolvido utilizando dois pré-processamentos diferentes que foram: dados centrados na média e normalização SNV. Esses pré-processamentos foram

escolhidos pois resultaram em menores erros na estimativa dos anos de lançamentos de tinta em comparação a outros pré-processamentos testados. O número de variáveis latentes foi determinado segundo dois critérios: aquele que fornecia o menor valor de RMSECV (do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation*) ou o número de variáveis latentes a partir do qual o RMSECV atingia um patamar.

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Método quimiométrico - ULT

A Tabela 3 resume os resultados obtidos pelo método ULT, sendo que os resultados mais importantes para fins de comparação são a máxima diferença de idade entre amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) que engloba 95% das amostras (percentil 95%) e a máxima diferença de idade observada entre amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$). A formulação que contém apenas o corante Basic Blue 7 (B) apresentou em 95% das amostras uma diferença de idade entre amostras correlacionadas ($\rho > \rho_{NL}$) de até 38, sendo uma diferença muito alta e provavelmente com pouca aplicabilidade em análises forenses. Esse resultado, de alto valor do percentil 95% e da diferença máxima de idade entre amostras correlacionadas também se repetiu na formulação Cristal Violeta e Basic Blue 7 (CB). Contudo, para as demais formulações foram obtidos percentis 95% que variam de 10 a 18 anos, os quais podem ter maior aplicabilidade na resolução de casos forenses. A formulação que resultou em menor percentil 95% foi a GC, e essa combinação está presente em muitas canetas empregadas no mercado (Seção 3.1.1, Tabela 2) em especial da marca Bic (Seção 4.2.4).

Tabela 3: Síntese dos resultados obtidos no método ULT.

<i>Formulação</i>	B	C	CB	CV	GC	GRB
<i>Nº amostras</i>	43	40	31	99	165	66
<i>Nº classes</i>	2	8	3	21	17	2
<i>Nº correlações</i>	819	58	122	52	645	1988
<i>Percentil 95% (anos)</i>	38	14	38	11	10	18
<i>Diferença máxima (anos)</i>	52	48	38	14	36	22

As Figura 16 e Figura 17 apresentam os histogramas de correlação da formulação com a combinação dos corantes Guanidina e Cristal Violeta (GC) e da formulação que contém apenas o corante Basic Blue 7 (B), os quais ilustram alguns dos resultados obtidos por Karina F. F. Costa [34].

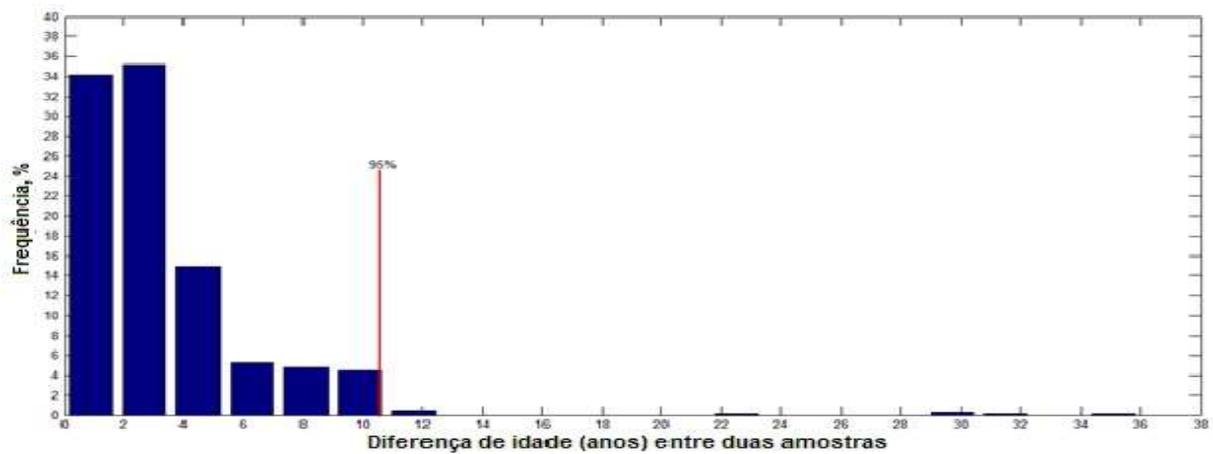


Figura 16: Histograma de amostras correlacionadas obtido no método ULT para a formulação GC [34].

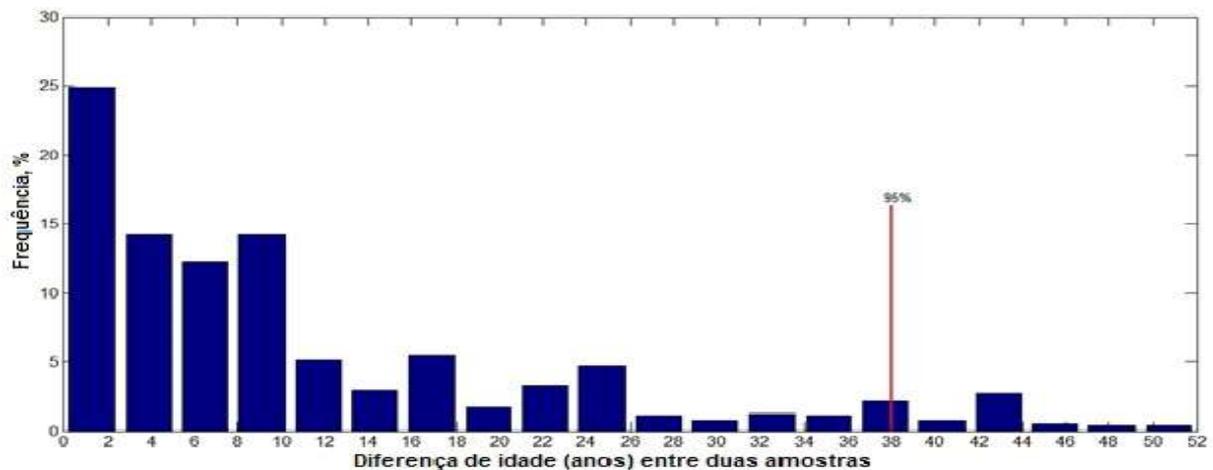


Figura 17: Histograma de amostras correlacionadas obtido no método ULT para a formulação B [34].

A Figura 16 ilustra o histograma da formulação GC, que teve o melhor resultado no método quimiométrico ULT. Nesse histograma, observamos que a maior frequência ocorre com uma diferença de idade entre amostras correlacionadas de 3 anos, que o percentil 95% foi de 10 anos e que diferenças de idade acima desse valor foram desprezíveis. Já a Figura 17 mostra o histograma para a formulação contendo apenas B, que teve o pior resultado obtido pelo mesmo método quimiométrico. Nesse caso, o percentil 95% foi de 38 anos e a diferença

máxima de idade obtida foi de 52 anos. Contudo, as maiores frequências dos resultados ainda se encontraram com diferenças de até 10 anos.

3.2.2 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR)

Os dados gerados por espectrometria de massas são constituídos de tabelas com as áreas de todos os picos referentes aos corantes selecionados. Para o cálculo do PLSR, os valores de área de todos os picos, de uma mesma série de produtos de degradação correspondente a cada corante, foram normalizados a 100%. Essa normalização foi efetuada usando-se a razão entre as intensidades de área de cada pico individual e a soma dos valores das intensidades de todos os picos pertencentes a uma mesma sequência de degradação, definindo assim, vetores característicos de cada amostra.

3.2.2.1 PLSR com pré-processamento por centramento na média

A Tabela 4 mostra a quantidade de variáveis latentes que foram utilizadas para cada formulação e quais íons foram mais importantes na construção das variáveis latentes.

Tabela 4: Número máximo de picos, número de variáveis latentes e os principais íons utilizados na modelagem do PLSR com centramento na média para cada formulação.

<i>Formulação</i>	Nº máx de picos	Nº variáveis latentes	Principais íons (m/z)
<i>B</i>	3	1	478
<i>C</i>	5	4	344; 330; 358; 316
<i>CB</i>	10	2	358; 450
<i>CV</i>	13	1	456
<i>GC</i>	13	7	268; 372; 240; 212; 244; 226; 358
<i>GRB</i>	10	2	240; 212

Os resultados obtidos pelo método PLSR utilizando o pré-processamento que centra os dados na média estão sintetizados na Tabela 5. Pode-se observar que as amostras com as combinações 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rodamina, e Basic Blue 7 (GRB), 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Cristal Violeta e (GC) e, Cristal Violeta e Basic Blue 7 (CB) resultaram em menores valores de percentil 95%: 7, 9 e 15 anos respectivamente. Essas formulações

mencionadas tiveram altos valores do coeficiente de determinação (R^2) de calibração, sendo todos acima de 0,8, e baixos valores de RMSEP. Valores de R^2 próximos a 1,0 indicam um bom ajuste da regressão.

Tabela 5: Resultados obtidos no método por PLSR com dados centrados na média.

<i>Formulação</i>	B	C	CB	CV	GC	GRB
<i>Nº calibração</i>	29	27	21	66	110	44
<i>Nº validação</i>	14	13	10	33	55	22
<i>R² calibração</i>	0,04	0,56	0,81	0,12	0,84	0,80
<i>R² validação</i>	0,10	0,12	0,94	0,08	0,68	0,66
<i>RMSEP</i>	11,92	16,10	6,47	9,52	5,07	4,09
<i>Percentil 95% (anos)</i>	25	26	15	29	9	7

Por outro lado, a formulação que contém os corantes Cristal Violeta e Victoria Blue B (CV) resultou em valores de R^2 muito baixos (0,12 e 0,08 para calibração e validação respectivamente). Era esperado um resultado melhor para essa formulação, pois ela tem a segunda maior frequência de amostras disponíveis e 13 picos no espectro de massas, o que resulta em mais informação para ser modelada no método. O percentil 95% das amostras para a combinação CV foi de 29 anos. Uma possível explicação para a maior diferença nessa formulação são variações nas degradações dos corantes em função da formulação da tinta das canetas que apresentavam CV. Assim como a combinação CV, as formulações contendo apenas C e apenas B também resultaram em percentis altos.

As figuras a seguir mostram os gráficos de regressão e os resíduos para as formulações GRB e GC. Essas combinações representam os melhores ajustes das regressões, ou seja, as melhores correlações entre os valores da data do documento e os valores de data estimados. Para a formulação GRB, as diferenças variaram de -7 a 7 anos, sendo que apenas uma amostra tem diferença maior que 7 anos. Para a GC, as diferenças variaram de aproximadamente -15 a 20 anos. Os bons valores de ajuste na regressão e as diferenças mais baixas observadas entre a data real e a estimada indicam que a PLSR foi eficiente para essas formulações. A formulação CB também obteve bons resultados e seus gráficos são similares aos apresentados para GRB e GC.

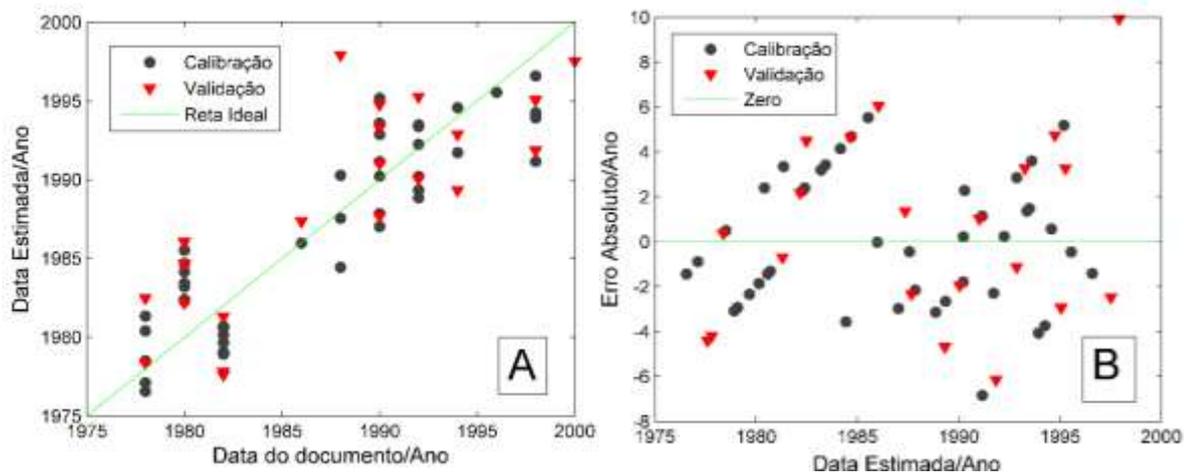


Figura 18: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação GRB (PLSR – dados centrados na média).

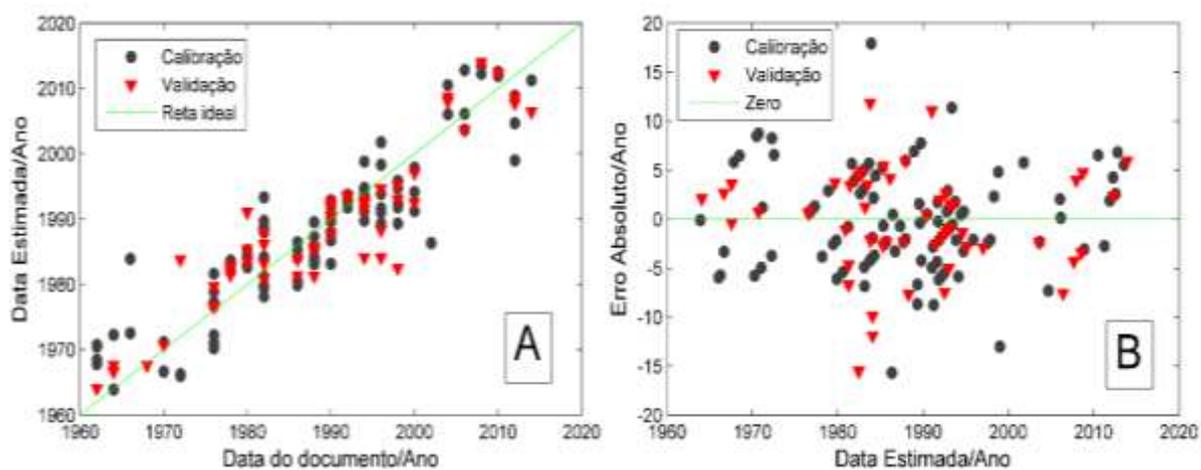


Figura 19: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação GC (PLSR – dados centrados na média).

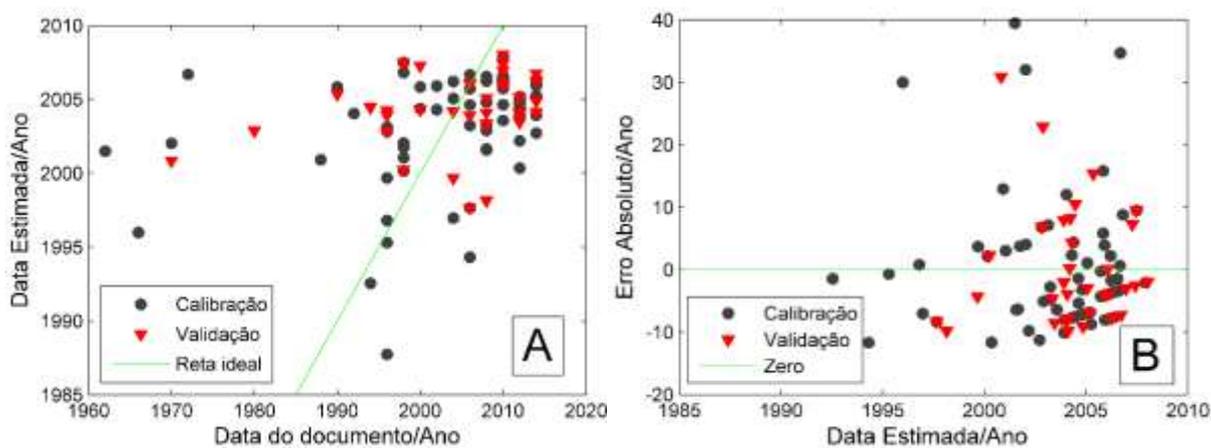


Figura 20: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação CV (PLSR – dados centrados na média).

No caso das formulações CV, C e B, não foram obtidas boas regressões, observando-se amostras com erro muito elevado (aproximadamente -15 a 40 anos). O método para a formulação CV resultou em um percentil 95% de 29 anos e a Figura 20 mostra os gráficos de regressão e resíduos obtidos para essa formulação. De forma similar, nas amostras com as formulações contendo apenas um corante, tanto para o Cristal Violeta (C) como para o Basic Blue 7 (B), os percentis 95% também ficaram em torno de 25 anos.

A Figura 21 mostra o histograma para a formulação GRB, que teve o melhor resultado pelo método por PLSR com dados centrados na média, onde o percentil 95% foi de 7 anos. Histogramas similares ao da formulação GRB foram obtidos para as formulações GC e CB, com percentil 95% de 9 e 15 anos, respectivamente.

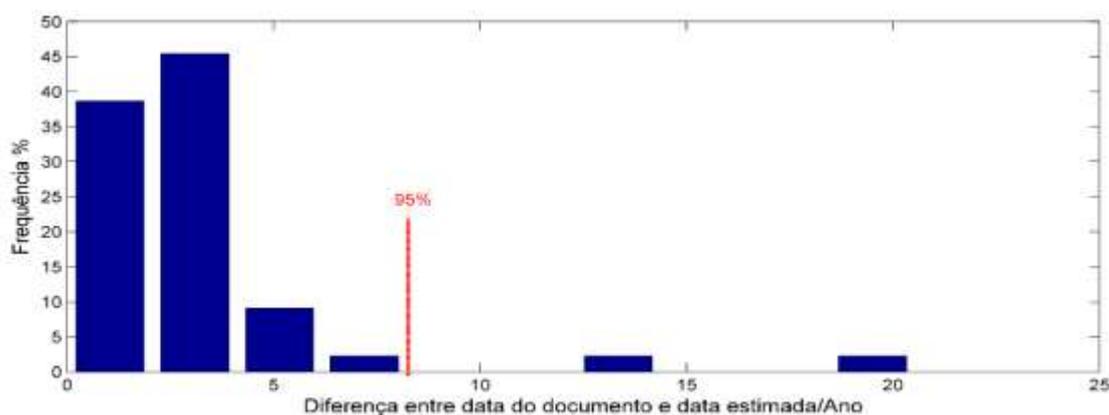


Figura 21: Histograma obtido no método por PLSR – dados centrados na média para a formulação GRB.

A Figura 22 mostra o histograma para a formulação CV, que teve o maior percentil 95%: 29 anos. De maneira similar, os resultados para as formulações C e B tiveram percentis 95% de 26 e 25 anos respectivamente.

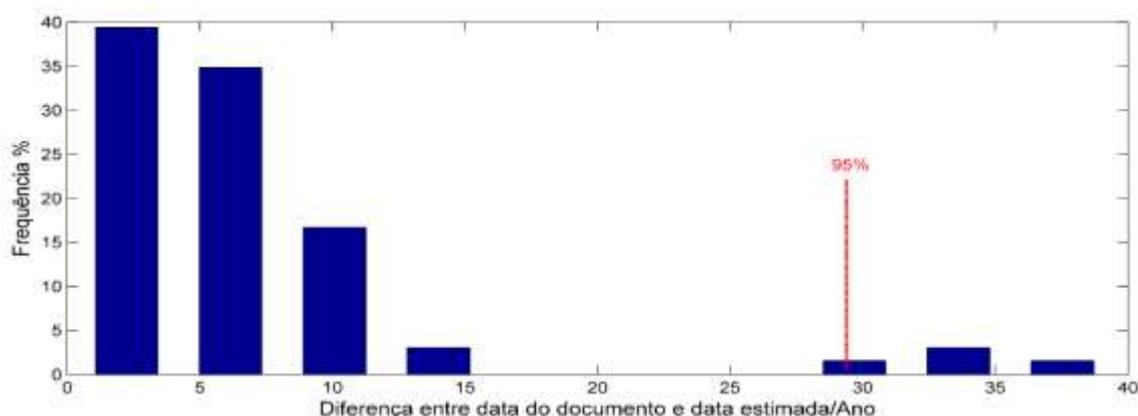


Figura 22: Histograma obtido no método por PLSR – dados centrados na média para a formulação CV.

Observa-se nesses histogramas, que as poucas amostras que apresentam diferença de idade além do percentil 95% apresentaram um erro muito mais alto que a maioria, sendo elas as responsáveis por elevar os valores de RMSEP.

3.2.2.2 PLSR com normalização por SNV e dados centrados na média

A Tabela 6 mostra a quantidade de variáveis latentes que foram utilizadas para cada formulação e quais íons foram os mais importantes na construção das variáveis latentes.

Tabela 6: Número máximo de picos, número de variáveis latentes e os principais íons utilizados na modelagem do PLSR com normalização SNV e centramento na média para cada formulação

<i>Formulação</i>	Nº máx de picos	Nº variáveis latentes	Principais íons (m/z)
<i>B</i>	3	1	450
<i>C</i>	5	4	344; 330; 358; 316
<i>CB</i>	10	4	358; 330; 344; 450
<i>CV</i>	13	1	442
<i>GC</i>	13	7	268; 358; 240; 212; 244; 226; 372
<i>GRB</i>	10	3	240; 212; 254

Essa subseção contempla os resultados obtidos pelo método PLSR utilizando o pré-processamento com normalização por SNV e dados centrados na média. Os resultados obtidos nessas condições são sintetizados na Tabela 7. Com essa combinação de pré-processamentos, as amostras contendo as com as formulações Cristal Violeta e Basic Blue 7 (CB), 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina e Cristal Violeta (GC) e 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, Rodamina, e Basic Blue 7 (GRB) continuaram resultando nos menores valores de percentil 95% (7, 11 e 5 anos, respectivamente), o que representa uma diminuição nos erros de datação de 2 a 4 anos em relação ao modelo PLSR anterior.

Da mesma maneira, a formulação que contém os corantes Cristal Violeta e Victoria Blue B (CV) apresentou novamente o pior valor de R^2 de validação e também maior percentil 95%, que foi de 29 anos. Ainda de maneira similar ao modelo anterior, as formulações contendo apenas C e apenas B não apresentaram nenhuma melhora significativa.

Tabela 7: Resultados obtidos no método por regressão PLSR – dados centrados na média e normalização SNV.

<i>Formulação</i>	B	C	CB	CV	GC	GRB
<i>Nº calibração</i>	29	27	21	66	110	44
<i>Nº validação</i>	14	13	10	33	55	22
<i>R² calibração</i>	0,06	0,50	0,96	0,11	0,79	0,82
<i>R² validação</i>	0,02	0,32	0,94	0,07	0,77	0,76
<i>RMSEP</i>	11,48	14,21	6,26	9,52	7,17	3,43
<i>Percentil 95% (anos)</i>	26	24	7	29	11	5

A Figura 23 mostra os gráficos de regressão e de resíduos obtidos para a formulação GRB, que teve melhor ajuste nesse modelo. Para essa formulação, as diferenças encontram-se entre -8 e 6 anos. As formulações CB e GC resultaram em gráficos similares ao apresentado para a formulação GRB.

Em se tratando das formulações CV, C e B, de forma análoga ao modelo PLSR anterior, não foram obtidas boas regressões e as diferenças obtidas foram muito elevadas. O método para a formulação CV resultou em percentil 95% de 29 anos e os gráficos de regressão e resíduos são mostrados na Figura 24. De forma similar, nas amostras com as formulações contendo apenas o Cristal Violeta (C), como também apenas o Basic Blue 7 (B), os percentis 95% continuaram altos. Todos os gráficos obtidos par ao PLSR com os dados centrados na média e normalização SNV estão disponíveis no Apêndice 1.

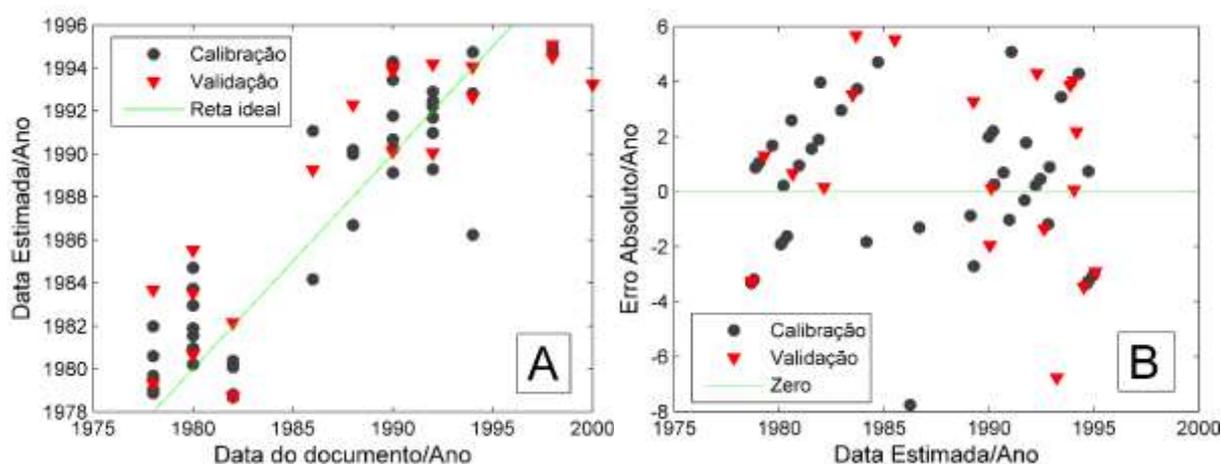


Figura 23: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação GRB (PLSR – dados centrados na média e normalização SNV).

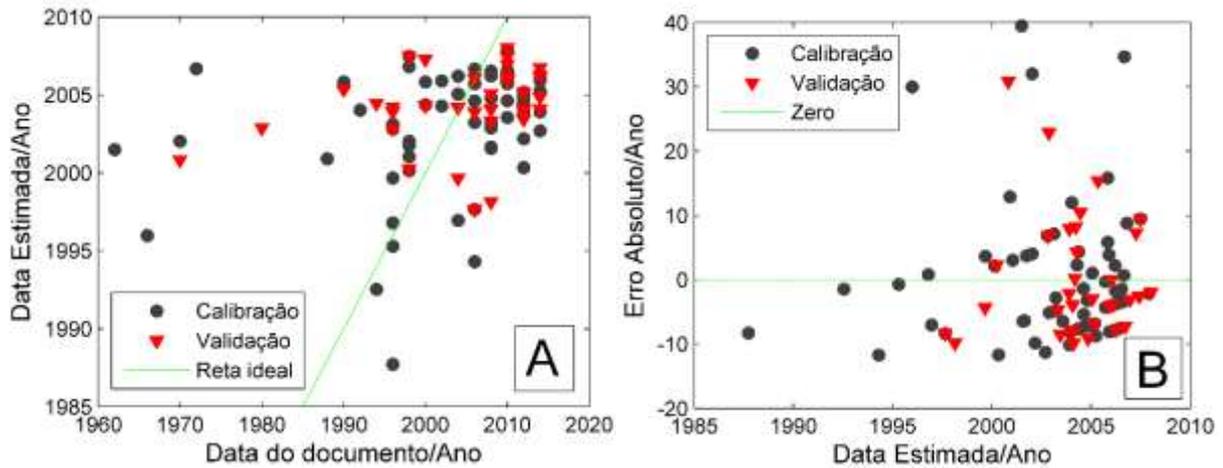


Figura 24: A) Regressão e B) Data estimada vs Erro Absoluto, ambos para a formulação CV (PLSR – dados centrados na média e normalização SNV).

A Figura 25 mostra o histograma para a formulação GRB, que obteve o melhor resultado pelo método de regressão por PLSR com SNV e dados centrados na média, onde o percentil 95% foi de 5 anos. Histogramas parecidos ao da formulação GRB foram obtidos para as formulações GC e CB, com percentil 95% de 11 e 7 anos respectivamente. Já a Figura 26 mostra o histograma para a formulação CV, que alcançou o maior percentil 95%, de 29 anos. O Apêndice 2 contém os histogramas para as demais formulações no método PLSR com os dados centrados na média e normalização SNV.

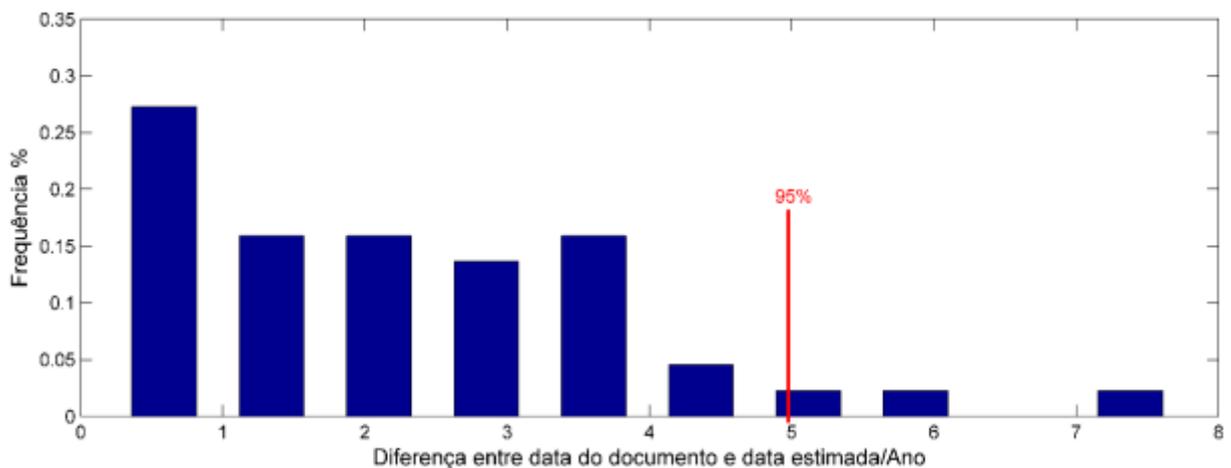


Figura 25: Histograma obtido no método por com SNV e dados centrados na média para a formulação a formulação GRB.

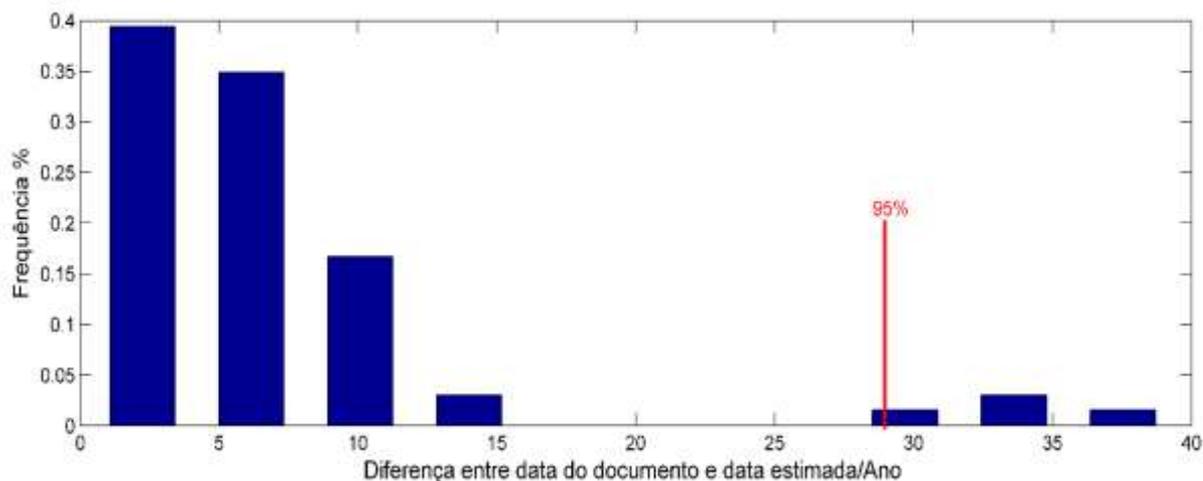


Figura 26: Histograma obtido no método por PLSR com SNV e dados centrados na média para a formulação a formulação CV.

3.2.3 Comparação entre os métodos

Tanto o método utilizado (PLSR) como o método de referência (ULT) apresentaram dificuldade de modelagem para a formulação B, que apresentou diferenças maiores, o que pode ser justificado pelo espectro de massas desse corante possuir apenas 3 picos de íons característicos e pelo fato de o corante B apresentar um processo de deetilação lento, conforme será evidenciado nos estudos de cinética de degradação (ver seção 4.2.2.3). Ter poucos íons característicos pode ser prejudicial pois resulta em menos informação para ser modelada no desenvolvimento dos métodos. No método PLSR, com ambos pré-processamentos, as maiores diferenças foram obtidas com a formulação CV.

Ao considerar o percentil 95% das amostras, os métodos ULT e PLSR apresentaram resultados considerados utilizáveis em aplicações forenses (erros < 15 anos) em três das seis formulações. Os resultados são mostrados na Tabela 8, que compara o percentil 95% das amostras para todos os modelos. O Método PLSR apenas centrando os dados na média apresentou bons resultados para CB, GC e GRB, sendo o melhor método para GC. Já o método por PLSR + SNV + dados centrados na média apresentou bons resultados para as mesmas três formulações (CB, GC e GRB), sendo superior para as formulações CB e GRB. A partir desses dados, o método PLSR aquele com os dados centrados na média e normalização SNV foi considerado superior. Quanto ao método ULT, obteve-se bons resultados para C, CV e GC, sendo o melhor para as formulações C e CV. Por outro lado, nenhum método apresentou

resultados aceitáveis para a formulação B, que contém apenas Basic Blue 7. Esses resultados sugerem que os dois métodos quimiométricos testados (ULT e PLSR) são complementares entre si, sendo sua utilização decidida pela formulação da tinta empregada.

Tabela 8: Comparação do percentil 95% das amostras entre os métodos quimiométricos testados.

<i>Percentil 95% (anos)\Formulação</i>	B	C	CB	CV	GC	GRB
<i>PLSR – dados centrado na média</i>	25	26	15	29	9	7
<i>PLSR – dados centrados na média + Normalização SNV</i>	26	24	7	29	11	5
<i>ULT</i>	38	14	38	11	10	18

Por outro lado, considerando-se a diferença máxima de idades obtida, o método ULT seria o menos favorável, pois resultou em 5 diferenças acima daquelas obtidas para os dois modelos PLSR. Apenas para a formulação CV, o método ULT foi superior aos demais, de acordo com esse critério (Tabela 9). Quanto ao PLSR, em ambos pré-processamentos, as diferenças máximas para a maioria das formulações foram semelhantes, com exceção para as formulações CB e GRB. Para essas formulações, o método PLSR com SNV e dados centrados na média apresentou menor diferença máxima.

Tabela 9: Comparação da diferença máxima entre os métodos quimiométricos testados.

<i>Diferença máxima (anos)\Formulação</i>	B	C	CB	CV	GC	GRB
<i>PLSR – dados centrados na média</i>	31	29	17	38	17	19
<i>PLSR – dados centrados na média + Normalização SNV</i>	32	27	10	38	18	8
<i>ULT</i>	52	48	38	14	36	22

3.3 Conclusão

O método quimiométrico ULT resultou em 4 formulações com percentil 95% entre 10 e 18 anos. Das 6 formulações testadas, apenas 2 alcançaram percentis maiores (38 anos). Para o método PLSR, pode-se indicar o pré-processamento com SNV e dados centrados na

média como ligeiramente superior ao PLSR apenas com os dados centrados na média, obtendo percentis 95% menores que 15 anos em metade das formulações.

Conclui-se, considerando o percentil 95%, que os métodos testados (ULT e PLSR) são complementares e que nenhum método pode ser considerado o melhor para todas as situações, devendo-se levar em conta a formulação da tinta a ser analisada. O método ULT funciona melhor para as formulações C e CV, enquanto que o método PLS com SNV e dados centrados na média é indicado para as formulações CB e RGB. Para a formulação GC ambos os métodos podem ser aplicados, fornecendo resultados similares. Nenhum dos métodos testados resultou em baixos valores de erro para a formulação contendo apenas o corante Basic Blue 7 (B).

Estudo da cinética de degradação artificial de corantes

4 Estudo da cinética de degradação artificial de corantes

Esse capítulo apresenta resultados obtidos em um estudo de degradação forçada, induzida por temperatura e radiação nas regiões visível e infravermelho próximo, de lançamentos de tinta provenientes de 8 marcas de canetas esferográfica amplamente encontradas no mercado. Foi utilizada a técnica de LC-MS/TOF para acompanhar a evolução da composição de corantes com o tempo. O objetivo de envelhecer os lançamentos artificialmente foi estudar o comportamento da degradação dos corantes presentes nessas canetas esferográficas.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Obtenção das amostras

Com a informação proveniente de estudos prévios a respeito das formulações de corantes em documentos dos arquivos do INC no período compreendido entre 1964 a 2014 [34], e, considerando as marcas mais comumente encontradas no mercado, foram escolhidas 8 canetas para a realização do envelhecimento forçado. As canetas esferográficas selecionadas e suas respectivas formulações estão listadas na Tabela 10. Os espectros de massa dessas canetas são apresentados no Apêndice 3.

Tabela 10: Canetas esferográficas selecionadas para estudo cinético da degradação dos corantes presentes na tinta.

Marca	Coloração	Formulação
Pilot PB-S	Azul	CB
Bic (classica)	Azul	GC
Bic Cristal	Azul	GC
Molin	Azul	CV
Compactor	Azul	CV
Cis Speed	Azul	C
Acrilex	Preta	CV
Bic (classica)	Preta	C

Após selecionar as canetas esferográficas que seriam estudadas, envelhecimento forçado foi realizado utilizando uma caixa de iluminação confeccionada no laboratório [44]. A caixa utilizada para o envelhecimento é confeccionada em madeira e possui a parte interna revestida de papel alumínio. No teto, foram fixadas 4 lâmpadas comerciais incandescentes com potência de 60W, mantidas a 9 cm de altura em relação à base onde são posicionadas as amostras. A Figura 27 e a Figura 28 ilustram a caixa descrita.



Figura 27: Exterior da caixa de envelhecimento [44].



Figura 28: Interior da caixa de envelhecimento artificial forçado.

Para envelhecer a tinta da caneta nesse aparato, as amostras brutas foram preparadas em folhas de papel branco, de tamanho A4 e 75g/cm^2 de gramatura, que foram provenientes de uma mesma resma de papel. Em cada folha de papel, foram feitos vários traços retilíneos de uma mesma caneta, dentre aquelas previamente selecionadas, e com o auxílio de régua milimetrada, que era higienizada com etanol sempre que havia a necessidade de utilizar uma nova amostra. Esses procedimentos visavam eliminar a possibilidade de contaminações cruzadas entre as tintas de caneta.

A exposição dos traços de caneta ao envelhecimento forçado foi realizada ao longo de dois períodos totais: 24 horas e 300 horas, a depender das características de degradação apresentadas por cada tinta. Pequenas porções de papel contendo traços de tinta das canetas (amostras brutas) foram retirados periodicamente de acordo com o planejamento de degradação apresentado nas Tabela 11 e Tabela 12. Amostras do branco, apenas o papel sem nenhuma tinta, foram recolhidas no decorrer do tempo. Um total de 10 brancos foram amostrados para o período de 24 horas e 9 brancos na amostragem para o período de 300 horas. Os momentos de retirada dos brancos também são apresentados nas tabelas de planejamento amostral.

Tabela 11: Planejamento amostral para 24h de envelhecimento artificial.

Tempo de exposição (horas:minutos)	Número da amostra	Número sequencial do branco
00:00	1	1
00:10	2	-
00:20	3	-
00:30	4	-
00:40	5	-
00:50	6	-
01:00	7	2
01:20	8	-
01:40	9	-
02:00	10	3
02:30	11	-
03:00	12	4
03:30	13	-
04:00	14	-
04:30	15	-
05:00	16	5
05:30	17	-
06:00	18	-
06:30	19	-
07:00	20	6
08:00	21	-
09:00	22	7
10:00	23	-
11:00	24	8
12:00	25	-
14:00	26	9
16:00	27	-
18:00	28	-
20:00	29	-
22:00	30	-
24:00	31	10

Tabela 12: Planejamento amostral para 300h de envelhecimento artificial.

Tempo de exposição (horas)	Número da amostra	Número sequencial do branco
00	1	1
12	2	-
24	3	-
36	4	-
48	5	-
60	6	-
72	7	2
84	8	-
96	9	-
108	10	3
120	11	-
132	12	4
144	13	-
156	14	-
168	15	-
180	16	5
192	17	-
204	18	-
216	19	-
228	20	6
240	21	-
252	22	7
264	23	-
276	24	8
288	25	-
300	26	9

Após coletadas, todas amostras brutas foram mantidas em envelopes escuros, para evitar que o processo de degradação continuasse a ocorrer, até que fosse feita a preparação das amostras para análise no LC-MS/TOF. Cada envelope continha amostras de apenas uma caneta esferográfica, para evitar contaminação cruzada entre as amostras.

Um teste foi realizado com a finalidade de verificar a homogeneidade de degradação no interior da caixa de envelhecimento artificial. Nesse teste, a folha A4 que é colocada dentro da caixa de envelhecimento artificial foi dividida esquematicamente em cinco setores (Figura 29): superior direito, inferior direito, centro, superior esquerdo e inferior esquerdo. Esse teste

objetivou verificar se a posição do lançamento de tinta na folha A4 no interior da caixa de envelhecimento artificial influenciaria na taxa de degradação.

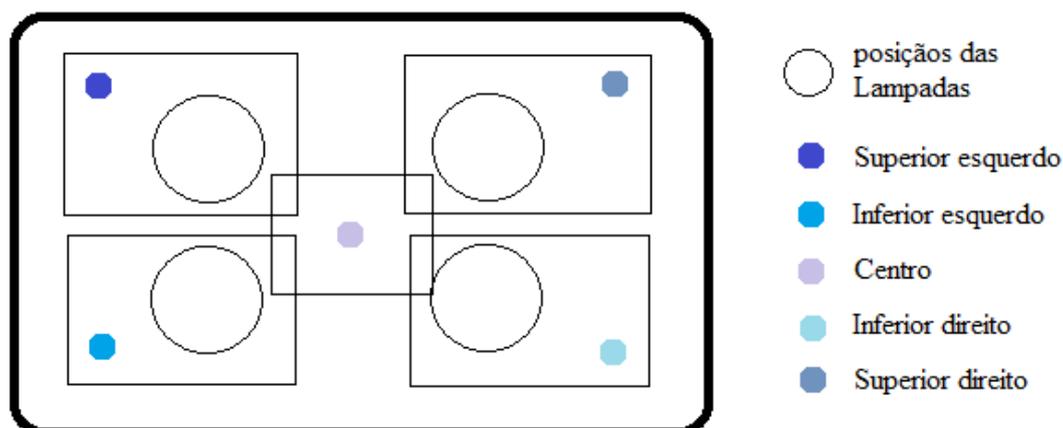


Figura 29: Esquema das posições dos lançamentos de tinta para o teste de homogeneidade no interior da câmara de envelhecimento artificial.

Usando uma caneta da marca Cis, dez amostras foram preparadas, sendo cinco delas usadas como referência para o momento inicial (sem degradação) e as outras cinco para serem degradadas por 12h na caixa de envelhecimento artificial. A caneta da marca Cis foi escolhida pela simplicidade de sua formulação que contém apenas o corante Cristal Violeta. Assim, foram analisados os picos de razão m/z 372, 358, 344, 330 e 316, correspondentes a série de degradação desse corante.

4.1.2 Preparo das amostras e obtenção dos dados

Inicialmente, foram realizados testes para o uso de cafeína como padrão interno. Para essa finalidade, soluções com 1 ppm e 5 ppm de cafeína foram testadas, porém os resultados mostraram indícios de supressão de íons, um efeito indesejável. O efeito de supressão de íons pode mascarar os íons a serem analisados, levando a resultados de baixa precisão e exatidão. Para evitar esse efeito, o uso de uma solução de formiato de sódio a 10mM em água destilada como calibrante externo foi testado. O emprego dessa solução mostrou-se muito conveniente, visto que é rotineiramente utilizada tanto na calibração diária do aparelho, como durante as corridas de cada amostra. Por essas razões e por eliminar o problema da supressão de íons, a calibração externa com solução de formiato de sódio foi utilizada no presente trabalho.

O preparo das amostras ocorreu como descrito na seção 3.1.2. Cada vial, de capacidade para 2 mL recebeu 2 confetes de amostra contendo a tinta de caneta esferográfica a ser estudada. Cada confete de diâmetro de 1,6 mm foi retirado do suporte de papel usando um perfurador tipo alicate e transferidos para os vials com auxílio de pinça. Adicionou-se ao vial 500µL de metanol (padrão HPLC), usando micropipeta (200 a 1000µL). Os vials contendo os confetes e metanol foram então submetidos a 30 segundos de agitação em Vortex para acelerar a extração do corante do papel. Esse processo foi previamente ilustrado na Figura 15. Todas as amostras correspondentes a este capítulo foram preparadas em duplicata.

As amostras preparadas foram analisadas usando o equipamento LC-MS/TOF do Instituto Nacional de Criminalística (INC), localizado na sede do departamento de polícia federal em Brasília. Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu Nexera XR®, para introduzir a amostra na fonte de ionização ESI. O espectrômetro utilizado foi o espectrômetro de massas Bruker Daltonics Impact II®.

O espectrômetro de massas utilizado é acoplado a um cromatógrafo líquido. Para esses experimentos, o LC foi usado apenas como método de introdução da amostra na fonte de ionização, pois como não há sobreposição de picos nos espectros de massas dos corantes analisados, não houve necessidade se utilizar colunas de separação.

Tabela 13: Parâmetros do equipamento: cromatografia líquida e espectrometria de massa.

Parâmetros do equipamento	
Volume de injeção	10 µL
Fluxo da bomba (LC)	0,35 mL/min
Fases móveis	20% B: 0,1% de HCOOH em H ₂ O 80% A: 0,1% de HCOOH em MeOH
Polaridade	Modo positivo
Coluna	Sem coluna
Temperatura do gás (ESI)	200 °C
Fluxo do gás de secagem (ESI)	11 L/min
Pressão de nebulização	2,8 Bar
Mass Range (mín.)	m/z 80
Mass Range (máx.)	m/z 1000

Foram utilizadas duas fases móveis, a fase A (aquosa) continha água (H₂O) / ácido fórmico (HCOOH) e a fase B (orgânica) continha metanol (MeOH) / ácido fórmico (HCOOH). Ambas fases móveis continham 0.1% de ácido fórmico.

Os principais parâmetros de cromatografia líquida e espectrometria de massas são listados na Tabela 13. O método utilizado foi desenvolvido em pesquisa anterior a este trabalho [34].

Com o intuito de assegurar o bom funcionamento do equipamento, sempre se realizava calibração do equipamento antes do início das análises, assim como também havia injeção de calibrante (solução de formiato de sódio em água miliQ a 10 mM) após a injeção de cada amostra.

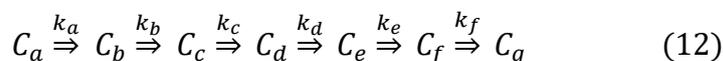
4.1.3 Análise dos dados

Assim como descrito no método ULT (seção 2.2.1), os dados de intensidade dos picos obtidos no espectrômetro de massas foram normalizados, dentro da série de degradação de cada corante, diminuindo assim a influência da quantidade de tinta extraída por amostra (*mass independence*).

A construção dos modelos cinéticos foi realizada com o auxílio da ferramenta *Solver* do programa Excel 2013®. O *Solver* realiza a otimização de uma função objetivo sujeita a restrições por intermédio de algoritmos numéricos pré-selecionados. No presente trabalho, a estimativa dos parâmetros cinéticos empregou o método numérico Gradiente Reduzido Generalizado (GRG) não linear que apresentou rápida convergência e resultados satisfatórios.

O emprego da ferramenta *Solver* do programa *Excel* da *Microsoft Office*® permite resolver numericamente as equações cinéticas encontrando como soluções o valor da ordem e da constante cinética de reação. No caso de simulações em que a ordem de reação é fixa (1^a ou 2^a ordem), somente o valor da constante cinética de reação é calculado.

A degradação do Violeta Cristal (C) será utilizada para ilustrar o método de estimativa de parâmetros empregado. Esse processo de degradação pode ser representado por uma sequência de reações em série:



Onde: C_a = corante Violeta Cristal (C); C_b = produto de degradação após a perda de uma metila; C_c = produto de degradação após a perda de duas metilas, C_g = produto de degradação após a perda de seis metilas etc.

Onde: k_a, k_b, \dots, k_f = constantes cinéticas de degradação.

As equações químicas em (13) permitem realizar um balanço de massa de todas as espécies envolvidas:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[C_a]}{dt} = -k_a[C_a]^a \\ \frac{d[C_b]}{dt} = k_a[C_a]^a - k_b[C_b]^b \\ \dots \\ \frac{d[C_g]}{dt} = k_f[C_f]^f \end{array} \right. \quad (13)$$

Onde: t = tempo de degradação; $[C_a]$ = concentração calculada do corante Violeta Cristal (C); $[C_b]$ = concentração calculada do primeiro produto de degradação etc.

Esse sistema de equações diferenciais ordinárias pode então ser discretizado para integração numérica. O método de discretização escolhido foi diferenças finitas que resulta no seguinte sistema de equações algébricas:

$$\left\{ \begin{array}{l} [C_a(t + \Delta t)] = [C_a(t)] - k_a[C_a(t)]^a \Delta t \\ [C_b(t + \Delta t)] = [C_b(t)] + \{k_a[C_a(t)]^a - k_b[C_b(t)]^b\} \Delta t \\ \dots \\ [C_g(t + \Delta t)] = [C_g(t)] + k_f[C_f(t)]^f \Delta t \end{array} \right. \quad (14)$$

Onde: Δt = passo de integração numérica no tempo.

A fim de encontrar os parâmetros cinéticos que melhor ajustem o sistema de equações (14) aos dados experimentais, é necessário minimizar funções-objetivo (S) que, neste trabalho, têm a forma de somas de erros quadráticos. Visto que (14) se trata de um sistema em que a dependência das concentrações ocorre de maneira sucessiva de uma equação a outra, optou-se por uma otimização sequencial das seguintes funções-objetivo:

$$\begin{cases} S_a = \sum_t \{[C_{a,exp}(t)] - [C_a(t)]\}^2 \\ S_b = \sum_t \{[C_{b,exp}(t)] - [C_b(t)]\}^2 \\ \dots \\ S_g = \sum_t \{[C_{g,exp}(t)] - [C_g(t)]\}^2 \end{cases} \quad (15)$$

Onde: S_a = função objetivo minimizada na determinação de k_a ; S_b = função objetivo minimizada na determinação de k_b etc. $[C_{a,exp}(t)]$ = concentração experimentalmente determinada do corante Violeta Cristal (C) no tempo de degradação t ; $[C_{b,exp}(t)]$ = concentração experimentalmente determinada do primeiro produto de degradação etc.

O método de estimativa de parâmetros a partir das curvas experimentais de degradação do Violeta Cristal é geral o suficiente para ser aplicado ao caso de outros corantes e formulações utilizados em tintas de caneta.

4.2 Resultados e discussão

A caracterização dos corantes foi obtida pela presença dos íons moleculares característicos descritos na Tabela 1. A Figura 30 mostra um exemplo de espectro de massa dos corantes da tinta de uma das canetas esferográficas azuis, da marca Cis, que foram examinadas. Nessa caneta observa-se a presença do íon molecular característico do corante Cristal Violeta (m/z 372) e alguns dos seus produtos de degradação (m/z 358 e 344). Os demais íons ali presentes (m/z 157 e 301) são provenientes da fase móvel e do papel que foram encontrados no branco. Os espectros do branco podem ser encontrados no apêndice 4.

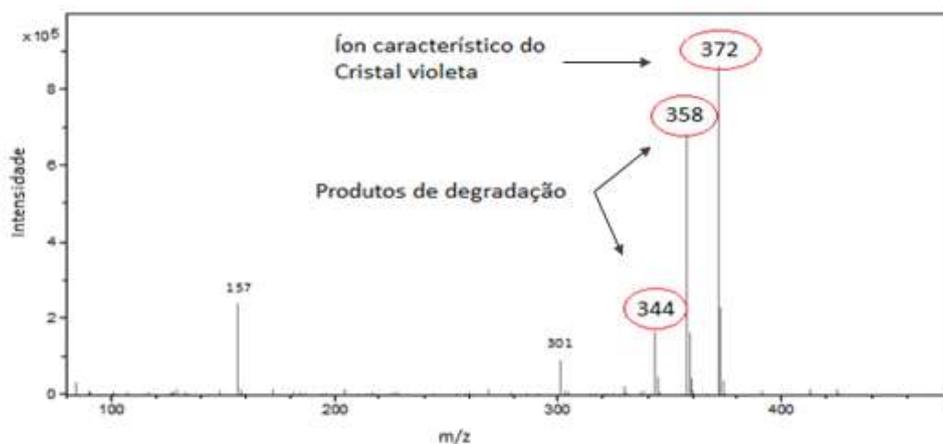


Figura 30: Espectro de massas obtido para a tinta da caneta esferográfica da marca Cis.

4.2.1 Teste de homogeneidade

As cinco amostras foram envelhecidas artificialmente por 12 horas e então analisadas. Os resultados das intensidades normalizadas são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14: Valores de intensidades normalizadas para o corante C na tinta da caneta esferográfica da marca Cis após 12h de degradação artificial.

Tempo(h)	Amostra - duplicata	m/z				
		372	358	344	330	316
12	Centro - A	0,355	0,415	0,178	0,044	0,007
12	Centro - B	0,358	0,406	0,184	0,045	0,007
12	Inferior direito - A	0,332	0,409	0,193	0,054	0,010
12	Inferior direito - B	0,328	0,402	0,203	0,057	0,010
12	Inferior esquerdo - B	0,342	0,413	0,187	0,045	0,008
12	Inferior esquerdo - A	0,366	0,407	0,179	0,042	0,006
12	Superior direito - A	0,339	0,411	0,189	0,051	0,009
12	Superior direito - B	0,350	0,407	0,188	0,047	0,007
12	Superior esquerdo - B	0,349	0,417	0,181	0,046	0,007
12	Superior esquerdo - A	0,358	0,405	0,185	0,045	0,007

Podemos perceber que os valores são parecidos entre si, e o Teste F foi feito para confirmar a semelhança entre os resultados obtidos. O valor de F crítico é 5,19 para o nível de confiança 95%. Os valores de F calculado para os dados das amostras envelhecidas artificialmente são mostrados na Tabela 15 e foram menores que o valor do F crítico, exceto para o pico m/z 330, que teve o valor de 6,35, um pouco acima (22%) do F crítico. Picos de menor intensidade como o de m/z 330 tendem a apresentar maior variabilidade o que pode explicar a diferença obtida.

De um modo geral, a partir dos resultados obtidos, as amostras envelhecidas por 12 horas podem ser consideradas equivalentes na degradação do corante Cristal Violeta, não importando o setor em que a tinta se encontra dentro da caixa. A degradação pode ser avaliada como uniforme e homogênea ao nível de 95 % de confiança.

Tabela 15: Teste-F para cada pico após 12 horas de degradação artificial.

m/z	$F_{calc_{4,5,0,05}}$	$F_{crit_{4,5,0,05}}$
372	2,89	5,19
358	0,22	5,19
344	4,20	5,19
330	6,35	5,19

4.2.2 Cinética do envelhecimento artificial

4.2.2.1 Curvas de degradação artificial do corante Cristal Violeta (C)

Para formulação GC, o corante Cristal Violeta (C) presente na tinta da caneta esferográfica da marca Bic (clássica) de coloração azul teve uma degradação lenta, que durou cerca de 300h. Os espectros de massas no instante inicial e final são apresentados na Figura 31. Pode-se observar que a intensidade relativa do pico do íon molecular correspondente ao Cristal Violeta (m/z 372) e de seu primeiro produto de degradação, Violeta de Metila 6B (m/z 358) diminuíram enquanto os picos dos íons moleculares referentes aos demais produtos de degradação (m/z 344 e 330) aparentemente aumentaram. Pode-se observar também que o íon com relação massa carga $m/z = 268$, originalmente atribuído à 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina não apresentou degradação significativa nas condições experimentais utilizadas. Esse resultado pode ser devido à presença de outras substâncias com relação $m/z = 268$ porém mais estáveis que a 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina [34] ou à presença de estabilizantes na composição dessa tinta.

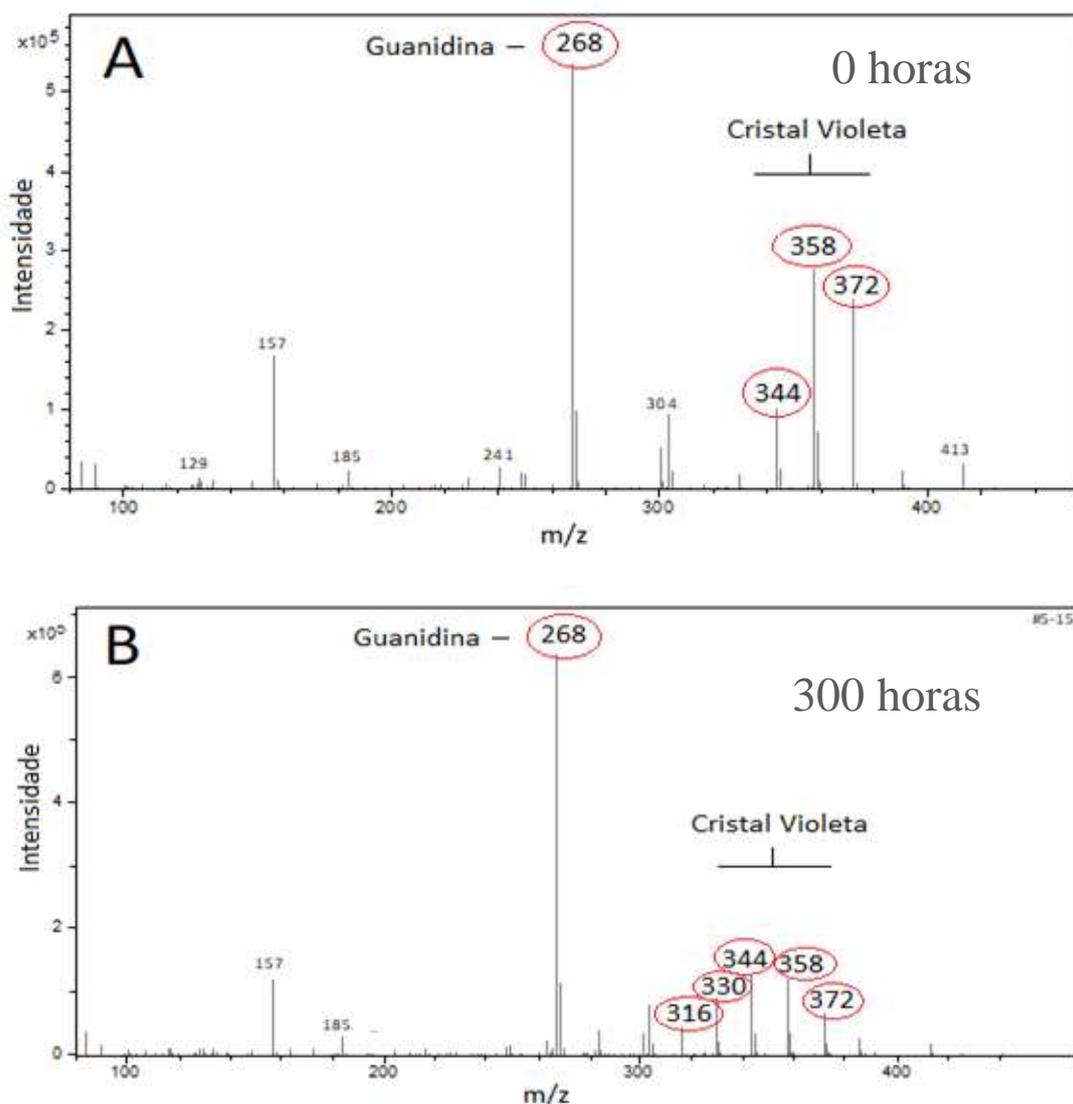


Figura 31: Espectros do envelhecimento da caneta Bic a) no instante inicial e b) após 300 horas de envelhecimento artificial.

O gráfico na Figura 32 ajuda a visualizar o processo de degradação dos corantes da tinta da caneta Bic (clássica), no qual se observa a progressiva diminuição da abundância do íon molecular correspondente ao Cristal Violeta (m/z 372) e seu primeiro produto de degradação (m/z 358), caindo de aproximadamente 0,38 para 0,13 e 0,42 para 0,27 respectivamente. É interessante observar que essa caneta já apresentava em seu estado inicial apenas 38% do íon molecular m/z 372 e já 42% do primeiro pico de degradação m/z 358, evidenciando que o corante já apresentava uma degradação considerável no tempo inicial. Em contrapartida, nos íons referentes aos produtos de degradação (m/z 344, 330 e 316 respectivamente) foi observado aumento na abundância relativa. A área do pico referente ao

íon do corante Guanidina se manteve constante em 100% no decorrer do tempo, não havendo degradação observada. A degradação na tinta caneta esferográfica Bic Cristal de coloração azul ocorreu de maneira similar ao da Bic clássica, possivelmente por serem da mesma marca e formulação, mudando apenas a linha de fabricação.

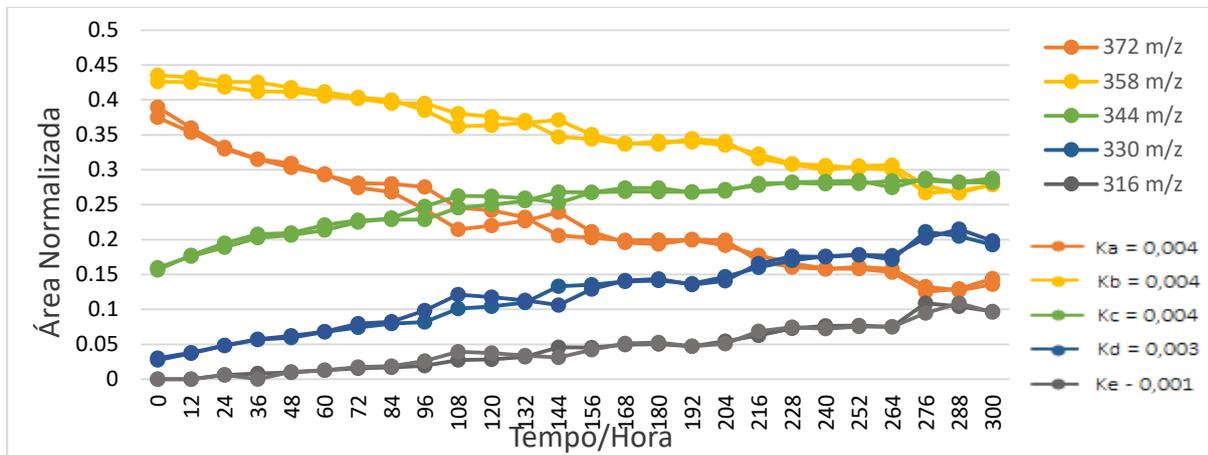


Figura 32: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Bic Clássica. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

A tinta da caneta esferográfica da marca Cis de coloração azul, que contém apenas o corante Cristal Violeta (C), sofreu degradação em 24 horas, e o resultado é mostrado no gráfico da Figura 33. A abundância do pico referente ao íon molecular do Cristal Violeta (m/z 372) diminuiu enquanto os íons referentes a todos os seus produtos de degradação (m/z 358, 344, 330 e 316) se mantiveram ou aumentaram.

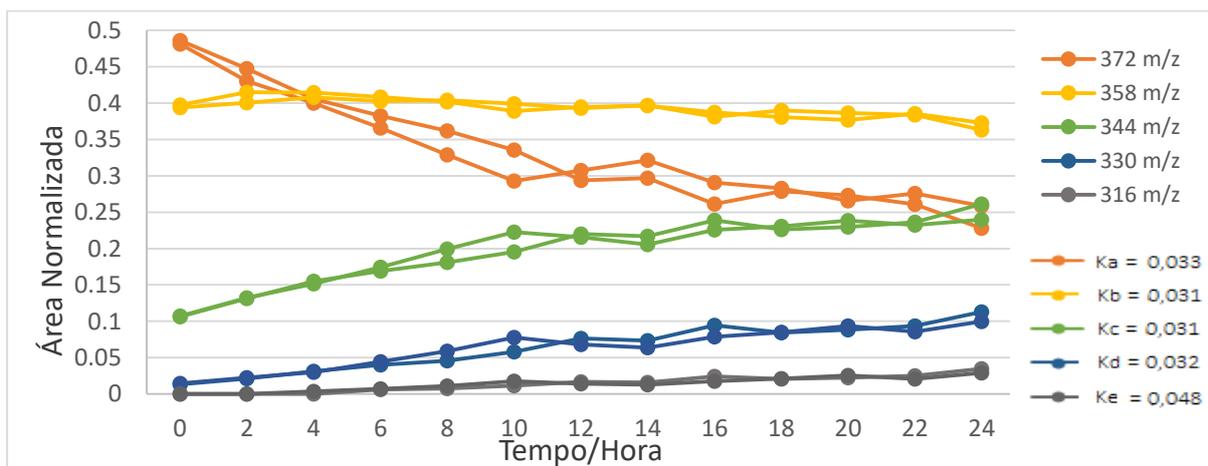


Figura 33: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Cis. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

A Figura 34 mostra a degradação do corante Cristal violeta (C) na caneta esferográfica Compactor, de formulação CV. Nessa tinta, a abundância do pico referente ao íon molecular do Cristal Violeta (m/z 372) diminuiu de maneira mais acentuada do que a abundância do pico do primeiro produto de degradação (m/z 358), que também diminuiu. Os demais produtos de degradação mostraram aumento na abundância relativa.

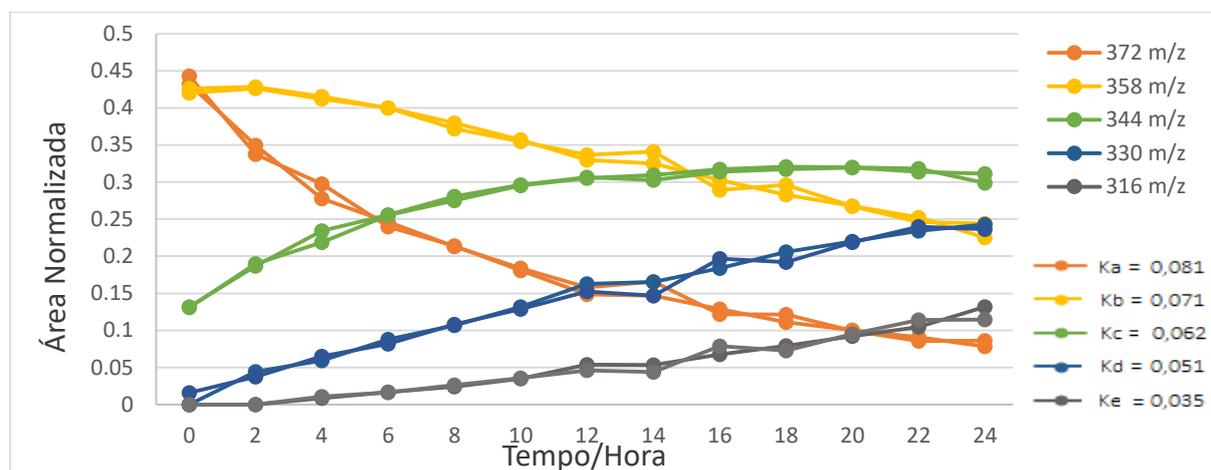


Figura 34: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Compactor. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

As duas últimas canetas esferográficas analisadas foram de coloração preta. A degradação do corante Cristal Violeta (C) na tinta da caneta Acrilex, de formulação CV é representada na Figura 35, e apresentou uma diminuição acentuada da abundância do pico do íon m/z 372 e uma diminuição menos drástica na área normalizada relativa ao primeiro produto de degradação (m/z 358). Os demais produtos de degradação tiveram aumento de abundância, porém de maneira menos acentuada que na tinta da caneta Compactor de coloração azul.

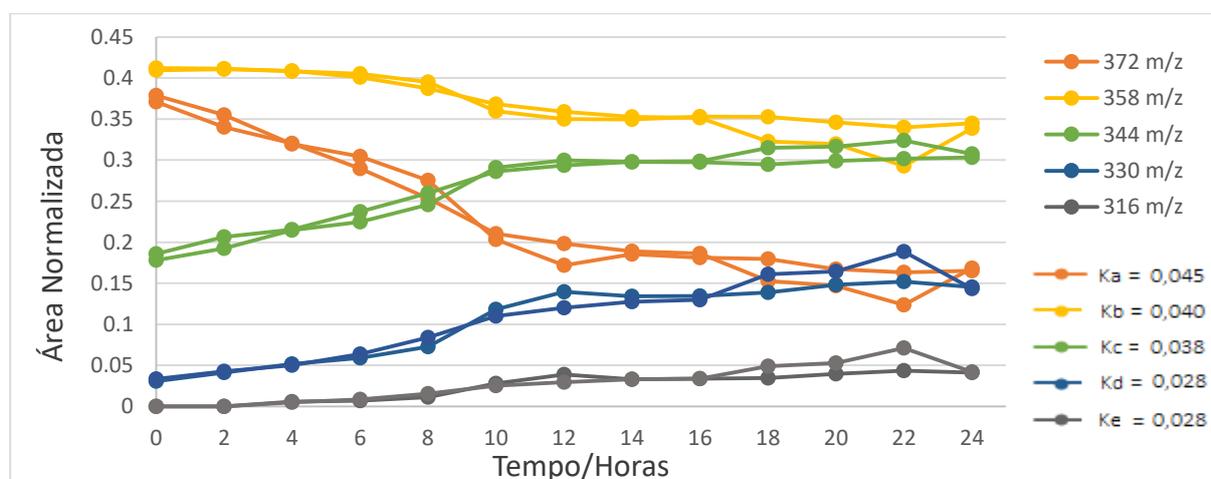


Figura 35: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Acrilex. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

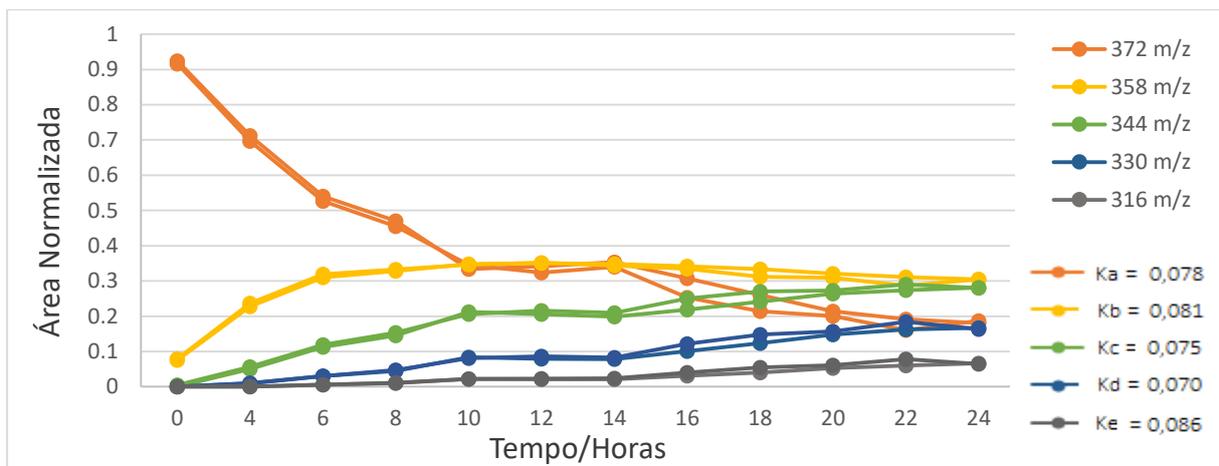


Figura 36: Degradação do corante Cristal Violeta (C) na caneta Bic Preta. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

A degradação do corante Cristal Violeta (C) da tinta da caneta esferográfica da marca Bic de coloração preta mostrou-se diferenciada em relação às outras amostras. Nessa tinta, que contém apenas o corante C em sua formulação, a abundância do íon molecular 372 apresentou valor no estágio inicial (0 horas) muito maior que nas demais amostras como mostrado na Figura 36.

A degradação do corante Cristal Violeta (C) para a caneta Bic Cristal, Molin e Pilot são encontradas no Apêndice 5.

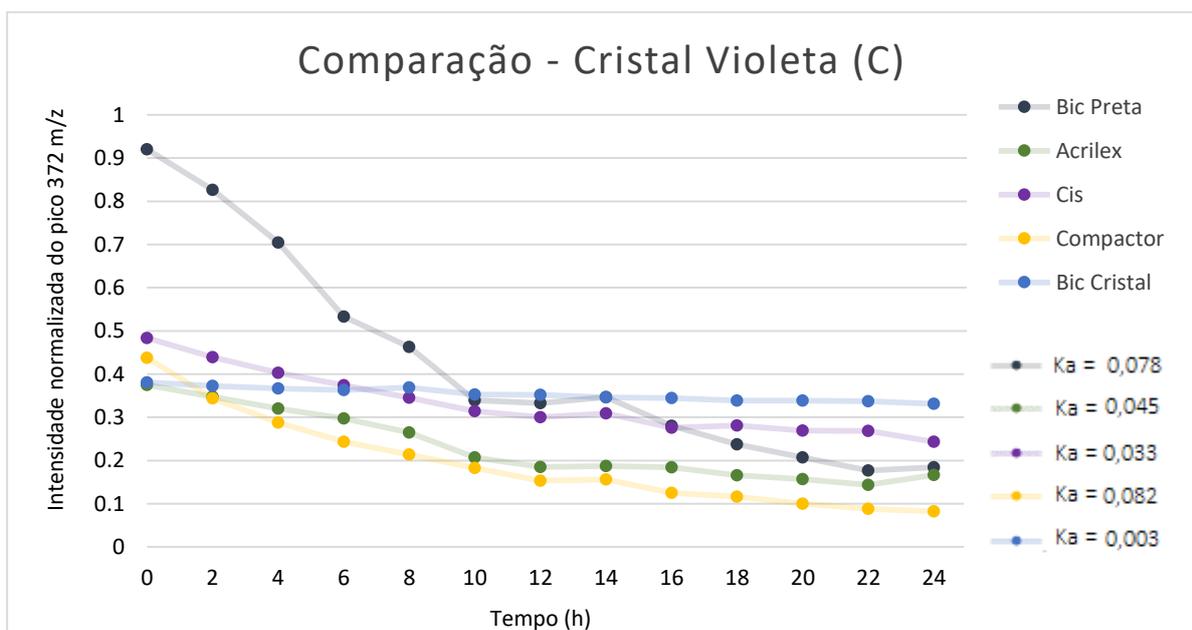


Figura 37: Comparação das intensidades do íon molecular característico (m/z 372) do Cristal Violeta em 5 canetas esferográficas diferentes por 24 horas.

Ao plotar a variação da intensidade normalizada do pico referente ao Cristal Violeta (m/z 372) de diferentes tintas de canetas por 24 horas em um mesmo gráfico da Figura 37, pode-se perceber que esse corante se degrada em diferentes velocidades para cada caneta esferográfica. A degradação do corante Cristal Violeta (C) na tinta da caneta Bic preta ocorre de maneira muito mais acentuada que as demais, enquanto que para a tinta da caneta Bic Cristal é a que ocorre de maneira mais lenta.

Esses resultados indicam que a composição inicial da tinta da caneta esferográfica influencia na degradação do corante Cristal Violeta. No caso da Bic Cristal, como o corante Guanidina se manteve sem degradar por todo o período do experimento e o corante Cristal violeta teve menor velocidade de degradação, acredita-se que possam ter sido adicionados aditivos estabilizantes em sua formulação.

4.2.2.2 Curvas de degradação artificial do corante Victoria Blue B (V)

A caneta Acrilex, de coloração preta, tem em sua formulação Cristal Violeta e Victoria Blue B (CV). Ao analisar o corante Victoria Blue B (V), no decorrer de 24 horas, a abundância do pico m/z 470, referente ao íon molecular, diminuiu e a de seu primeiro pico de degradação (m/z 456) aumentou, como mostrado no gráfico da Figura 38. Nesse caso, o valor da abundância do pico m/z 456 não superou o valor do pico m/z 470.

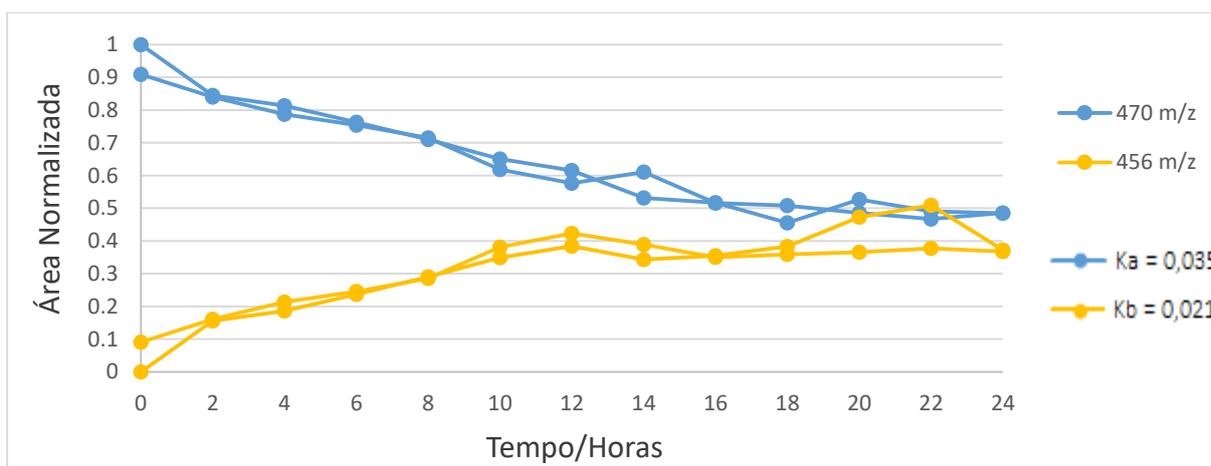


Figura 38: Degradação do corante Victoria Blue B (V) na caneta Acrilex. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

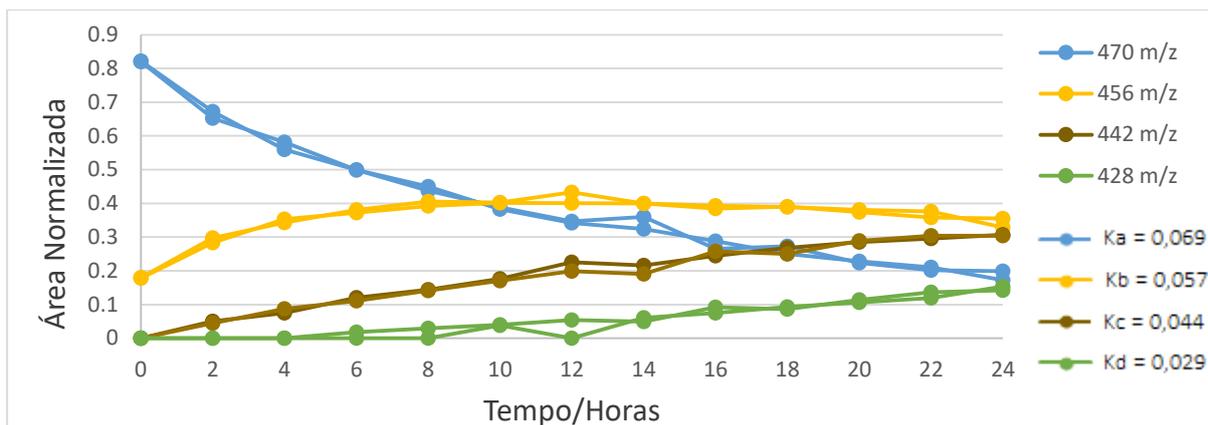


Figura 39: Degradação do corante Victoria Blue B (V) na caneta Compactor. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

A tinta da caneta Compactor, de coloração azul e formulação CV, também contém o corante Victoria Blue B. Assim como na caneta Acrilex, a intensidade relativa do pico m/z 470 diminuiu e a do pico m/z 456 aumentou no período de 24 horas. Porém, diferentemente do ocorrido na tinta da Acrilex, a abundância do pico m/z 456 superou a do pico m/z 470 após 10 horas de degradação forçada, conforme ilustrado na Figura 39. Além disso, outros dois produtos de degradação foram observados.

A diminuição da intensidade relativa do pico m/z 470 e o aumento da intensidade relativa do pico m/z 456 também foi observado na degradação do corante Victoria Blue B (V) na tinta da caneta Molin (formulação CV). Nessa amostra, a degradação mostrou-se similar à da caneta Compactor, onde a abundância do pico m/z 456 superou a do pico m/z 470 após aproximadamente 10 horas de envelhecimento forçado, como mostra a Figura 40.

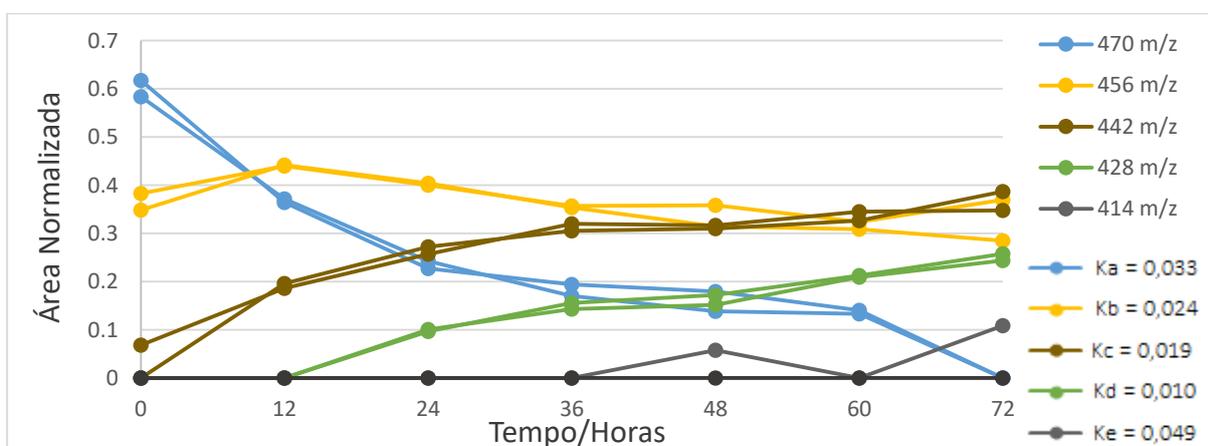


Figura 40: Degradação do corante Victoria Blue B (V) na caneta Molin. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

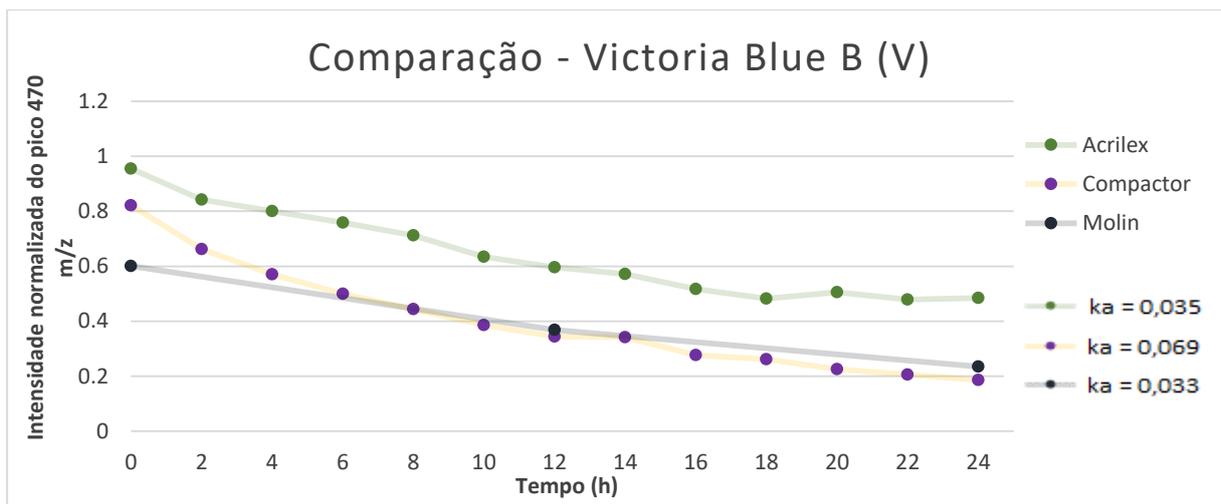


Figura 41: Comparação das intensidades do íon molecular característico (m/z 470) do Victoria Blue B em 3 canetas esferográficas por 24 horas.

O gráfico da Figura 41 mostra o decaimento da intensidade relativa do pico 470 m/z para as amostras e pode-se observar que na caneta Acrilex e Molin a velocidade de degradação são mais similares, enquanto para a caneta Compactor o decaimento é levemente mais acentuado que as canetas Acrilex e Molin, mostrando que para esse corante a velocidade de degradação também variou dependendo da marca de caneta estudada.

4.2.2.3 Curvas de degradação artificial do corante Basic Blue 7 (B)

A caneta da marca Pilot foi a única caneta analisada que continha em sua composição o corante Basic Blue 7 (B). Essa caneta, de coloração azul e formulação CB, foi envelhecida artificialmente por 300 horas. O corante Basic Blue, em sua degradação, perde grupamentos etila ($-C_2H_5$) diferentemente dos corantes anteriores, que perdiam grupamentos metila ($-CH_3$). A intensidade relativa do pico m/z 478, referente ao Basic Blue sem degradar, diminuiu com o decorrer do tempo e as intensidades relativas dos picos m/z 450 e 422, referentes aos produtos de degradação aumentaram, como mostra a Figura 42. Apesar do tempo total de degradação artificial ter sido de 300 horas, observou-se que, após um período de 204 horas, a repetitividade dos resultados ficou prejudicada, provavelmente devido a uma degradação mais intensa e não controlada nos estágios finais de exposição à luz e ao calor.

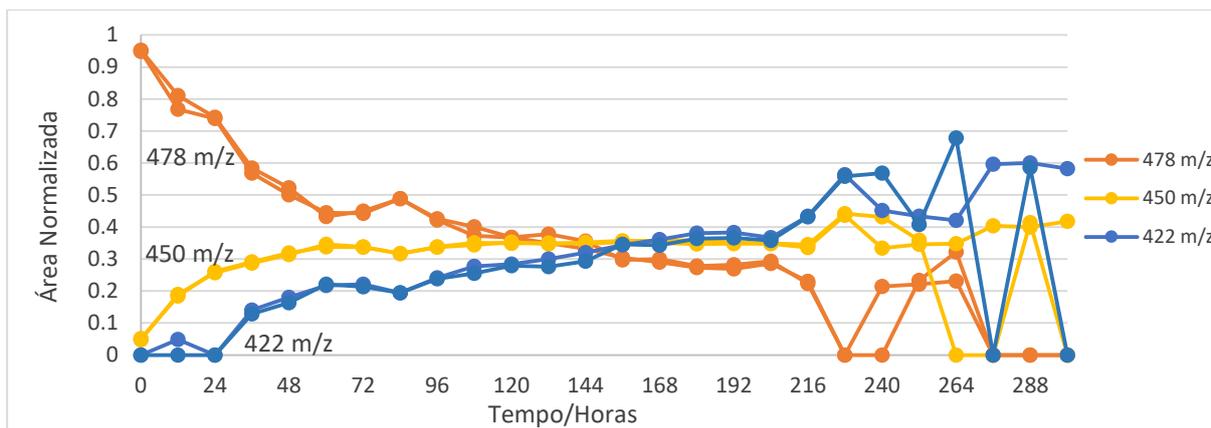


Figura 42: Degradação do corante Basic Blue 7 (B) na caneta Pilot. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

4.2.2.4 Constante cinética e ordem de reação para o corante Cristal Violeta (C)

Na literatura foi reportado que o corante Cristal Violeta degrada seguindo uma ordem de reação aparente de primeira ordem [24, 27]. Para contribuir com a afirmação encontrada, a ferramenta *Solver* do programa *Excel* da *Microsoft Office*® foi utilizada para testar qual ordem de reação apresenta melhor ajuste nessa degradação.

Nas simulações em que tanto a ordem de reação quanto a constante cinética foram otimizadas simultaneamente, bons ajustes das curvas de degradação foram obtidos (resultados não apresentados). No entanto, devido à alta correlação existente entre esses parâmetros, ordens de reação sem muito significado experimental (ordens de reação >2) são obtidas. Assim sendo, optou-se por fixar a ordem de reação como primeira ou segunda ordem, a fim de avaliar a adequação dos modelos cinéticos resultantes. Os valores calculados foram comparados com os valores experimentais utilizando ANOVA e os valores de R^2 são mostrados na Tabela 16. O valor de R^2 representa o quão bem o resultado calculado se ajusta ao experimental.

Nas 7 primeiras canetas estudadas, a equação de cinética de primeira ordem alcançou melhores resultados de ajuste do que a equação cinética de segunda ordem. A equação cinética de primeira ordem teve melhor resultado na caneta da marca Bic, de coloração preta, na qual todos os resultados da ANOVA indicam melhor ajuste em primeira ordem. No caso das canetas esferográficas Molin e Pilot, pode-se argumentar uma leve superioridade para o valor de R^2 do modelo de segunda ordem em relação ao de primeira ordem.

Tabela 16: Valores do R² para os ajustes de curvas cinéticas considerando primeira e segunda ordem de reação.

		372	358	344	330	316
<i>Acrilex (CV)</i>	1 ordem	0,94	0,82	0,94	0,89	0,82
	2 ordem	0,93	0,83	0,92	0,91	0,76
<i>Bic Preta (C)</i>	1 ordem	0,98	0,94	0,96	0,94	0,92
	2 ordem	0,94	0,70	0,96	0,91	0,77
<i>Cis (C)</i>	1 ordem	0,92	0,77	0,92	0,90	0,89
	2 ordem	0,95	0,75	0,96	0,89	0,83
<i>Compactor (CV)</i>	1 ordem	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97
	2 ordem	0,99	0,97	0,87	0,96	0,91
<i>Bic (GC)</i>	1 ordem	0,97	0,98	0,98	0,98	0,96
	2 ordem	0,97	0,97	0,85	0,96	0,90
<i>Bic Cristal (GC)</i>	1 ordem	0,89	0,94	0,91	0,91	0,91
	2 ordem	0,93	0,91	0,93	0,91	0,86
<i>Molin (CV)</i>	1 ordem	0,95	0,93	0,90	0,94	0,91
	2 ordem	0,98	0,98	0,78	0,94	0,87
<i>Pilot (CB)</i>	1 ordem	0,89	0,75	0,81	0,72	0,46
	2 ordem	0,93	0,86	0,82	0,82	0,43

Para auxiliar na escolha da ordem da reação, foram comparados os gráficos de $\ln[A]$ vs tempo e $[A]^{-1}$ vs tempo. Sabe-se que, quando a ordem correta de reação é escolhida o resultado desses gráficos apresenta uma tendência linear. Segundo esse princípio, as reações de primeira ordem resultam em gráficos lineares de $\ln[A]$ vs tempo, enquanto que reações de segunda ordem resultam em gráficos lineares de $[A]^{-1}$ vs tempo. Os gráficos com essa comparação são mostrados na Figura 43 a seguir, os quais demonstram que a relação $\ln[A]$ vs tempo apresenta uma tendência linear para a maioria das formulações, reforçando a hipótese de que a reação cinética da degradação do Cristal Violeta segue uma equação de primeira ordem.

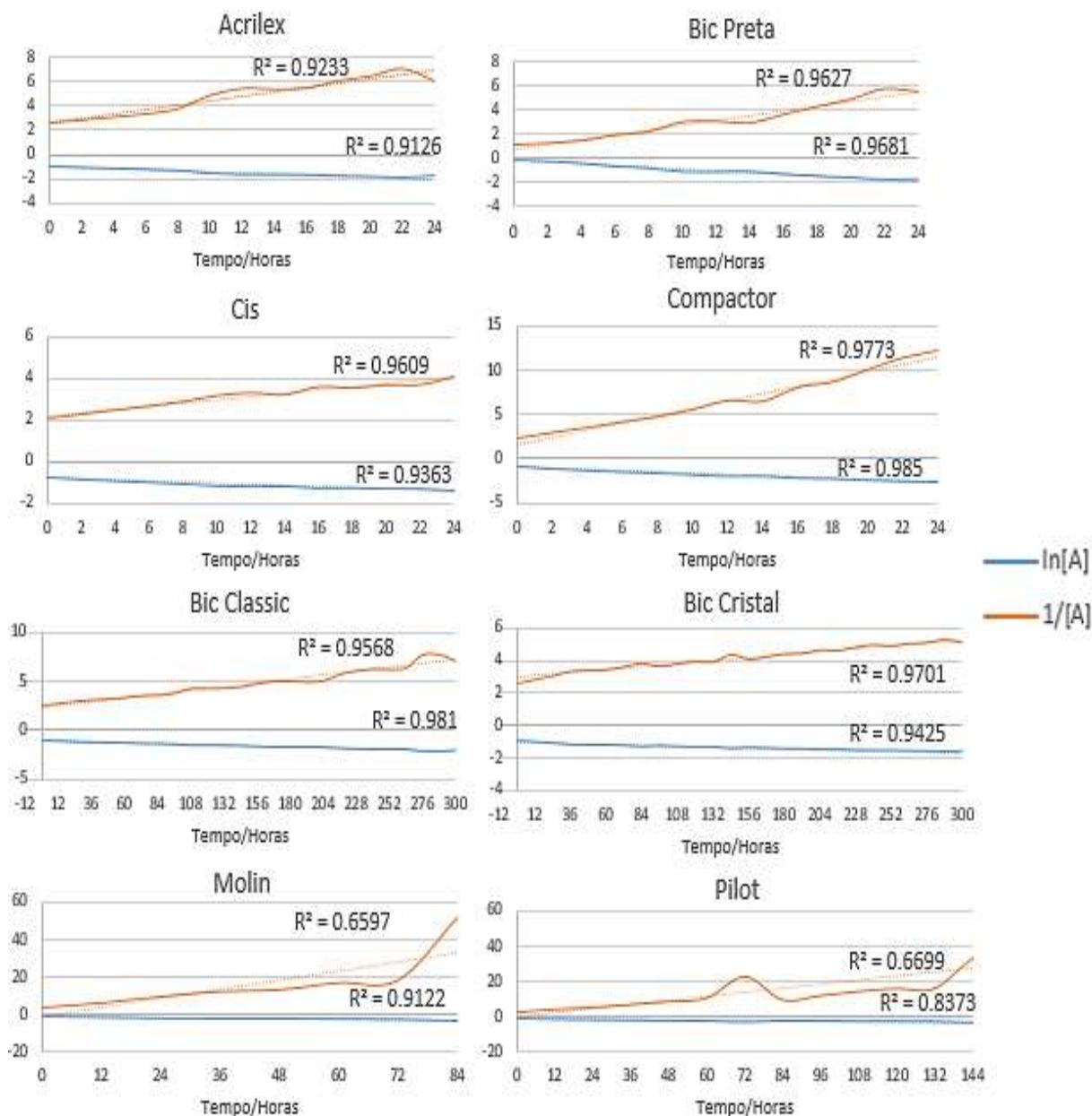


Figura 43: Gráficos de $\ln[A]$ e $1/[A]$ vs o tempo para todas as canetas estudadas.

Assumindo então, que a degradação do corante Cristal Violeta é de fato de primeira ordem, a Tabela 17 lista as constantes cinéticas encontradas pela ferramenta *Solver*. A constante k_a representa o íon 372 m/z, k_b o íon 358m/z, k_c o íon 344 m/z, k_d o íon 330 m/z e k_e o íon m/z 316. Em geral, o valor das constantes cinéticas diminui com o decorrer da reação, o que é justificável por um processo de demetilação progressivamente mais difícil.

Tabela 17: Valores das constantes cinéticas para reação de primeira ordem na degradação do corante Cristal Violeta.

Constantes (Horas ⁻¹)	Acrilex	Bic Preta	Cis	Compactor	Bic	Bic Cristal	Molin	Pilot
k_a (m/z 372)	0,045	0,078	0,033	0,082	0,004	0,003	0,035	0,023
k_b (m/z 358)	0,0401	0,081	0,031	0,071	0,004	0,003	0,031	0,018
k_c (m/z 344)	0,034	0,075	0,031	0,062	0,004	0,003	0,028	0,015
k_d (m/z 330)	0,029	0,070	0,032	0,051	0,003	0,002	0,023	0,013
k_e (m/z 316)	0,028	0,086	0,048	0,035	0,001	0,003	0,015	0,012

Os dados de degradação foram plotados a fim de comparar os valores de intensidade dos íons característicos do Cristal Violeta obtidos experimentalmente com os estimados usando a ferramenta *Solver*, e são apresentados nas Figuras 44 a 51 a seguir.

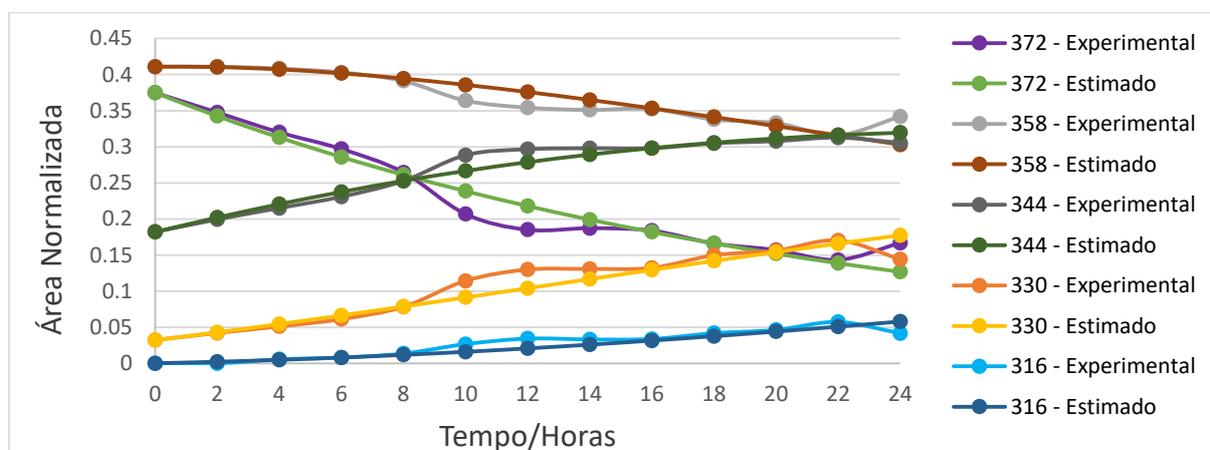


Figura 44: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esfográfica Acrilex.

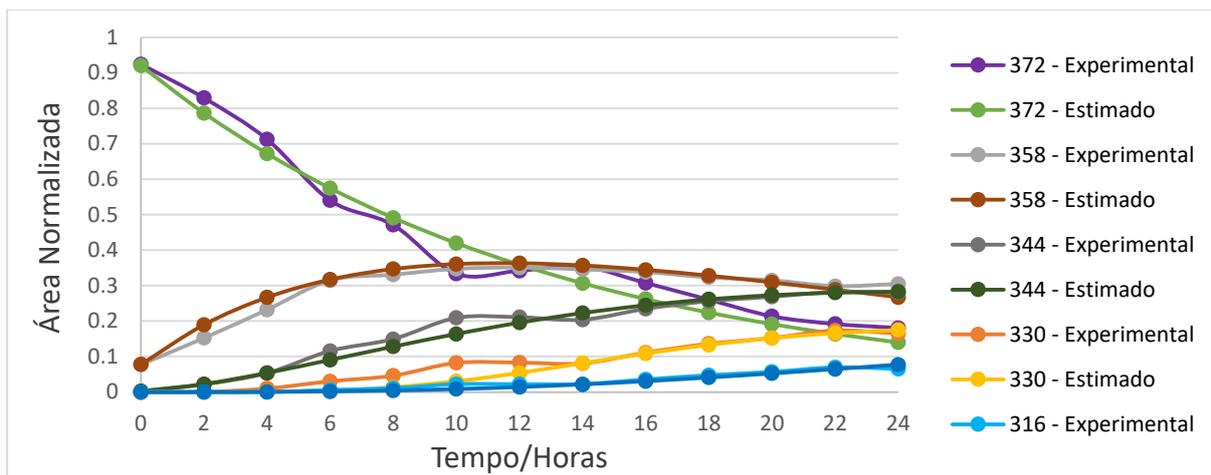


Figura 45: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Bic Preta.

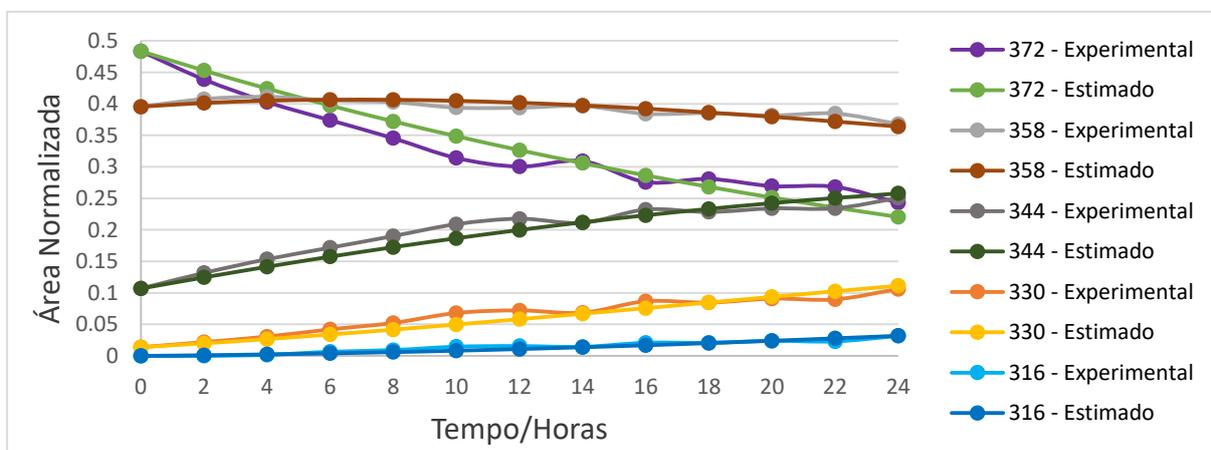


Figura 46: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Cis.

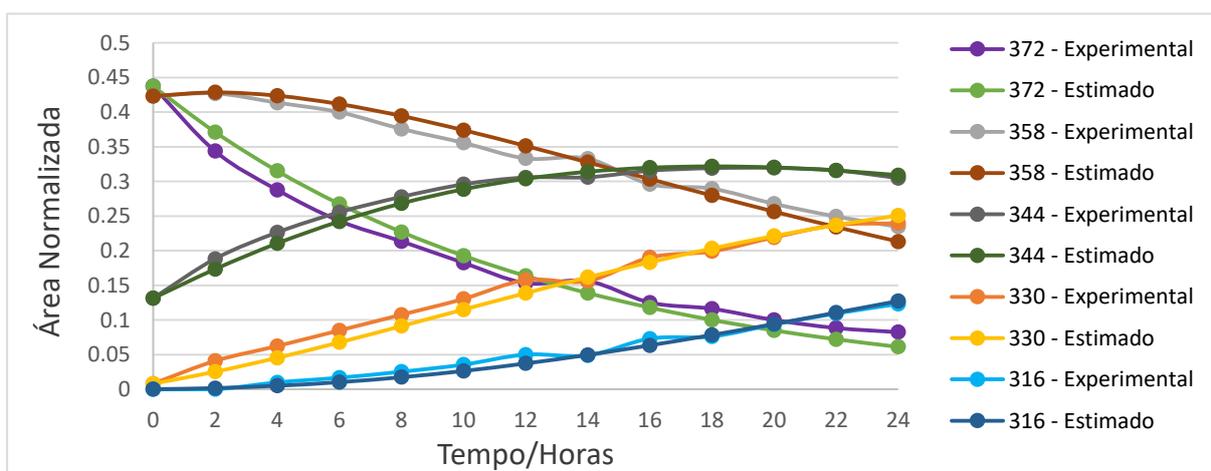


Figura 47: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Compactor.

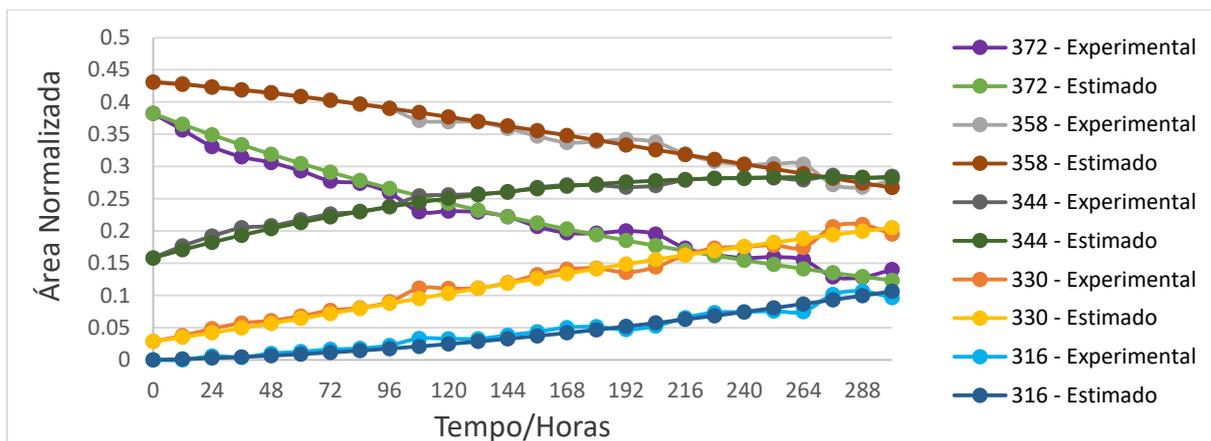


Figura 48: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Bic.

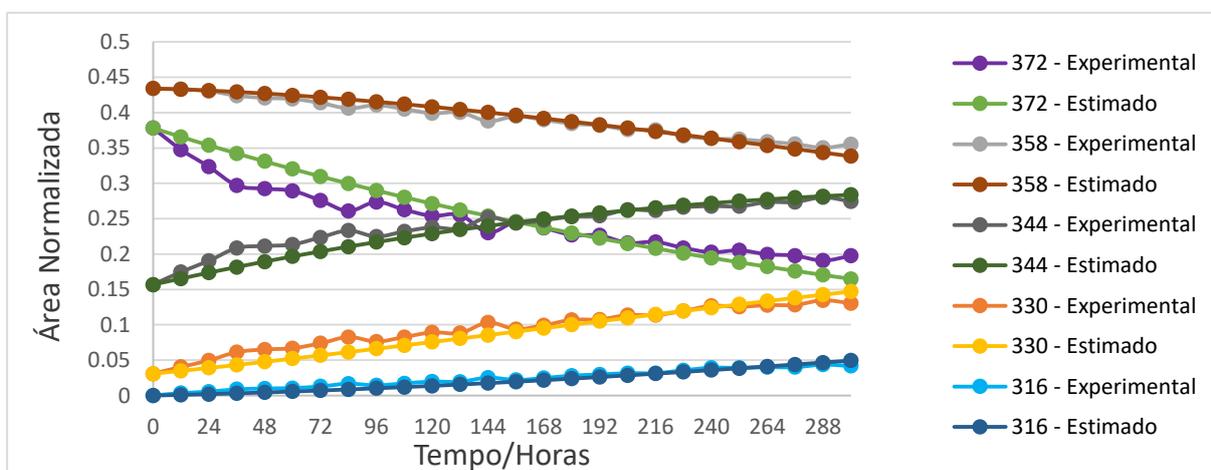


Figura 49: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Bic Cristal.

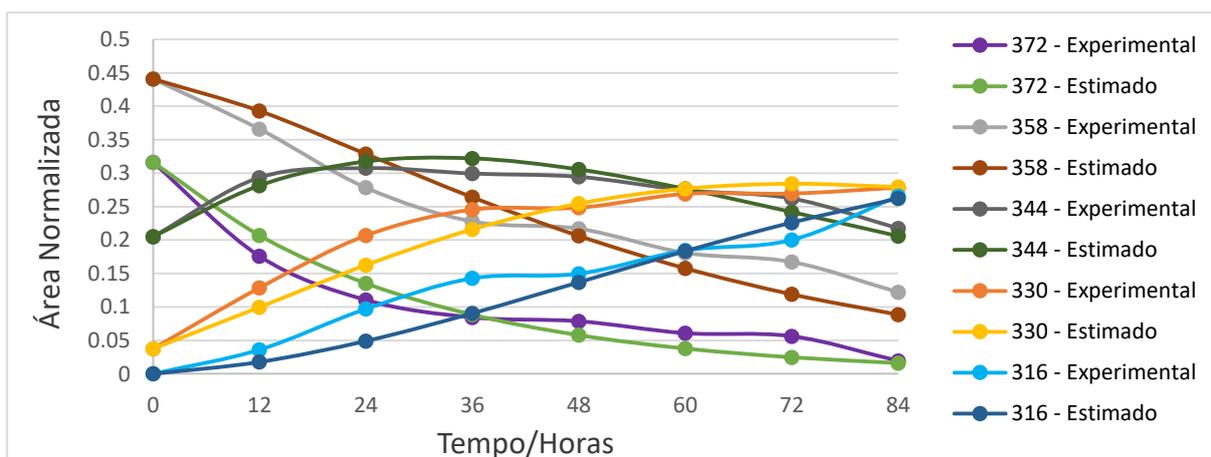


Figura 50: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Molin.

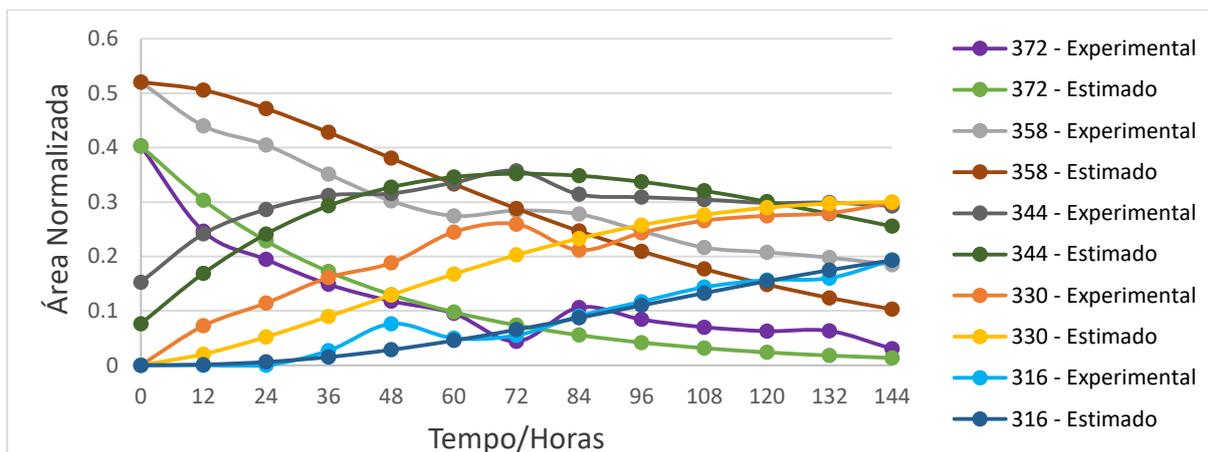


Figura 51: Comparação das curvas cinéticas experimentais e estimadas para o íon molecular do Cristal Violeta e seus diferentes produtos de degradação para a caneta esferográfica Pilot.

Com os dados apresentados, pode-se perceber que a velocidade da degradação depende da tinta de caneta esferográfica envolvida. Isso ocorre mesmo para tintas que possuem os mesmos corantes em sua formulação, ou até mesmo para aquelas da mesma marca, mas de linhas diferentes. Esses resultados indicam que a composição inicial da tinta da caneta interfere na taxa de degradação do corante Cristal Violeta.

O mesmo procedimento foi realizado para os outros corantes, e os valores das constantes que foram encontrados são apresentados nas tabelas de curva de degradação das canetas esferográficas estudadas. Assim como para o corante Cristal Violeta, as constantes foram estimadas assumindo reação de primeira ordem.

4.2.3 Cinética da degradação natural

Os dados de degradação natural obtidos com os dados de Karina F. F. Costa [34] foram plotados seguindo o mesmo raciocínio utilizado na degradação artificial. Era esperado que, para amostras produzidas em anos mais antigos, os corantes presentes nos lançamentos de tinta de caneta esferográfica estivessem mais degradados. Isso seria perceptível experimentalmente pela diminuição da intensidade do íon molecular do corante e pelo correspondente aumento das intensidades dos íons de seus produtos de degradação. O oposto seria verificado para lançamentos mais recentes.

Os gráficos das Figuras 52 a 57 mostram a variação das áreas normalizadas (abundâncias relativas) como função das datas de produção dos documentos submetidos a degradação natural, para cada formulação estudada. Em nenhum dos casos foi possível estabelecer um padrão de degradação conforme o esperado: é possível encontrar lançamentos antigos com pouca degradação e lançamentos recentes com elevado teor de produtos de degradação.

Por exemplo, um valor alto em torno de 80% para abundância do íon molecular (m/z 372) referente ao corante Cristal Violeta foi observado em vários documentos mais antigos como nos de 1962 a 1970 (Figura 52), de 1964 a 1972 (Figura 54), de 1966 (Figura 55), 1962 (Figura 56) e de 1962 a 1964 (Figura 57). Isso indica que a formulação e a composição inicial das tintas de caneta esferográfica tem mudado ao longo dos anos.

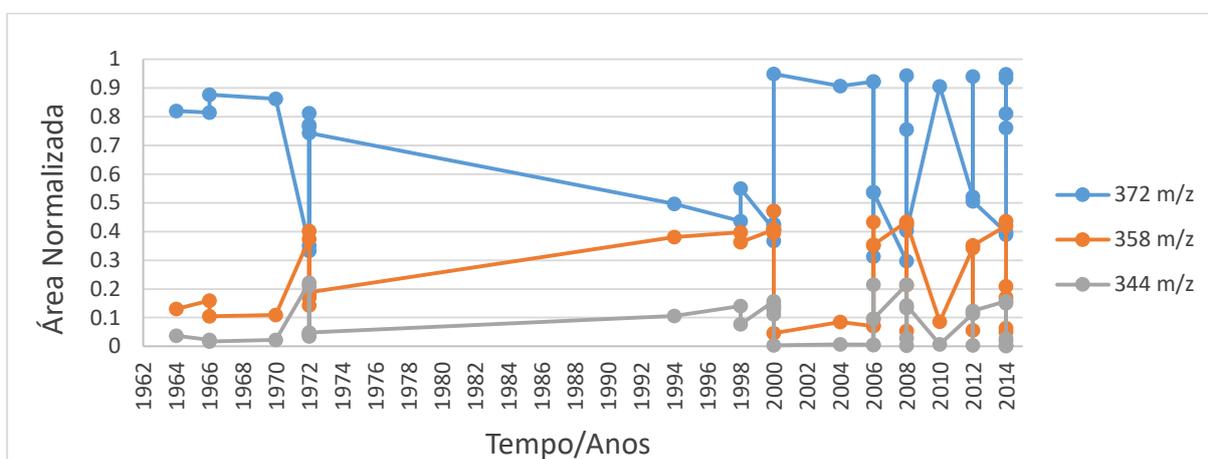


Figura 52: Degradação do corante Cristal Violeta (C) de lançamentos de tinta de caneta contendo apenas o corante Cristal Violeta (C) em sua formulação.

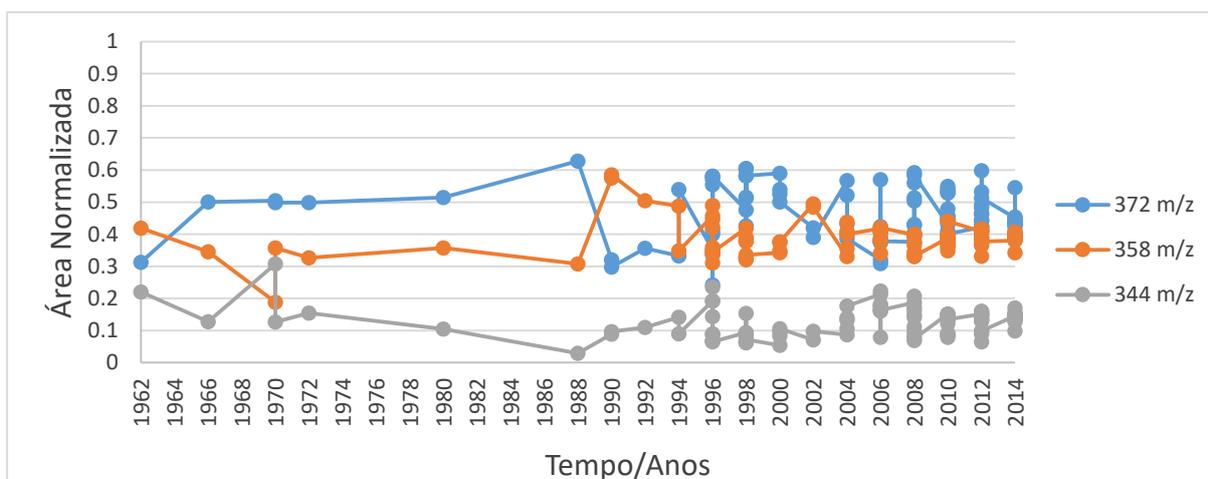


Figura 53: Degradação do corante Cristal Violeta (C) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Victoria Blue B (CV) em sua formulação.

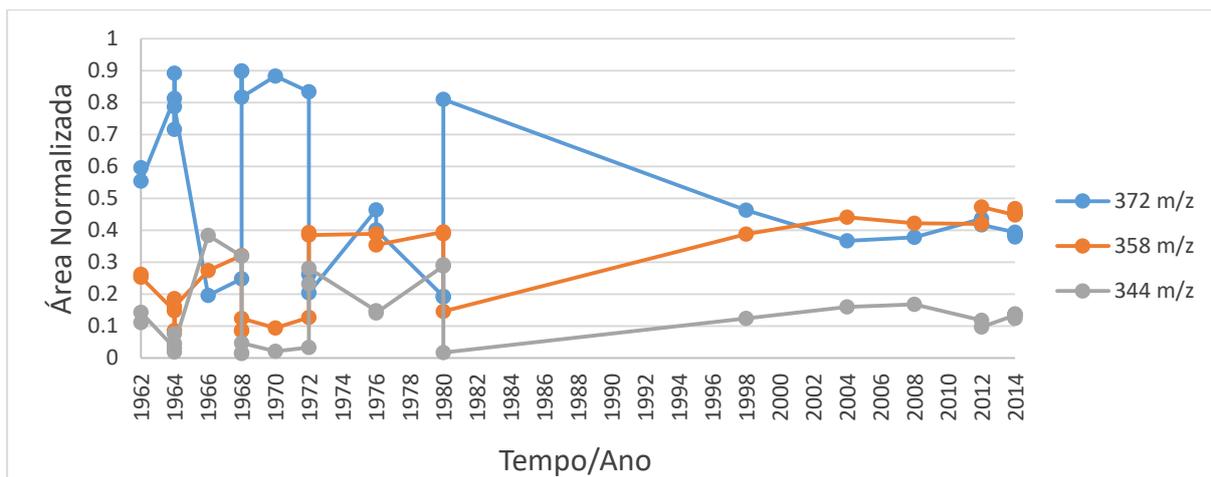


Figura 54: Degradação do corante Cristal Violeta (C) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Basic Blue 7 (CB) em sua formulação.

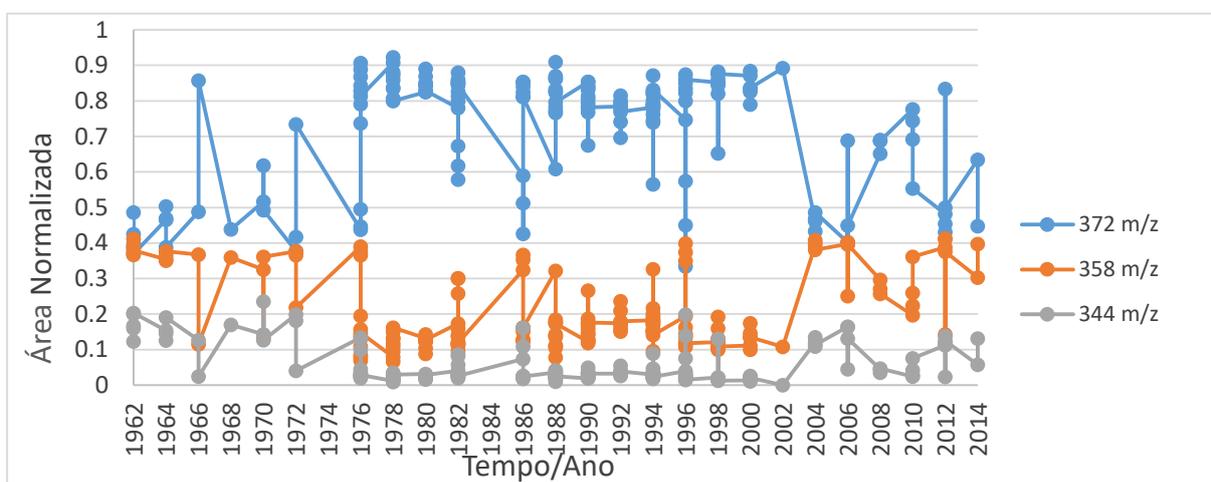


Figura 55: Degradação do corante Cristal Violeta (C) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Guanidina (GC) em sua formulação.

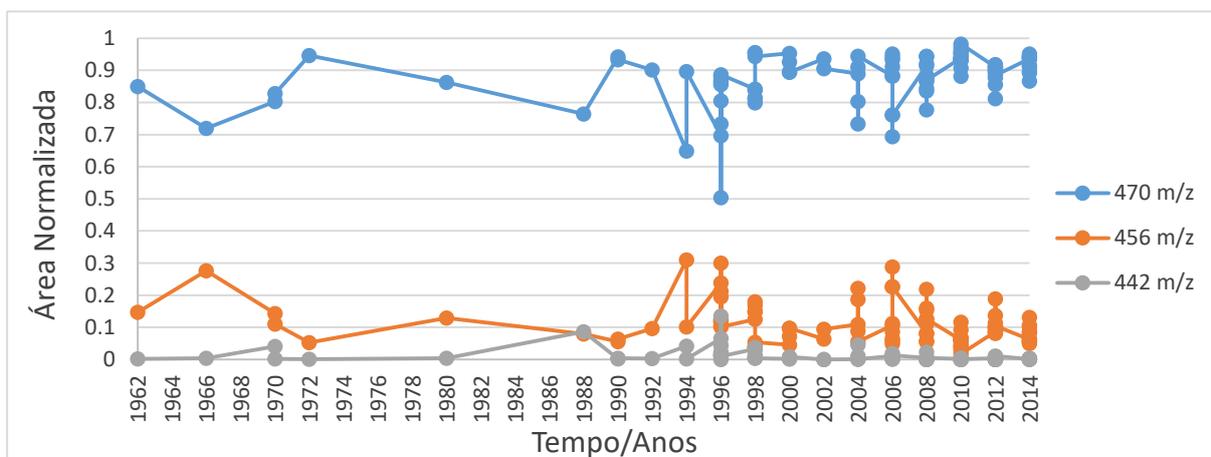


Figura 56: Degradação do corante Victoria Blue B (V) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Victoria Blue B (CV) em sua formulação.

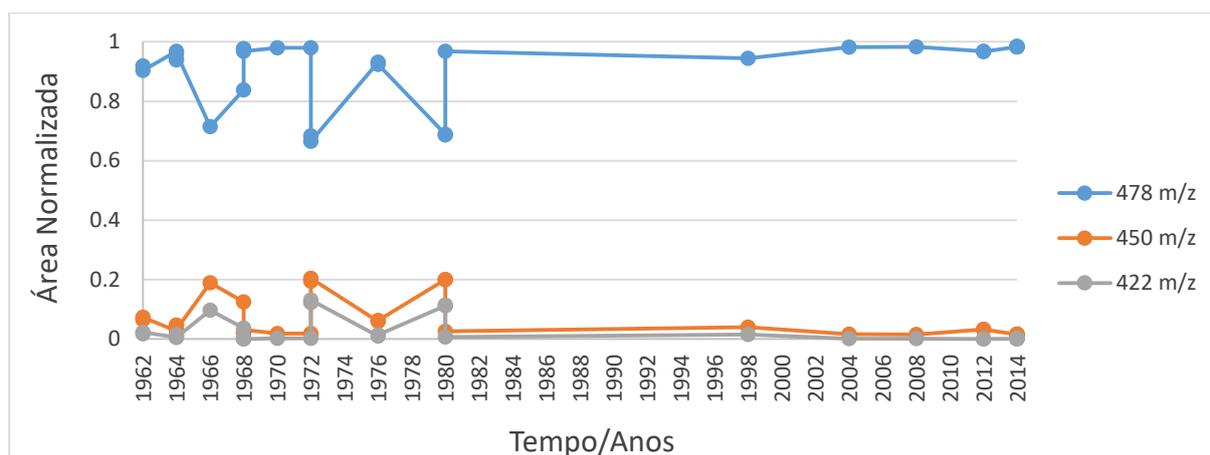


Figura 57: Degradação do corante Basic Blue 7 (B) de lançamentos de tinta de caneta contendo os corantes Cristal Violeta e Basic Blue 7 (CB) em sua formulação.

Dessa forma, num primeiro momento, não foi possível estabelecer uma relação unívoca entre a degradação natural ocorrida em casos reais e a artificial realizada em laboratório.

Cabe destacar que, na dissertação de Karina F. F. Costa [34], foram amostrados documentos no INC/PF e estes foram identificados apenas como escritos com caneta esferográfica, mas não se tinha conhecimento da marca das canetas utilizadas. Portanto, considerando qualquer um dos gráficos plotados nas Figuras 52 a 57, é muito provável que existam lançamentos de tintas de marcas diferentes ou que no decorrer dos anos houve mudança na formulação inicial das tintas das canetas. Isso pode contribuir para a variabilidade observada nos dados.

4.2.4 Estudo da variação da composição inicial da caneta esferográfica azul da marca Bic

Uma das hipóteses levantadas a partir da grande variação observada nas Figuras 52 a 57 é que o estágio inicial de degradação das diferentes marcas ou mesmo de uma mesma marca pode apresentar uma mudança significativa em função do lote da caneta. Para tentar estimar a grandeza dessa variação na composição inicial das tintas de caneta esferográficas, um estudo foi realizado em canetas esferográficas na marca Bic. Esse estudo teve o objetivo de observar a variação na intensidade do pico de razão m/z 372, correspondente ao corante Cristal Violeta

no momento inicial, ou seja, em poucos instantes após o lançamento da tinta dessas canetas em papel.

Foram analisadas 10 canetas esferográficas e, com o intuito de conseguir que as canetas analisadas fossem de ano e lote distintos, as amostras foram adquiridas em diferentes locais do Brasil, como listado na Tabela 18. As canetas foram compradas, em papelarias e mercados locais, num intervalo de aproximadamente um mês, numa tentativa de deixar a amostragem mais próxima ao que seria encontrado em documentos reais do ano de 2017. Apesar de terem sido adquiridas em um curto período de tempo, o ano de fabricação dessas canetas esferográficas variavam entre 2015 e 2017, sendo que a maioria foi do ano de 2016.

Tabela 18: Número, local de aquisição, lote e ano das amostras de caneta esferográfica da marca Bic.

NÚMERO	LOCAL	LOTE	ANO
01	Minas Gerais	50	2015
02	Goiás – Sanclerlândia	01	2017
03	Florianópolis	11	2015
04	Brasília	50	2016
05	Goiás – Goiânia	21	2016
06	Bahia – Feira de Santana	41	2015
07	Tocantins	29	2016
08	Goiás – Anápolis	26	2016
09	Rio Grande do Sul – Porto Alegre	32	2016
10	Rio Grande do Sul – Porto Alegre	46	2016

Após a obtenção das canetas, vários traços foram realizados sobre papel A4, e foram preparadas e analisadas conforme o descrito anteriormente nas seções 4.1.2 e 4.1.3. Tomou-se o cuidado de não considerar os lançamentos iniciais no papel, afim de descartar a tinta que estava originalmente na ponta da caneta. Então, em uma outra folha de papel, foram feitos traços a mão livre, sem o uso de régua, com cada uma das canetas esferográficas. Duplicatas de cada amostra foram preparadas e analisadas como descrito nas seções 4.1.2 e 4.1.3 desse capítulo.

A Tabela 19 mostra as intensidades normalizadas do pico m/z 372 obtidas para cada amostra de tinta de caneta esferográfica da marca Bic. Pode-se observar que, entre as replicatas, os valores são próximos, porém, entre amostras, existe uma maior variação, de aproximadamente 10%. As amostras 01, 03 e 06 são de fabricação no ano de 2015 e, por serem as mais antigas, esperava-se que apresentassem a maior degradação no momento inicial, porém essas amostras apresentaram intensidades normalizadas do pico m/z 372 mais elevadas: 0,93; 0,92 e 0,92 respectivamente. A caneta esferográfica com maior intensidade normalizada do pico m/z 372 foi a 05, do ano de 2016. A amostra de fabricação mais recente é a 02, que teve intensidade normalizada do pico m/z 372 em 0,87, valor menor do que o de todas de fabricação em 2015.

Tabela 19: Intensidades normalizadas do pico 372 obtidas para cada amostra de caneta esferográfica Bic.

Caneta	Replicata 1	Replicata 2
01	0,93	0,93
02	0,87	0,87
03	0,92	0,92
04	0,87	0,87
05	0,94	0,94
06	0,92	0,92
07	0,84	0,84
08	0,84	0,84
09	0,85	0,85
10	0,88	0,88

Para evidenciar que a variação dos valores entre as amostras é maior que a variação entre as replicatas, os dados foram plotados no gráfico da Figura 58. Para complementar, a análise ANOVA foi realizada utilizando os dados da tabela anterior sendo obtido o valor 7108 para F, sendo que o $F_{9,10,95\%}$ é 3,02. Como o valor de F calculado foi muito maior do que o valor de F crítico, a hipótese nula foi rejeitada e pode-se afirmar que as amostras diferem entre si.

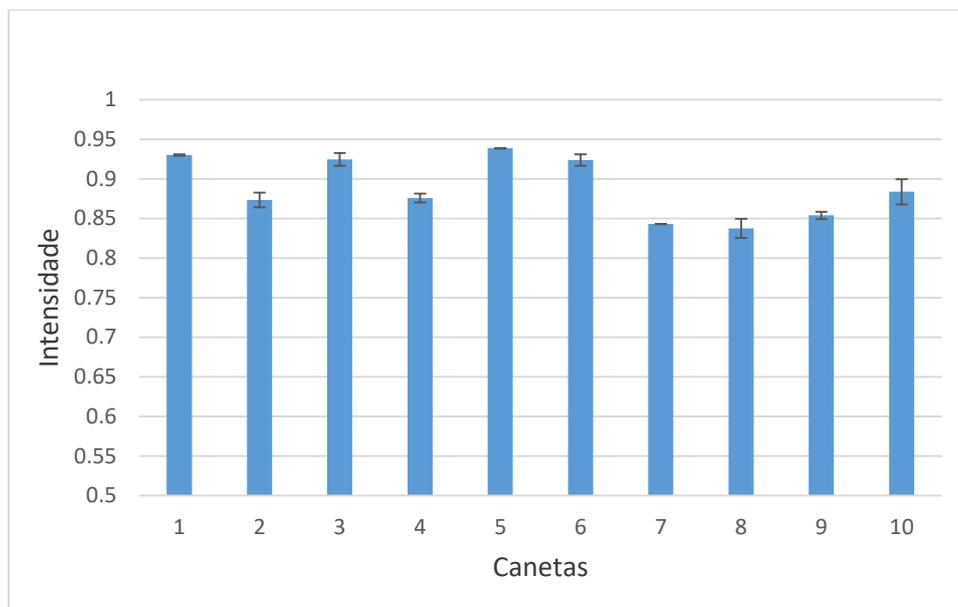


Figura 58: Valores de intensidades normalizadas do íon molecular m/z 372 do corante Cristal Violeta em duplicata. Barras de erro representam o desvio padrão com 1 grau de liberdade entre essas medidas.

Pode-se concluir, a partir desse experimento, que canetas esferográficas de uma mesma marca podem apresentar estado de degradação inicial diferentes, mesmo se forem adquiridas num mesmo mês. Para o experimento em questão, essa variação no estado inicial foi de aproximadamente 10% para as canetas esferográficas testadas. Estima-se que essa porcentagem poderia ser maior, caso a amostragem fosse mais ampla, ou, ainda, se uma variação temporal maior fosse permitida para a data de fabricação das canetas consideradas.

4.2.5 Cinética artificial versus cinética natural de degradação

Os valores das constantes cinéticas (1ª ordem) do Cristal Violeta em uma caneta da formulação GC são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20: Constantes cinéticas para a degradação do corante Cristal Violeta obtidas experimentalmente em envelhecimento forçado por 300 horas.

Constantes (horas⁻¹)	
k_a	0.004
k_b	0.004
k_c	0.004
k_d	0.003
k_e	0.001

Para a degradação natural, a escala de tempo envolvida no processo (décadas) permite estimar um valor aproximado para a primeira constante cinética de degradação de um determinado corante. Essa afirmação pode ser expressa pela equação (15).

$$k_{a,nat} \cong t^{-1} \quad (15)$$

A partir dos gráficos de degradação natural, fez-se a média do tempo necessário para a degradação do corante Cristal Violeta para a formulação GC, usando os valores de idade no qual a degradação do íon 372 encontrava-se em estado mais avançado que as demais. Esse procedimento permitiu estimar que o tempo médio envolvido na degradação natural em condições ambientais não controladas foi de aproximadamente 40 anos. Sendo assim, pode-se estimar o valor aproximado de $k_{a,nat}$ como $0,025 \text{ anos}^{-1}$.

Assumindo-se uma similaridade química entre os processos de degradação natural e artificial, é possível especular que a as razões das constantes cinéticas de degradação se mantêm inalteradas. Assim sendo, de posse do valor estimado para $k_{a,nat}$, é possível calcular as demais constantes cinéticas pelo sistema de equações (16).

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{k_{b,nat}}{k_{a,nat}} = \frac{k_b}{k_a} = \alpha \\ \frac{k_{c,nat}}{k_{a,nat}} = \frac{k_c}{k_a} = \beta \\ \dots \\ \frac{k_{g,nat}}{k_{a,nat}} = \frac{k_g}{k_a} = \varepsilon \end{array} \right. \quad (16)$$

Os valores dos parâmetros calculados são apresentados na Tabela 21 e os valores das constantes cinéticas obtidas para a degradação natural do corante Cristal Violeta na Tabela 22.

Tabela 21: Valores dos parâmetros de relação entre a degradação artificial e natural.

Valores dos parâmetros	
α	1.05
β	1.06
γ	0.86
δ	0.33

Com os valores das constantes cinéticas para a degradação natural do corante Cristal Violeta calculados a partir da degradação artificial, foram estimadas as intensidades relativas simulando lançamentos manuscritos entre 1962 e 2014. Usando como base a média do erro

máximo entre as intensidades relativas dos íons referentes a degradação do Cristal Violeta obtidas no teste de homogeneidade (ver 4.2.1), estipulou-se um intervalo de confiança de 0,02. Então, compararam-se os valores estimados de intensidade relativa obtidos com daqueles correspondentes à degradação natural do corante Cristal Violeta. A

Tabela 23 exibe os resultados em que a degradação natural melhor se assemelhou aos valores simulados para o caso de tintas com formulação GC.

Tabela 22: Constantes cinéticas para a degradação do corante Cristal Violeta obtidas para o envelhecimento natural

Constantes (anos⁻¹)	
k_a	1/40 = 0.025
k_b	0.026
k_c	0.027
k_d	0.023
k_e	0.008

Tabela 23: Intensidades relativas dos íons do corante cristal Violeta para a degradação natural e intensidades relativas estimadas (formulação GC).

Ano	m/z	372	358	344	330	316
2002	Natural	0.89	0.11	0.00	0.00	0.00
	Referência	0.89	0.11	0.00	0.00	0.00
2000	Natural	0.83	0.14	0.02	0.01	0.00
	Estimado	0.85	0.15	0.01	0.00	0.00
1998	Natural	0.82	0.16	0.02	0.00	0.00
	Estimado	0.81	0.18	0.01	0.00	0.00
1996	Natural	0.75	0.19	0.04	0.00	0.00
	Estimado	0.76	0.21	0.02	0.00	0.00
1994	Natural	0.74	0.21	0.05	0.00	0.00
	Estimado	0.73	0.24	0.03	0.00	0.00
1992	Natural	0.70	0.24	0.06	0.01	0.00
	Estimado	0.69	0.26	0.04	0.00	0.00
1990	Natural	0.68	0.27	0.05	0.01	0.00
	Estimado	0.66	0.28	0.05	0.01	0.00
1988	Natural	0.61	0.32	0.04	0.03	0.00
	Estimado	0.62	0.30	0.07	0.01	0.00
1986	Natural	0.59	0.33	0.07	0.01	0.00
	Estimado	0.59	0.32	0.08	0.01	0.00

Em conclusão, para a formulação GC, foi possível simular a degradação natural do corante Cristal Violeta por um intervalo de tempo de 14 anos a partir de constantes cinéticas obtidas de experimentos de degradação artificial. Esse procedimento representa um passo inicial no sentido de novas pesquisas que busquem correlacionar de forma efetiva experimentos de degradação artificial acelerada com processos naturais de envelhecimento de tintas em documentos reais.

4.3 Conclusão

No teste de homogeneidade, as amostras das 10 canetas, em uma mesma folha, envelhecidas por 12 horas não diferem entre si na degradação do corante Cristal Violeta, de forma que a degradação acontece de maneira uniforme e homogênea dentro da caixa de envelhecimento artificial utilizada.

No que se refere à degradação artificial, os corantes analisados degradam a diferentes velocidades dependendo da caneta esferográfica, mesmo quando submetidos às mesmas condições de envelhecimento. A partir dos resultados, observou-se que a degradação do corante Cristal Violeta na tinta da caneta esferográfica da marca Bic, de coloração preta, ocorre de maneira muito mais acentuada que as demais, enquanto que para a tinta da caneta esferográfica de marca Bic Cristal, de coloração azul, a degradação ocorre de maneira menos acentuada. .

A ferramenta *Solver* foi utilizada para ajustar equações de cinética de primeira e de segunda ordem para os corantes estudados, em especial o Cristal Violeta. Na maioria das canetas esferográficas estudadas, a equação de cinética de primeira ordem estimada teve melhores resultados de ajuste do que a equação de cinética de segunda ordem, corroborando com os trabalhos já descritos na literatura.

Assumindo que a reação seja de primeira ordem, nota-se que a velocidade da degradação é diferente para cada tinta de caneta esferográfica, mesmo para aquelas que possuem os mesmos corantes em sua formulação. Esses resultados da cinética de reação confirmam que a composição inicial da tinta da caneta interfere na taxa de degradação dos corantes.

Conforme o esperado, os casos de degradação natural mostraram-se mais complexos do que aqueles sob degradação artificial em condições controladas. Os dados obtidos não

permitem o reconhecimento de padrões inequívocos de degradação natural ao longo do tempo. O estudo da variação da composição inicial da caneta esferográfica da marca Bic, permitiu concluir que canetas esferográficas novas de uma mesma marca podem apresentar estado de degradação inicial diferentes. Essa variação no estado inicial foi de aproximadamente 10% entre as canetas esferográficas testadas. Apesar dessas dificuldades, foi possível simular a degradação natural do corante Cristal Violeta em canetas de formulação GC durante um período de 14 anos (abrangendo os anos de 1986 a 2002) a partir das constantes cinéticas da degradação artificial.

Conclusões gerais

Conclusões

O método baseado em PLSR foi capaz de obter bons resultados para a formulação CB, que não apresentou resultados aceitáveis pelo método ULT. Além disso, exibiu erros mais baixos para as formulações GC e GRB. Porém, o PLSR foi inferior ao ULT para as composições CV e C. Portanto, conclui-se que considerando o percentil 95% como critério de decisão, os métodos PLSR e ULT são complementares sua escolha dependerá da formulação de tinta utilizada.

O teste de homogeneidade confirmou que a degradação acontece de maneira uniforme e homogênea no experimento utilizando a caixa de envelhecimento artificial.

Analisando os resultados obtidos por degradação artificial, conclui-se que as degradações dos corantes podem ocorrer em diferentes velocidades, mesmo quando submetidas às mesmas condições de envelhecimento, sugerindo que a composição inicial da tinta da caneta interfere na taxa de degradação dos corantes. A equação cinética de primeira ordem foi bem ajustada para a degradação dos corantes estudados.

Apesar de ainda não ter sido possível encontrar um padrão visível na degradação natural de manuscritos, ao calcular constantes cinéticas para a degradação natural a partir das constantes cinéticas da degradação artificial, foi possível estimar 14 anos de degradação do corante Cristal Violeta de maneira similar ao observado na degradação natural.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- [1] D. R. Ifa, L. M. Gumaelius, L. S. Eberlin, N. E. Manicke e R. G. Cooks, “Forensic analysis of inks by imaging desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry,” *Analyst*, vol. 132, pp. 461-467, 2007.
- [2] V. Sharma e R. Kumar, “Dating of ballpoint pen writing inks via spectroscopic and multiple linear regression analysis: A novel approach,” *Microchemical Journal*, vol. 134, pp. 104-113, 2017.
- [3] K. O. Gorshkova, I. I. Tumkin, L. A. Myund, A. S. Tveryanovich, A. S. Mereschenko, M. S. Panov e V. A. Kochemirovsky, “The investigation of dye aging dynamics in writing inks using Raman spectroscopy,” *Dyes and Pigments*, vol. 131, pp. 239-245, 2016.
- [4] G. S. Bronswijk, P. Giles, S. Lewis e W. van, “In situ studies into the characterisation and degradation of blue ballpoint inks by diffuse reflectance visible spectroscopy,” *Anal. Methods*, vol. 7, pp. 4892-4900, 2015.
- [5] C. García-Ruiz e M. Calcerrada, “Analysis of questioned documents: A review,” *Analytica Chimica Acta*, pp. 143-351, 2015.
- [6] R. M. Seifar, J. M. Verheul, F. Ariese, U. A. T. Brinkman e C. Gooijer, “Applicability of surface-enhanced resonance Raman scattering for the direct discrimination of ballpoint pen inks,” *Analyst*, vol. 126, pp. 1418-1422, 2001.
- [7] P. M. Lalli, G. B. Sanvido, J. S. Garcia, R. Haddad, R. G. Cosso, D. R. J. Maia, J. J. Zacca, A. O. Maldaner e M. N. Eberlin, “Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry,” *Analyst*, vol. 135, pp. 745-750, 2010.
- [8] J. Andrasko, “Changes in composition of ballpoint pen inks on aging in darkness,” *Journal of forensic sciences*, vol. 47, pp. 324-7, 2002.

- [9] C. Weyermann, D. Kirsch, C. Costa-Vera e B. Spengler, "Photofading of Ballpoint Dyes Studied on Paper by LDI and MALDI MS," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 17, pp. 297-306, 2006.
- [10] C. Weyermann, B. Schiffer e P. Margot, "A logical framework to ballpoint ink dating interpretation," *Science & Justice*, vol. 48, pp. 118-125, 2008.
- [11] C. Weyermann e B. Spengler, "The potential of artificial aging for modelling of natural aging processes of ballpoint ink," *Forensic Science International*, vol. 180, pp. 23-31, 2008.
- [12] M. Ezcurra, J. M. Gongora, I. Maguregui e R. Alonso, "Analytical methods for dating modern writing instrument inks on paper," *Forensic Science International*, vol. 197, pp. 1--20, 2010.
- [13] T. J. Wilkinson, D. L. P. a. M. C. Martin, W. R. McKinney e A. A. Cantu, "Use of Synchrotron Reflectance Infrared Spectromicroscopy as a Rapid, Direct, Nondestructive Method for the Study of Inks on Paper," *Applied Spectroscopy*, vol. 56, pp. 800-803, 2002.
- [14] C. Weyermann, J. Almog, J. Bögler e A. A. Cantu, "Minimum requirements for application of ink dating methods based on solvent analysis in casework," *Forensic Science International*, vol. 210, pp. 52-62, 2011.
- [15] B. Li, "Dating of black gel pen ink using the dissolution–diffusion method," *Forensic Science International*, vol. 234, pp. 126-131, 2014.
- [16] R. Brunelle e A. Cantu, "A Critical Evaluation of Current Ink Dating Techniques," *Journal of Forensic Sciences*, vol. 32, pp. 1522-1536, 1987.
- [17] G. LaPorte, J. Wilson, A. Cantu, S. Mancke e S. Fortunato, "The identification of 2-phenoxyethanol in ballpoint inks using gas chromatography/mass spectrometry-relevance to ink dating," *Journal of forensic sciences*, vol. 49, pp. 155-169, 2004.

- [18] J. Siegel, J. Allison, D. Mohr e J. Dunn, “The use of laser desorption/ionization mass spectrometry in the analysis of inks in questioned documents,” *Talanta*, vol. 67, pp. 425-429, 2005.
- [19] D. Grim, J. Siegel e J. Allison, “Evaluation of Desorption / Ionization Mass Spectrometric Methods in the Forensic Applications of the Analysis of Inks on Paper,” *Journal of Forensic Sciences*, vol. 17, pp. 1411-1420, 2001.
- [20] C. Weyermann, D. Kirsch, C. C. Vera e B. Spengler, “A GC/MS study of the drying of ballpoint pen ink on paper,” *Forensic Science International*, vol. 168, pp. 119-127, 2007.
- [21] S. Locicero, L. Dujourdy, W. Mazzella, P. Margot e E. Lock, “Dynamic of the ageing of ballpoint pen inks: quantification of phenoxyethanol by GC-MS.,” *Science & justice*, vol. 44, pp. 165-171, 2004.
- [22] J. H. Bügler, H. Buchner e A. Dallmayer, “Age determination of ballpoint pen ink by thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry,” *Journal of Forensic Sciences*, vol. 53, pp. 982-988, 2008.
- [23] K. Jeyasubramanian, G. Hikkua e R. K. Sharma, “Photo-catalytic degradation of methyl violet dye using zinc oxide nano particles prepared by a novel precipitation method and its anti-bacterial activities,” *Journal of Water Process Engineering*, vol. 8, p. 35–44 , 2015.
- [24] A. Bhattacharjee, M. Ahmaruzzaman, T. B. Devi e J. Nath, “Photodegradation of Methyl Violet 6B and Methylene blue using tin-oxide nanoparticles (synthesized via a green route),” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 325, pp. 116-124, 2016.
- [25] C. Bouasla, M. E.-H. Samar e F. Ismail, “Degradation of methyl violet 6B dye by the Fenton process,” *Desalination journal*, vol. 254, pp. 35-41, 2010.
- [26] M. Fayazi e S. Azizian, “Catalytic degradation of methyl violet without light irradiation using nanostructured CuS,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 224, pp. 763-767, 2016.

- [27] Y. Li, S. Yang, C. Sun, L. Wang e Q. Wang, “18 The degradation processes of crystal violet conformed to pseudo first-order 19 kinetics, with different rate constants under different conditions.,” *Water Research*, vol. 188, pp. 173-183, 2016.
- [28] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz e J. A. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, Cengage Learning, 2008.
- [29] R. Smith, *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*, Wiley, 2004.
- [30] E. de Hoffmann e V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Wiley, 2007.
- [31] 2017. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/br/pt/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/ionization-source-technology-overview.html>. [Acesso em 06 01 2018].
- [32] R. J. Cotter, “Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules,” *Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 445-447, 1999.
- [33] [Online]. Available: <http://www.globalspec.com/reference/68924/203279/3-3-mass-analysers>. [Acesso em 20 10 2017].
- [34] K. F. F. Costa, *Datação de lançamentos gráficos por espectrometria de massas e análise do perfil de degradação natural de corantes*, Universidade De Brasília: Dissertação de mestrado, 2016.
- [35] M. M. C. Ferreira, *Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações*, Unicamp, 2015.
- [36] J. J. Zacca, T. S. Grobério, A. O. Maldaner, M. L. Vieira e J. W. B. Braga, “Correlation of Cocaine Hydrochloride Samples Seized in Brazil Based on Determination of Residual Solvents: An Innovative Chemometric Method for Determination of Linkage Thresholds,” *Analytical Chemistry*, vol. 85, pp. 2457-2464, 2013.
- [37] R. G. Brereton, “Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry,” *Analyst*, vol. 125, pp. 2125-2154, 2000.

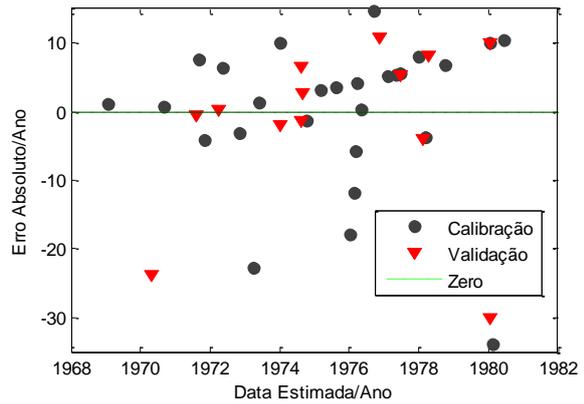
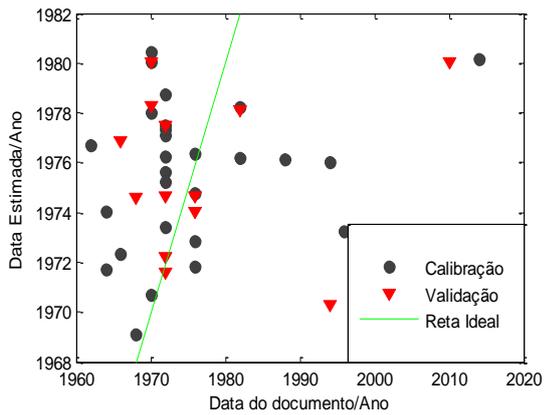
- [38] R. Kramer, em *Chemometric techniques for quantitative analysis*, Massachusetts, Marcel Dekker, 1998.
- [39] M. M. C. Ferreira, A. M. Antunes, M. S. Melgo e L. M. O. Volpe, “Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial,” *Quimica Nova*, vol. 22, pp. 724 - 731, 1999.
- [40] A. A. d. S. Junior, *Determinação de parâmetros de óleos lubrificantes de motores de ciclo Otto e ciclo diesel através da espectroscopia no infravermelho, métodos multivariados e cartas de controle*, Dissertação de mestrado, 2011.
- [41] P. Valderrama, J. W. B. Braga e R. J. Poppi, “Variable selection, outlier detection, and figures of merit estimation in a partial least-squares regression multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in the alcohol industry by near-infrared spectroscopy,” *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 55, pp. 8331-8338, 2007.
- [42] E. Thomas, “A primer on multivariate calibration,” *Analytical Chemistry*, vol. 66, p. 795 – 804, 1994.
- [43] B.G.M.Vandeginste, D.L.Massart, L.M.C.Buydens, S. Jong, P.J.Lewi e J.Smeyers-Verbeke, “Multivariate calibration,” em *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*, Amsterdam, Elsevier, 1998, pp. 349-381.
- [44] V. A. G. d. Silva, *Análise e caracterização de tintas em documentos por Espectroscopia e Quimiometria aplicada a Química Forense*, Universidade De Brasília: Tese de doutorado, 2014.
- [45] Y. Xu, J. Wang e L. Yao, “Dating the writing age of black roller and gel inks by gas chromatography and UV–vis spectrophotometer,” *Forensic Science International*, vol. 162, pp. 140-143, 2006.
- [46] J. W. B. Braga, *Notas de aula de Quimiometria*, Brasília: UnB, 2017.

Apêndices

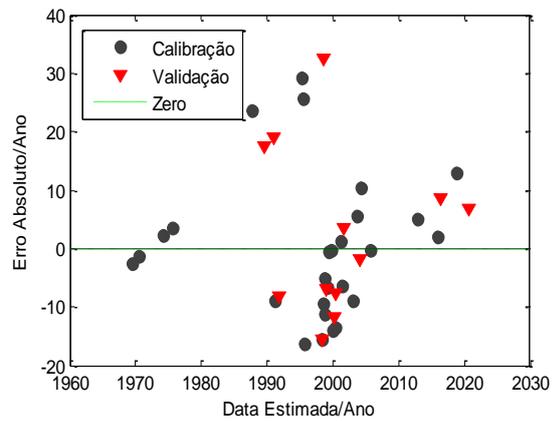
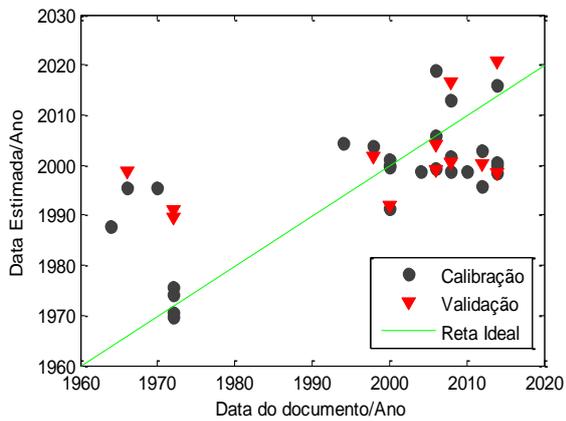
Apêndice 1

Gráficos da regressão e de resíduos obtidos no método PLSR com a normalização SNV e dados centrados na média.

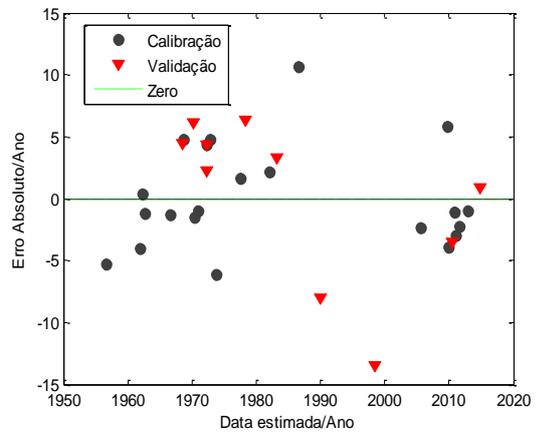
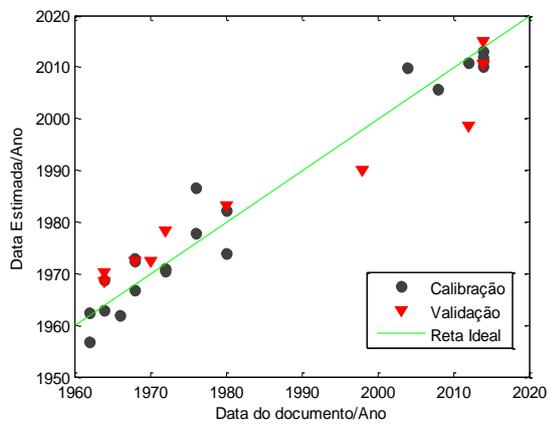
Basic Blue 7:



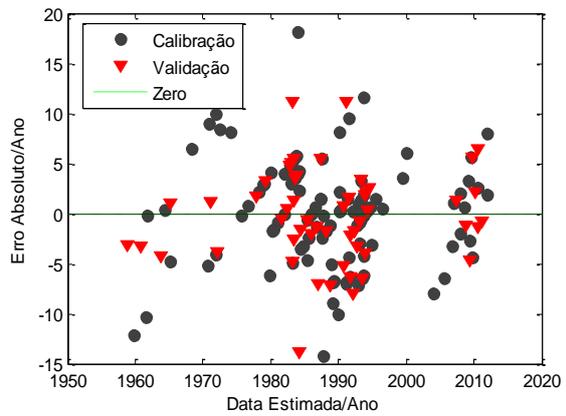
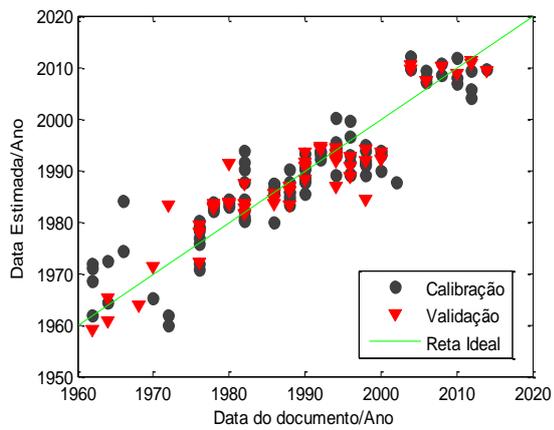
Cristal Violeta:



Cristal Violeta e Basic Blue 7:



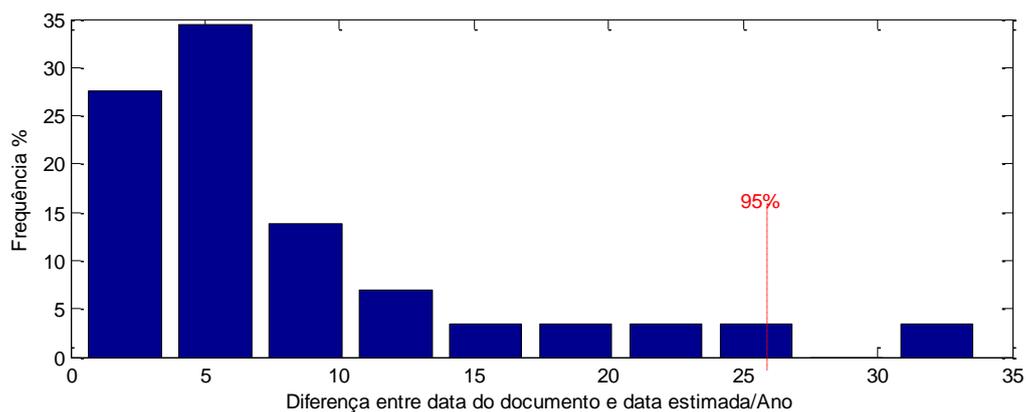
Guanidina e Cristal Violeta:



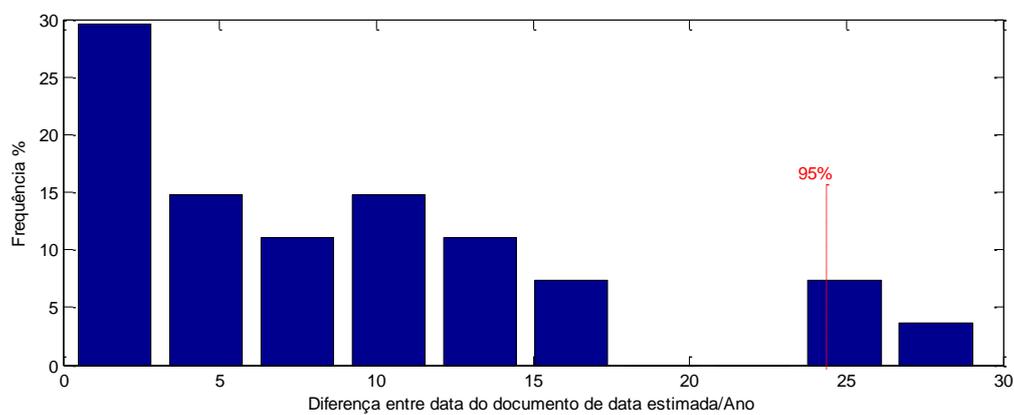
Apêndice 2

Histogramas obtidos no método PLSR com normalização SNV e dados centrados na média.

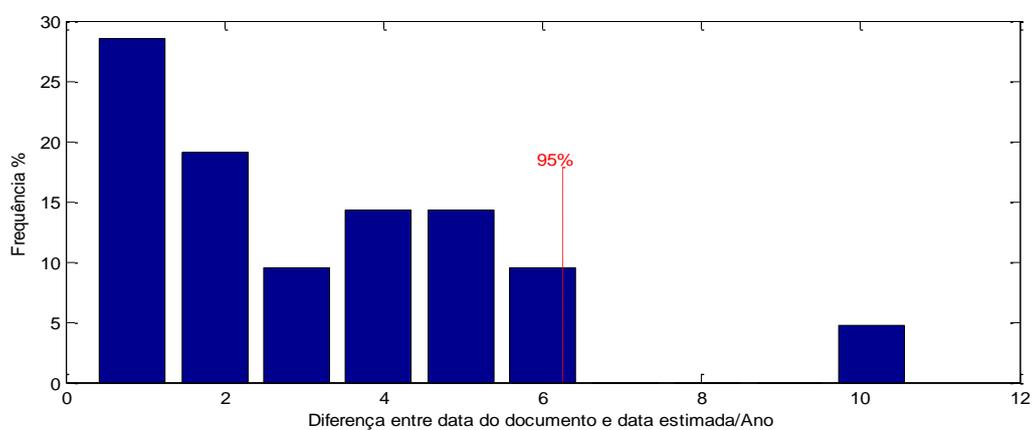
Basic Blue 7:



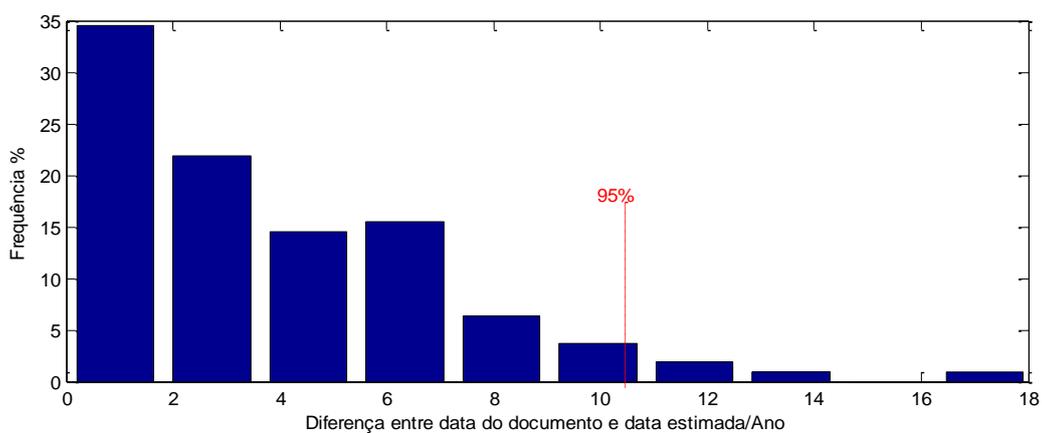
Cristal Violeta:



Cristal Violeta e Basic Blue 7:

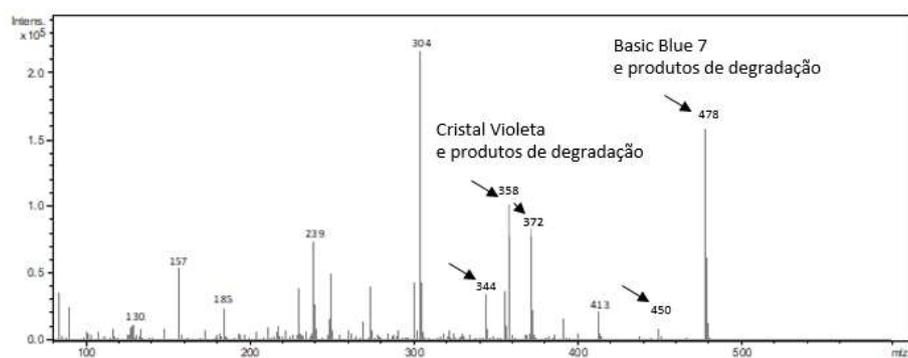


Guanidina e Cristal Violeta:

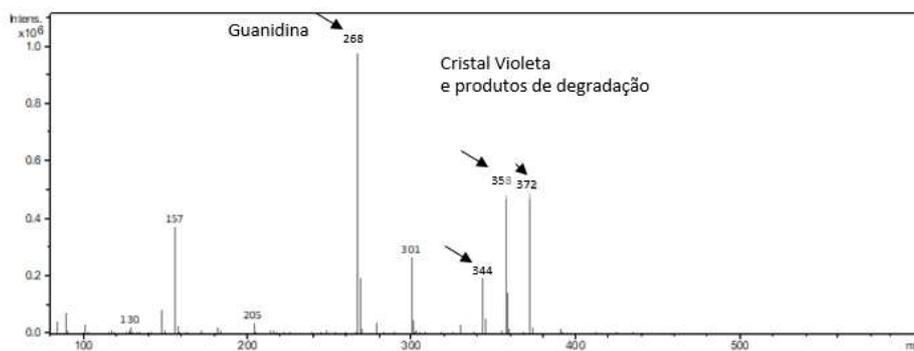


Apêndice 3

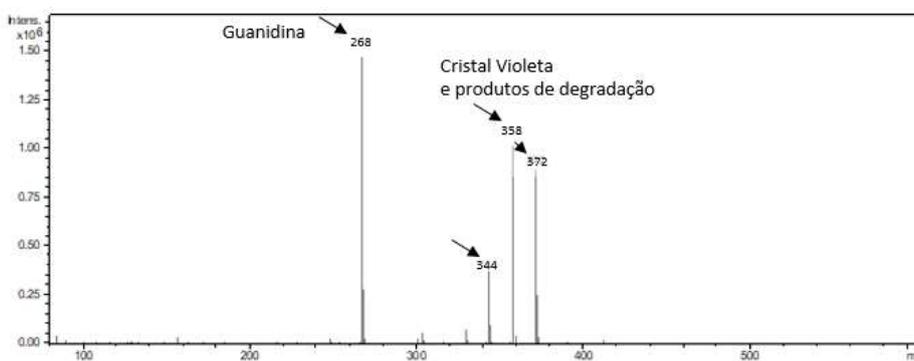
Pilot BP-S



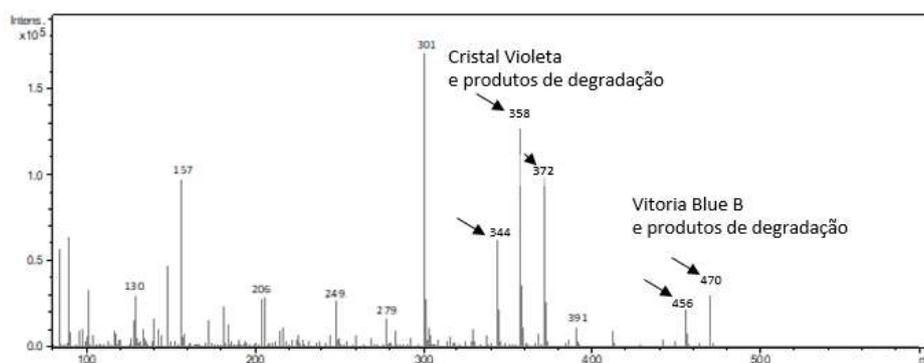
Bic (Clássica)



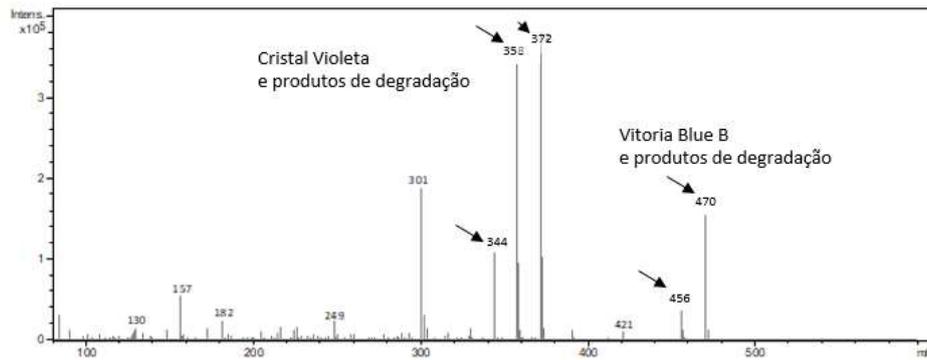
Bic Cristal



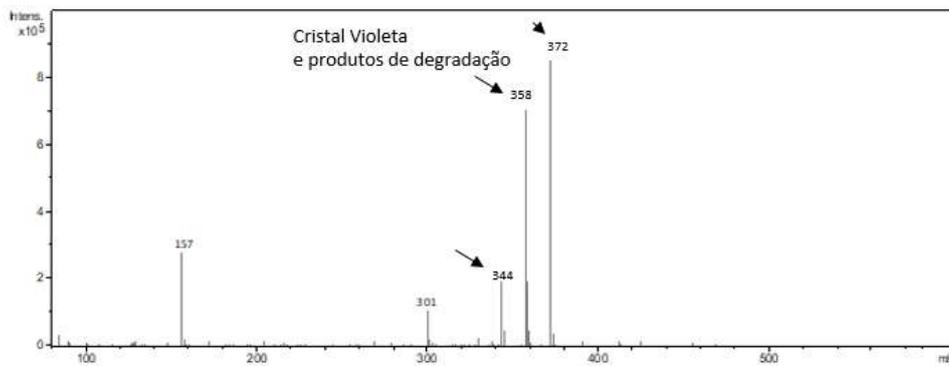
Molin



Compactor

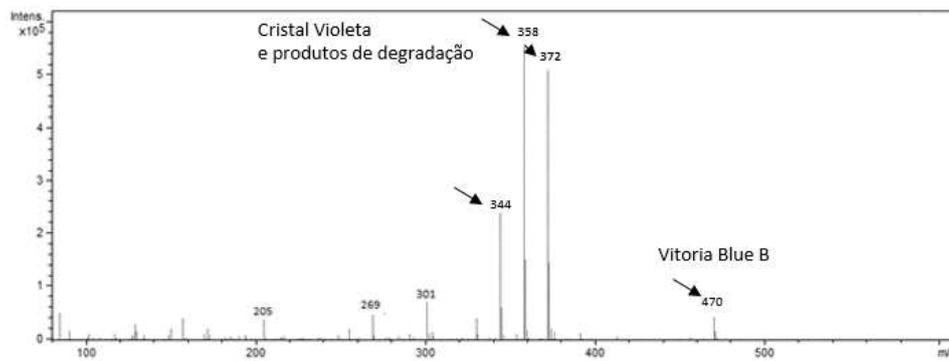


Cis Speed

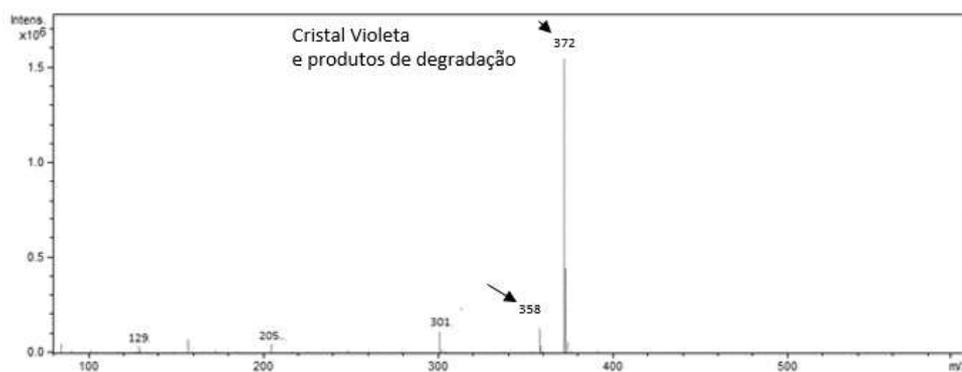


Canetas de cor preta

Acrilex

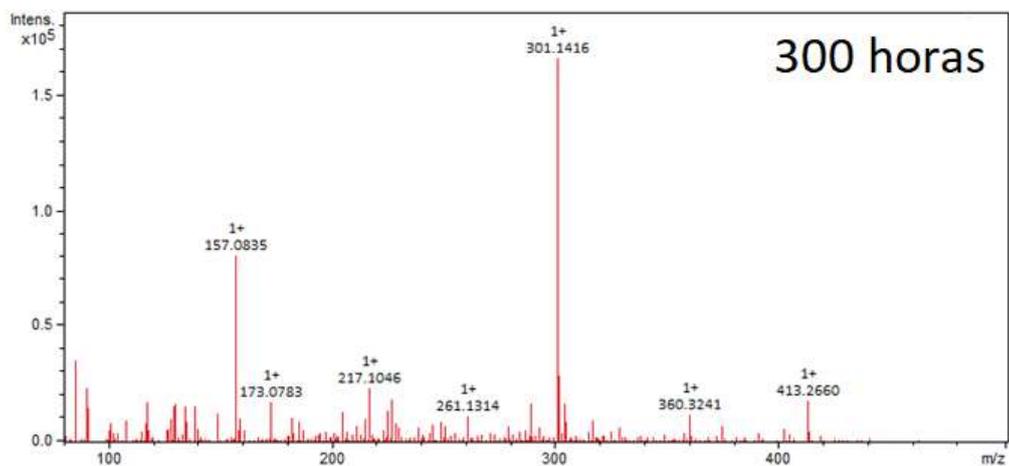
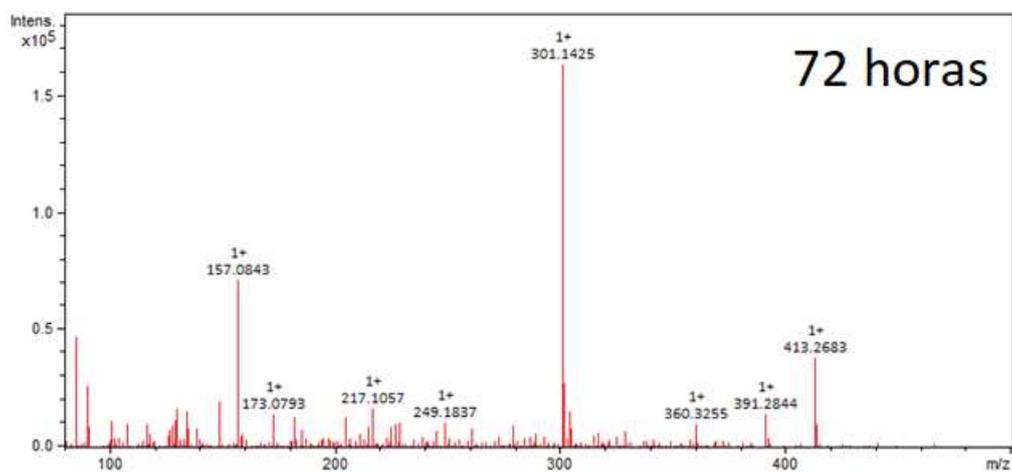
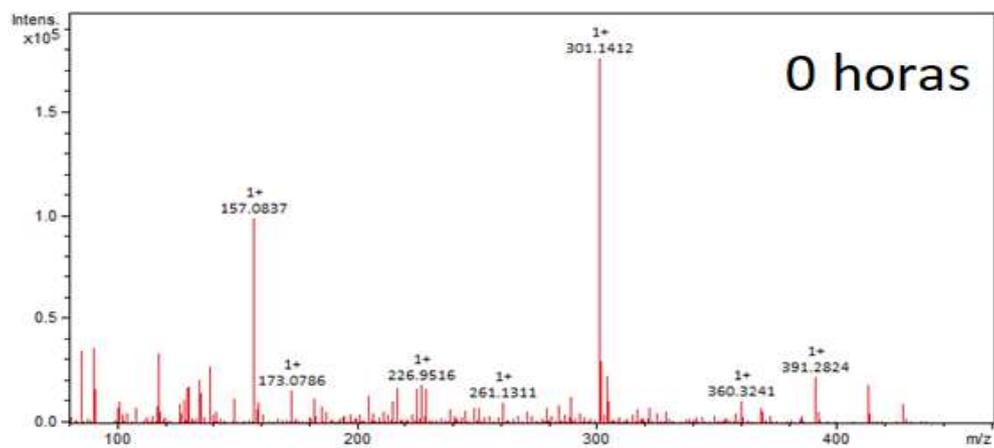


Bic



Apêndice 4

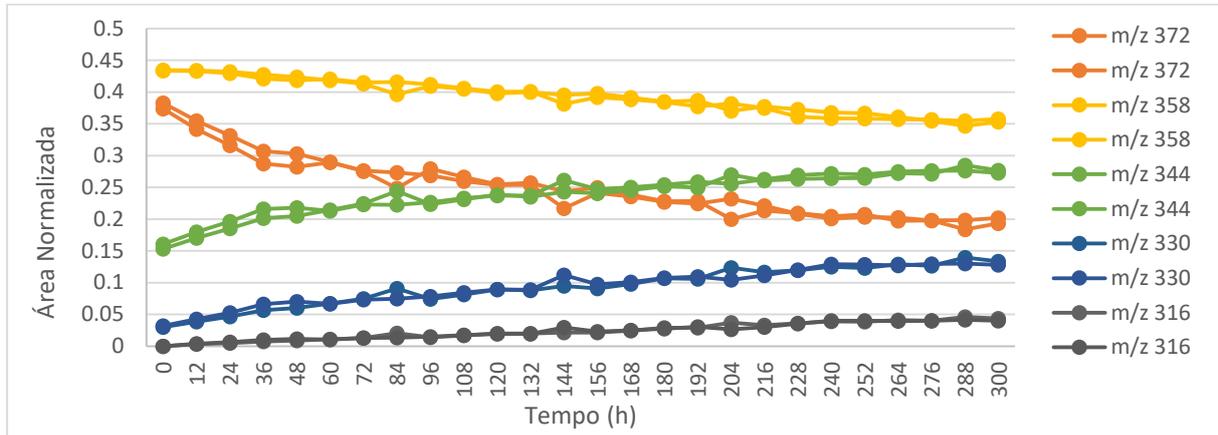
Espectros do branco no decorrer de 300 horas:



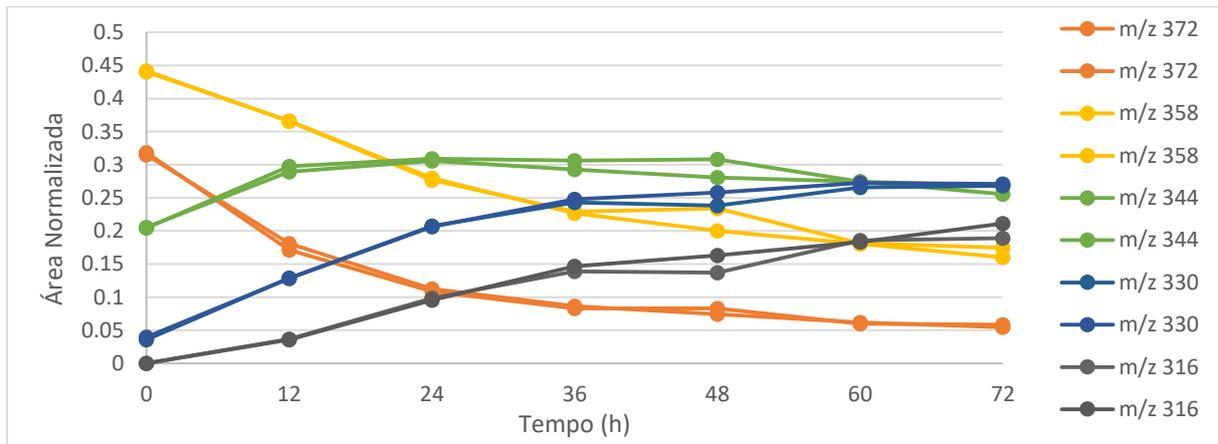
Apêndice 5

Degradação do corante Cristal Violeta. Linhas de mesma cor e marcador indicam replicatas.

Bic Cristal:



Molin:



Pilot:

