INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDOS SOBRE A RECENTIDADE DE DOCUMENTOS UTILIZANDO-SE A
TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS (GC-MS)**

Natalie Seguro Furlan

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Materiais.**

Orientador:

Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis

SÃO PAULO

2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor, pela vida, e pelo que sou e tenho hoje.

Ao Banha, pelo amor, compreensão e companheirismo.

A minha família, por ser meu apoio e meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis, pela oportunidade, orientação e confiança no meu trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, por fornecer todo apoio preciso para conclusão deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Caracterização Química, pelo apoio, companheirismo e pelos ensinamentos de todos esses anos, desde minha iniciação científica. Em especial para:

Helena M. Shihomatsu, pelos ensinamentos, pelo ombro amigo, onde muitas vezes pude desabafar e por ter me agüentado todos esses anos.

Maurício H. Kakazu, por ter me ensinado várias vezes coisas básicas de Química, pelos cálculos de concentração, pela paciência, que só ele tem.

Marcos A. Hortellani, pela na formatação de texto e cálculos, pelas inúmeras risadas, pelas histórias, que ele sabe contar igual.

João C. Ulrich, pela paciência em me ensinar incerteza e validação de metodologia, e por fazer o laboratório ser um ambiente ótimo para trabalhar.

Renata M. L. Müller, pela amizade, pelas fofocas, pelas discussões sobre dissertação, por poder contar sempre com um ombro amigo para desabafar, chorar e dar risada.

Juan F. M. Gamaro, pelos anos de amizade e pelas diversas vezes que rimos juntos.

Elisa K. Shibuya, pela orientação na minha iniciação científica, pela paciência com meus erros, pelos ensinamentos e conselhos.

João Carlos Dias de Freitas, pela ajuda na publicação do meu artigo

A todo pessoal de apoio do Centro de Lasers e Aplicações, pois sem eles, esses anos teriam sido muito menos prazerosos.

Ao José Oscar W. V. Bustillos, pelos vários ensinamentos sobre o GC-MS e por me tirar várias vezes do “sufoco”.

Aos meus amigos Ana Paula G. Converso, Priscila Mussarra, Shanna Gorgatti e Rogério Souza pela amizade verdadeira e pelo ombro amigo, e, por não entenderem “nada” de Química, fazem com que eu relaxe e me divirta muito nas horas em que mais preciso.

A todas as pessoas reais ou virtuais, que de alguma forma me ajudaram, me apoiaram, me ensinaram e torceram por mim, o meu muito obrigado.

Á FAPESP pelo apoio financeiro.

ESTUDOS SOBRE A RECENTIDADE DE DOCUMENTOS UTILIZANDO-SE A TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA À GAS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

Natalie Seguro Furlan

RESUMO

A análise de tintas e papéis é de grande interesse para a ciência e a interação tinta-papel é importante em vários níveis. A análise da tinta de um documento é extremamente importante para o estudo de diferentes aspectos, como adulterações e determinação da recentidade. Esses aspectos podem ser estudados analisando a tinta e o papel tanto fisicamente quanto quimicamente. Portanto, o desenvolvimento de uma técnica para a análise de tintas de caneta esferográfica e a determinação da recentidade de um documento é interessante para a Ciência Forense.

No Brasil, cientistas forenses enfrentam todos os dias diversos casos que requerem a análise de tintas de caneta esferográfica, e não se tem nenhuma técnica onde a determinação da idade de uma tinta é possível. Os casos mais comuns onde há a necessidade da recentidade de um documento são fraudes em recibos de pagamento e de quitação de dívidas, preenchimento e assinatura de contratos, adulteração em documentos e em cheques.

Neste trabalho, é discutida uma nova metodologia para a análise de tintas de canetas esferográficas e a sua utilização na determinação da recentidade de uma amostra de tinta de caneta esferográfica.

Foram analisadas periodicamente amostras provenientes de diferentes países, como Estados Unidos, Canadá, Peru, Japão, Espanha e Grécia. Com os resultados obtidos, foram construídas curvas de degradação do solvente em função do tempo de preparo. Com as curvas, obtiveram-se as equações logarítmicas relativas. As equações propostas mostraram ser capazes de distinguir a idade relativa de uma tinta, com 20% de variação em relação ao valor teórico.

Portanto, a principal conclusão deste trabalho é a metodologia proposta pode ser utilizada para determinar a idade relativa de uma tinta de caneta esferográfica.

RECENTICITY STUDY OF DOCUMENTS USING GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC-MS)

Natalie Seguro Furlan

Abstract

The analysis of inks and papers are of great interest to science and an understanding of the interaction between ink and paper is very important in many levels. The ink analysis from a document is extremely important to the study of several aspects such as adulteration and the age of the ink. These aspects could be studied by analysing the ink and paper both physically and chemically. The development of a technique to analyse ballpoint pen ink and to determine the age of a document by analysing the ink applied on a paper is very helpful for every aspect of Forensic Science.

In Brazil, Forensic Scientists face everyday many cases that require the ballpoint pen ink analysis, and there are no methods in which the determination of the ink age is possible. The most habitual cases which ink age analysis is requested are frauds in receipts, debt quittances, contract completions, signatures, adulterated documents and checks.

In this work, a new methodology of the ballpoint ink pen and its utilization to determine the age of a ballpoint ink sample will be discussed.

Ballpoint pen ink samples from different countries such as the United States, Canada, Peru, Japan, Spain and Greece were periodically analysed. With the obtained results and according to the preparation time, curves of degradation of the solvent were built. The logarithmic equations from the curves were obtained too. The proposed equation has shown to be able to distinguish the relative age of the ballpoint ink with a variation of 20% from the theoretical value.

Therefore, the main conclusion of this work is that the methodology proposed could be used to determine the relative age of a ballpoint ink pen.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	5
3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO	6
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
4.1. Tintas e canetas esferográficas.....	7
4.2. Análises em Documentoscopia	9
4.3. Cromatografia a Gás	10
4.4. Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas	13
5. EXPERIMENTAL.....	15
5.1. Materiais e Métodos	15
5.1.1.Amostras Analisadas.....	15
5.1.2.Reagentes e Padrões.....	15
5.1.3.Instrumentação e Materiais	15
5.1.4.Preparo dos Testemunhos	15
5.1.5.Armazenamento dos Testemunhos.....	16
5.1.6.Preparo da Solução Padrão	16
5.1.7.Preparo da Solução Padrão Mãe	16
5.1.8.Preparo do Padrão Interno	17
5.1.9.Preparo da Solução para Extração.....	17
5.2. Método Proposto.....	18
5.2.1.Preparo das Amostras.....	18
5.2.2.Verificações e Calibração do Espectrômetro de Massas	18
5.2.3.Condições Cromatográficas	19
6. QUANTIFICAÇÃO DO 2-FENOXIETANOL.....	20
6.1. Parâmetros para a Validação do Método Proposto.....	20
6.1.1 Linearidade.....	20
6.1.2. Limite de Detecção.....	21
6.1.3. Limite de Quantificação	21
6.1.4. Precisão	21
6.1.5. Repetitividade.....	22
6.1.6. Reprodutibilidade.....	22
6.1.7. Recuperação	22
6.1.8. Robustez	23

6.1.9. Incerteza da medição	23
7. RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
7.1. Validação do Método Proposto	29
7.1.1 Linearidade.....	29
7.1.2. Limite de Detecção.....	31
7.1.3. Limite de Quantificação	31
7.1.4. Precisão	32
7.1.5. Recuperação	33
7.1.6. Robustez	34
7.1.7. Fontes de Incertezas e Suas Respectivas Incertezas Padrão	36
7.2. Estudo da Degradação do Solvente.....	38
7.3. Determinação da recentidade	49
8. CONCLUSÃO.....	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Evolução da produção de laudos periciais na área documentoscópica entre os anos de 2000 e 2007 pela Polícia Federal.	2
TABELA 2. Principais solventes utilizados na formulação de tintas de canetas esferográficas.....	3
TABELA 3. Massa necessária para obter 47,3 g da solução mãe	16
TABELA 4. Massa necessária para obter 20 g de solução para extração	17
TABELA 5. Linearidade obtida para o analito em concentração compreendidas entre 4,0 e 1,25 mmol.L ⁻¹	30
TABELA 6. Linearidade obtida para o analito em concentração compreendidas entre 1,0 e 0,175 mmol.L ⁻¹	30
TABELA 7. Limite de detecção calculado para o método proposto.....	31
TABELA 8. Limite de quantificação para o método proposto	32
TABELA 9. Resultados óbitos pelo cálculo da repetitividade	33
TABELA 10. Resultado da recuperação do padrão de 2-fenoxietanol	33
TABELA 11. Concentração do analito extraído em diferentes tempos de extração	34
TABELA 12. Variação da concentração do analito extraído em função da quantidade inicial de amostra.....	35
TABELA 13. Resultados da concentração de 2-fenoxietanol obtidas com a variação do volume de solvente	36
TABELA 14. Valores intermediários e incertezas na determinação de 2-fenoxietanol	37
TABELA 15. Concentração de 2-fenoxietanol, em mmol.mm ⁻² imediatamente após aplicação da tinta, de diferentes países, no papel.....	40
TABELA 16. Porcentagem de degradação do solvente após cinco dias de aplicação da tinta no papel, em relação à concentração inicial (dia 0).....	41
TABELA 17. Degradação total do solvente em relação à concentração inicial (dia 0)	49
TABELA 18. Equações fornecidas pelas curvas de degradação do solvente de cada país, nos testemunhos armazenados sob luz artificial.....	49
TABELA 19. Equações fornecidas pelas curvas de degradação do solvente de cada país, nos testemunhos armazenados na ausência de luz.	50

TABELA 20. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0015\ln(x) + 0,0180$ de origem dos Estados Unidos e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.....	51
TABELA 21. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0016\ln(x) + 0,0180$ de origem do Canadá e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	52
TABELA 22. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0016\ln(x) + 0,0186$ de origem do Peru e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	53
TABELA 23 Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0015\ln(x) + 0,0180$ de origem do Japão e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	54
TABELA 24. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0003\ln(x) + 0,0121$ de origem da Espanha e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	55
Tabela 25. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0003\ln(x) + 0,0120$ de origem da Grécia e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	56
TABELA 26. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,00081\ln(x) + 0,0170$ de origem dos Estados Unidos e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.....	57
TABELA 27. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0008\ln(x) + 0,0170$ de origem do Canadá e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	58
TABELA 28. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0008\ln(x) + 0,0169$ de origem do Peru e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	59
TABELA 29. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0008\ln(x) + 0,0170$ de origem do Japão e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	60
TABELA 30. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0005\ln(x) + 0,0133$ de origem da Espanha e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	61

TABELA 31. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0005\ln(x) + 0,0132$ de origem da Grécia e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.	62
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Diagrama de classificação das tintas segundo Capello (fonte: Tratado de Criminalística – Tomo1 - Documentos, 1980).....	7
FIGURA 2. Diagrama básico de um cromatógrafo a gás mostrando seus principais componentes.....	12
FIGURA 3. Esquema básico de um GC-MS.....	14
FIGURA 4. Diagrama de Causa e Efeito para o procedimento analítico na determinação do analito de interesse em amostras de tinta de caneta esferográfica.....	25
FIGURA 5. Contribuição individual das fontes de incerteza na incerteza final para 2-fenoxietanol.....	37
FIGURA 6. Cromatograma obtido pela análise de amostra de tinta de caneta esferográfica contendo 2-fenoxietanol e o padrão interno adicionado, 0-cresol..	39
FIGURA 7. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica dos Estados Unidos e armazenado sob luz artificial	42
FIGURA 8. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Canadá e armazenado sob luz artificial	42
FIGURA 9. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Peru e armazenado sob luz artificial	43
FIGURA 10. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Japão e armazenado sob luz artificial	43
FIGURA 11. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica da Espanha e armazenado sob luz artificial.....	44
FIGURA 12. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica da Grécia e armazenado sob luz artificial.	44
FIGURA 13. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado	

com caneta esferográfica dos Estados Unidos e armazenado na ausência de luz.	45
FIGURA 14. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Canadá e armazenado na ausência de luz.	46
FIGURA 15. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Peru e armazenado na ausência de luz.	46
FIGURA 16. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Japão e armazenado na ausência de luz.	47
FIGURA 17. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica da Espanha e armazenado na ausência de luz.	47
FIGURA 18. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica da Grécia e armazenado na ausência de luz.	48

1. INTRODUÇÃO

A análise de tintas e papéis é de grande interesse para a ciência. Desde historiadores e arqueologistas a cientistas forenses, o conhecimento das interações da tinta com o meio onde ela é aplicada é importante em vários aspectos [1].

Os historiadores usualmente fazem análises de documentos com o objetivo de determinar a autenticidade e autoria. Esses documentos podem ser analisados em três diferentes aspectos: histórico, científico e estilístico.

Através do aspecto histórico podemos identificar falsificações e adulterações em documentos. Observando o método de impressão, técnicas e materiais utilizados, estes devem ser consistentes com o tempo e local indicados, pois muitas falsificações são identificadas por conterem materiais que não existiam na época alegada [2].

A análise científica pode fornecer dados detalhados do material e processo de fabricação do papel e da tinta de um documento, detectando assim toda evidência física oculta no mesmo.

Comparação de estilos é essencial para a autenticação de um documento. Caligrafia, expressões culturais, e forma de redigir podem ajudar a identificar tanto a era quanto o autor. Comparações de caligrafia podem autenticar uma assinatura ou manuscrito [2].

Na arqueologia, a análise de tintas também é de extrema importância para o estudo de vários aspectos de um artefato, como em análises físico-químicas para fornecer dados sobre a técnica de grafismo, casos de pinturas retocadas, superposições, técnicas de fabricação de pigmentos, constituição química dos pigmentos, localização das fontes de matéria-prima, e estado de conservação das pinturas. Esses aspectos são importantes para a determinação da composição química e mineralógica de uma tinta [3].

Na Criminalística, documentos podem ser estudados em diversos aspectos dentro da área de Documentoscopia.

Documentoscopia é a parte da criminalística que estuda os documentos para verificar se são autênticos e, em caso contrário, determinar sua autoria. Dentro da documentoscopia estão os estudos de alterações de documentos, exame da tinta e exame de instrumentos escreventes [4].

A análise da tinta de um documento é de grande importância para diferentes tipos de estudos, tais como adulteração e determinação da recentidade. Esses aspectos podem ser investigados por meio de análises físicas e/ou químicas tanto do papel quanto da tinta.

As determinações da recentidade de escritas à tinta vêm sendo de grande interesse para os examinadores de documentos e um grande número de métodos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos para este propósito [5].

Em relação à datação de documentos em geral, a determinação da “idade” absoluta e relativa devem ser distintas. Na absoluta, a idade analítica leva à determinação de um período de tempo, no qual uma escrita questionada foi produzida. Com a idade relativa, amostras de duas ou mais áreas questionadas são analisadas e comparadas para determinar qual amostra é mais antiga ou mais nova que as outras. [6]

Segundo informações obtidas juntos à Polícia Federal (PF), os casos de produção de laudos periciais documentoscópicos são a segunda maior produção de laudos da PF no Brasil. No ano de 2007, foram produzidos 12.987 laudos periciais documentoscópicos, um aumento de aproximadamente 12% em relação ao ano anterior, como pode ser observado na TAB. 1

TABELA 1. Evolução da produção de laudos periciais na área documentoscópica entre os anos de 2000 e 2007 pela Polícia Federal.

Área de perícia	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Documentoscópica	9.179	10.849	10.532	11.677	10.180	11.253	11.623	12.987

Os casos mais enfrentados na rotina da PF no Brasil, quando há necessidade da produção de laudos documentoscópicos são normalmente exames grafotécnicos para verificação de autenticidade e autoria em documentos manuscritos como, por exemplo, cheques, carteiras de trabalho, passaportes e documentação do INSS. Além da análise de grafismos, há também a verificação da autenticidade do próprio documento (ex: passaportes, cédulas falsas, carteira de trabalho, etc.).

Os casos mais enfrentados na rotina dos peritos da Polícia Civil de São Paulo, onde há a necessidade da determinação da recentidade, são os de confecção de recibos de pagamento, quitação de dívidas, preenchimento e/ou assinatura de contratos, documentos e cheques [7].

O estudo a determinação da recentidade de um documento que será mostrado nesse trabalho será focado em canetas esferográficas e baseia-se no estudo da degradação do solvente encontrado em sua formulação. Encontra-se na literatura alguns estudos focando na evaporação do solvente [8-10]. Diferentes solventes são utilizados na formulação de canetas esferográficas [5,8], como pode ser observado na TAB 2.

TABELA 2. Principais solventes utilizados na formulação de tintas de canetas esferográficas

Solventes
Propileno glicol
Dietil glicol fenil éter
Álcool benzílico
Ácido 2-etil hexóico
Etileno glicol
Monofenileter
Etilenoglicol monometil eter
Hexileno glicol
Octileno glicol
1,3-Butileno glicol
Dietileno glicol
Trietileno glicol
Dipropileno glicol
Glicerina
Fenoxietanol
Fenoxietileno glicol
Etoxietanol

A utilização da técnica de GC-MS para a análise dos compostos voláteis de canetas esferográficas com o objetivo de datar documentos vêm sendo utilizado por mais de uma década [10,11], como sendo uma abordagem dinâmica para a determinação da idade de uma tinta de caneta esferográfica. Isto se deve à técnica ser capaz de analisar misturas complexas, separando os compostos [12] e analisando compostos orgânicos da tinta [13].

2. OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho é fazer-se um estudo visando o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação da recentidade de um documento, por meio da análise da degradação do 2-fenoxietanol encontrado na formulação de tintas de canetas esferográficas de várias origens.

3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O desenvolvimento de uma técnica para a determinação da recentidade de um documento é de extrema importância para resolver casos específicos de adulteração e fraude de documentos pela Polícia.

Atualmente no Brasil, são feitas análises somente de comparação de tintas escreventes, para observar diferenças de composição e cor por diversas técnicas como Cromatografia em Camada Delgada, Absorção Sob Luz Infravermelha, Ultravioleta e Branca, Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier e Espectroscopia de Absorção Eletrônica Usando Fibra Óptica. Essas técnicas fornecem somente se a confirmação de similaridade na composição entre as tintas empregadas em um testemunho, assim como tonalidade [7].

A determinação da recentidade de um documento através da análise da tinta empregada é de extrema importância, sendo que não há registros de estudos relacionados no Brasil e o desenvolvimento de novas metodologias será grande utilidade.

Segundo Gerald LaPorte [14], do United State Secret Service (USSS), análises semelhantes à proposta neste trabalho são feitas nos Estados Unidos, onde são analisados alguns compostos voláteis da tinta de caneta esferográfica pela técnica de GC-MS, em alguns casos envolvendo fraudes como registro médico, contratos financeiros, testamentos, diários (em casos envolvendo homicídio) e pagamento de taxas.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1. Tintas e canetas esferográficas

As tintas são líquidos coloridos, que ao serem depositados sobre o papel deixam, por evaporação do solvente e/ou por reações químicas de seus componentes, resíduos de cor tais que as fazem aptas para a execução da escrita.

A composição de qualquer tinta depende da função pretendida. A alteração de qualquer componente durante o processo de fabricação da tinta faz com que algumas propriedades também se alterem como aderência, secagem, cor, fluidez, resistência à degradação por luz, calor, água e outros fatores ambientais [15].

Segundo Capello [16], as tintas podem ser classificadas de diversas maneiras, quanto ao tipo, uso, composição, como será descrito na FIG. 1

FIGURA 1. Diagrama de classificação das tintas segundo Capello (fonte: Tratado de Criminalística – Tomo1 - Documentos, 1980).

Neste trabalho será abordado, especificadamente, estudos com canetas esferográficas.

Uma caneta esferográfica é composta basicamente por um tubo ou depósito de matéria colorante, que possui em seu extremo escritor uma esfera rotativa, sendo que esta ao girar, pega a tinta do depósito e a transfere para o papel.

As tintas para esferográficas são líquidos de alta viscosidade [17] e são constituídas por corantes e/ou pigmentos orgânicos dissolvidos ou suspensos em um veículo, que pode ser um óleo ou solvente [15,16], além de resinas, polímeros e outros compostos orgânicos, que começam a sofrer alteração ou evaporação assim que são aplicados em um papel [9].

As tintas são compostas basicamente de três componentes:

- Veículos
- Corantes e/ou pigmentos
- Resinas ou polímeros

Veículos

Os veículos são adicionados à tinta com o propósito de solubilizar (ou carregar) os corantes/pigmentos e para facilitar o escoamento da tinta pela carga e ponta da caneta, possuindo também a função de fornecer características como fluidez, mecanismo de secagem, tempo de secagem, polaridade e custo.

Os veículos contidos em tintas de canetas esferográficas sofreram uma drástica mudança de formulação desde sua inserção por volta de 1930. Antes de 1950, as tintas continham óleo como solvente primário; depois de 1950, tintas com solventes orgânicos em sua formulação foram desenvolvidas e tornaram-se as mais populares [17].

Os componentes voláteis da tinta constituem aproximadamente 50% de sua composição

Corantes e Pigmentos

Corantes e pigmentos são compostos, geralmente de origem orgânica, que atribuem coloração à tinta. Estes constituem aproximadamente 25% da composição da tinta. As tintas de canetas esferográficas se diferenciam de outros tipos de tintas pelo fato de possuírem alta porcentagem de corantes e/ou pigmentos, o que facilita a aplicação de diversos métodos de análises, sendo que

em outros tipos de tintas mais fluídas, os resultados nem sempre são satisfatórios.

Corantes e pigmentos são diferenciados pelo fato dos corantes serem solúveis no veículo empregado, enquanto que os pigmentos são um material finamente granulado disperso, ou seja, não é solubilizado.

Os principais corantes encontrados em canetas esferográficas de coloração azul são o Cristal Violeta, Metil Violeta e Tetrametil Para Rosaline. [18]

Resinas e Polímeros

As resinas e polímeros são adicionados à tinta com o propósito de controlar a viscosidade, fixar e estender sua duração. Estes compostos constituem cerca de 25% do volume da tinta.

Existem no mercado diferentes tipos de canetas, sendo que cada uma possui um diferente tipo de aplicação e por isso a composição e propriedades das tintas devem ser diferentes. Por exemplo, tintas de caneta esferográfica são mais viscosas e grossas, e geralmente contém maiores proporções de corantes orgânicos, diferente das canetas tipo gel, que possuem alta viscosidade, mas tornam-se mais fluídas com o uso, possuem misturas de corantes e pigmentos em sua formulação, o que dá uma maior gama de cores, além de não serem utilizados corantes com metais pesados, o que a torna segura ao meio ambiente [15,19,20].

4.2. Análises em Documentoscopia

Os documentos possuem aspectos que podem ser analisados tanto quimicamente quanto fisicamente para a comprovação de sua recentidade. Estes aspectos incluem análises no papel como resistência, reflexão ótica, amarelamento e fluorescência, e análise da composição e dos componentes voláteis da tinta empregada [21].

Podem-se fazer tanto análises químicas quanto físicas por diversas técnicas, sendo as técnicas de análises físicas mais utilizadas: Espectroscopia Infravermelha [1], Microespectrofotometria [22,23], Luminescência Visível e Infravermelha [15], Detecção Eletrostática [6], Microscopia Óptica [24],

Espectrofotometria no Visível [25], Reflectância no Infravermelho [26], Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier [27]

As técnicas de análise químicas de maior utilidade são Cromatografia Gasosa [17], Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas [5,10,11], Cromatografia Líquida de Alta Performance [15,27-29], Cromatografia em Camada Delgada [9,15,20,22,23,29], Eletroforese Capilar [15], Dessorção por Laser Acoplado à Espectrometria de Massas [28], Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance [25]

Por mais de uma década vêm-se estudando a análise de componentes voláteis da tinta de caneta por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS), destacando-se este método de análise como sendo o mais promissor para a determinação da “idade” de uma tinta. Isto se deve ao GC-MS estar habilitado a fazer análises de misturas complexas, devido sua facilidade na separação dos compostos [27], além de poder analisar os compostos voláteis e não voláteis de uma tinta [31].

Este trabalho é voltado para a análise do principal solvente orgânico volátil encontrado na formulação da maioria das canetas esferográficas de diferentes origens obtidas pelo laboratório, o 2-fenoxietanol. O fenoxietanol um líquido viscoso, incolor, de evaporação lenta, com leve odor aromático, sendo utilizado na formulação da maioria das tintas de esferográfica devido à sua estabilidade na presença de ácidos e bases. É também um solvente não higroscópico (não absorve água, sendo então sensível ao calor), inofensivo, econômico e especialmente bom na solubilização de resinas.

A técnica de GC-MS é a mais indicada para fazer as análises neste trabalho por esta ser uma excelente e comprovada ferramenta analítica para identificação e quantificação de compostos químicos, principalmente na área forense, além de fornecer reprodutibilidade na técnica e nas curvas obtidas [8,10], fazendo com que esta seja a técnica mais eficiente e melhor indicada para o desenvolvimento deste trabalho.

4.3. Cromatografia a Gás

Cromatografia a Gás (GC) é um método analítico de separação. Este método oferece uma separação rápida e de alta resolução de uma grande

quantidade de compostos [31], sendo estes particionados entre duas fases, uma fase móvel e uma fase estacionária. Em uma mistura, os compostos se fracionam em diferentes graus entre as duas fases, dependendo de suas respectivas solubilidades em cada uma. [32,33]

De um modo geral, o processo cromatográfico é levado a efeito introduzindo-se a fase estacionária em um tubo, ou seja, em uma coluna cromatográfica. A amostra é introduzida no topo da coluna e a fase móvel é bombeada continuamente a uma velocidade constante. Com o passar da fase móvel, as substâncias começam a se fixarem sobre a fase estacionária em diferentes pontos, segundo suas propriedades físico-químicas, ficando assim separadas fisicamente.

No GC, a fase móvel é uma corrente de gás (gás de arraste), sendo este geralmente inerte, que transporta a amostra ao longo da coluna até o detector. Em alguns casos, a eficiência da coluna, o tempo de análise, a sensibilidade do detector é determinada pelas propriedades do gás de arraste. Alguns fatores devem ser considerados na escolha do gás como disponibilidade, custo, efeito na separação, efeito no tempo de análise, efeito no sistema de detecção e segurança de operação.

Os gases de arraste mais comuns são hidrogênio, hélio, argônio, nitrogênio e dióxido de carbono. O fluxo de gás dentro do dispositivo de injeção de amostra é controlado pelo regulador de pressão e pela válvula medidora do gás.

A coluna em um GC é anexada à porta de injeção e as amostras são introduzidas na corrente de gás de arraste à temperatura suficiente para assegurar a vaporização de todos componentes. Usualmente, a amostra é introduzida com uma microseringa, que é forçada sobre um septo de silicone (elastômero resistente ao calor) na porta de injeção. Um detector anexado diretamente na saída da coluna monitora como os componentes individuais da amostra são eluídos na coluna.

O detector é um dispositivo que transforma em um sinal elétrico conveniente a variação de composição do gás de arraste ao sair da coluna cromatográfica. O sinal elétrico é registrado em forma de picos, formando assim um cromatograma.

O cromatograma contém os dados analíticos dos componentes da mistura. Os dados qualitativos aparecem no tempo de retenção característico de cada

componente. Este também é uma medida válida do desempenho e eficiência do sistema cromatográfico que o produziu. Algumas medidas simples feitas no cromatograma podem ser relacionadas a parâmetros teóricos do processo de separação e revela como a análise varia com a temperatura, a razão do gás de arraste e as características da coluna. Esses parâmetros podem ser calculados e utilizados como guia para operação da coluna e também para determinar as mudanças que podem ser feitas para a otimização do método de análise. O entendimento de sua base teórica e de sua parte física é um importante aspecto da cromatografia.

No diagrama apresentado na FIG. 2 podem ser visualizadas as principais partes componentes de um GC: cilindro de gás de arraste, controlador de fluxo do gás, injetor de amostra, coluna cromatográfica capilar, detector e registrador digital.

FIGURA 2. Diagrama básico de um cromatógrafo a gás mostrando seus principais componentes

4.4. Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas

A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) continua a ser a técnica mais efetiva para separação, detecção e caracterização de componentes de misturas orgânicas complexas [31], além de ser uma técnica razoavelmente de baixo custo e de fácil manipulação [34].

O GC-MS é basicamente composto por dois grandes dispositivos: o cromatógrafo a gás e o espectrômetro de massas. O cromatógrafo a gás utiliza uma coluna capilar, que depende de suas dimensões (comprimento, diâmetro, grossura da fase estacionária) assim como a composição da fase estacionária. A diferença nas propriedades químicas entre diferentes moléculas na amostra é que permite a separação das moléculas assim que a amostra se move ao longo da coluna. As moléculas têm diferentes quantidades de tempo (tempo de retenção) para eluir do cromatógrafo a gás, permitindo o espectrômetro de massas capturar, ionizar, acelerar, defletir e analisar as moléculas ionizadas separadamente. O espectrômetro de massas faz isso quebrando cada molécula em fragmentos ionizados e detectando esses fragmentos utilizando a massa para determinar a razão [35]

A combinação do GC com o espectrômetro de massas forma um instrumento capaz de separar misturas em seus componentes iniciais, identificando se então fornecendo informações quantitativas, qualitativas e a estrutura química de cada composto. O GC-MS comumente utilizado na análise de compostos orgânicos ou bioquímicos [36]

Existem diferentes possibilidades de configurações de um GC-MS, mas todas estas compartilham componentes similares. As amostras são introduzidas na coluna através de um inlet. Uma vez que a amostra está no inlet, a câmara de aquecimento atua para volatilizar a amostra. No sistema split, um constante fluxo de gás se move no inlet, permitindo que a amostra seja transportada para a coluna. Uma coluna capilar é comumente utilizada, pois todo o processo que ocorre no espectrômetro de massas deve ser executado a pressões muito baixas ($< 1\text{Pa}$) e para que isso ocorra, é necessária uma bomba turbomolecular para manter constante a pressão.

Após as moléculas se moverem ao longo da coluna, passam através da linha de transferência e entram no espectrômetro de massas, cujo tipo mais

comumente utilizado é o quadrupolar, elas são ionizadas por diferentes métodos. O método mais comum e possivelmente um método padrão de ionização é a ionização eletrônica. Uma vez que a amostra é fragmentada, ele é então detectada, usualmente por um diodo multiplicador de elétrons, que transforma o fragmento de massa ionizado em um sinal elétrico, que então é detectado.

O esquema de um GC-MS está apresentado na FIG. 3.

FIGURA 3. Esquema básico de um GC-MS

5. EXPERIMENTAL

5.1. Materiais e Métodos

5.1.1. Amostras Analisadas

Para a realização deste trabalho, foram obtidas canetas de diferentes países como Canadá, Espanha, Estados Unidos, Grécia, Japão e Peru. Foi assumido como local de fabricação da caneta, o país onde a mesma foi coletada.

Como as amostras obtidas no Brasil não possuem o 2-fenoxietanol como solvente, esta metodologia não será aplicável às canetas com essa origem.

5.1.2. Reagentes e Padrões

A acetonitrila utilizada para o preparo dos padrões e para a extração foi grau para análises e o o-cresol utilizado como padrão interno foi grau síntese (Merck, Darmstadt, Alemanha). O padrão de 2-fenoxietanol foi grau síntese (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA).

5.1.3. Instrumentação e Materiais

O equipamento utilizado neste trabalho foi um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) QP-5050A da Shimadzu. A coluna capilar utilizada foi uma CBP-5, com a fase estacionária contendo 5% de fenilmetilsiloxano da Shimadzu. Estes equipamentos pertencem ao Laboratório de Caracterização Química.

Para a extração das amostras, foi utilizado um agitador de tubos MK1 – Minishaker da Quimis.

5.1.4. Preparo dos Testemunhos

Para a realização dos experimentos, foram preparados testemunhos no próprio laboratório. Cada testemunho foi preparado utilizando-se uma caneta esferográfica proveniente de um país, riscando-se linhas paralelas com uma régua de acrílico de 30 cm de comprimento, em papel sulfite branco, tamanho A4, gramatura de 75 g/m².

5.1.5. Armazenamento dos Testemunhos

Com o objetivo de avaliar a influência dos fatores externos [18,27,37] na degradação do solvente, os testemunhos preparados foram armazenados em diferentes condições ambientais, sob luz artificial e na ausência de luz.

5.1.6. Preparo da Solução Padrão

Para estabelecer a curva analítica através da qual foram determinadas as concentrações elementares de interesse foi preparado um conjunto de soluções padrão, contendo o analito pesquisado nas concentrações de 0,175 a 4,0 mmol.L⁻¹.

Para a obtenção desse conjunto de soluções padrão, é necessária a diluição da solução original, até uma concentração intermediária, evitando, dessa forma, a manipulação de quantidade de material muito pequena, que resultaria em soluções finais com incertezas associadas muito elevadas.

A solução padrão de 2-fenoxietanol foi diluída até a concentração 0,093 mol.L⁻¹. Foram-se então transferidos para um frasco de vidro de 60 mL cerca de 0,56 g da solução original e seu peso completado para 47 g com acetonitrila.

5.1.7. Preparo da Solução Padrão Mãe

A TAB 3. apresenta as massas necessárias para obter a solução mãe do analito.

TABELA 3. Massa necessária para obter 47,3 g da solução mãe

Solução de Partida Mol.L ⁻¹	0,093
	Fenoxietanol
massa pesada (g)	0,773
massa final (g)	47,382
concentração final da solução mãe (mol.L ⁻¹)	0,002

5.1.8. Preparo do Padrão Interno

Neste trabalho foi utilizado como padrão interno o o-cresol, devido a similaridade de suas propriedades físico-químicas com o analito de interesse.

A solução padrão do o-cresol foi diluída até a concentração de $0,138 \text{ mol.L}^{-1}$. Foi transferido para um frasco de vidro de 60 mL cerca de 0,69 g da solução original e seu completado para 48 g com acetonitrila.

Uma solução secundária foi preparada, diluindo-se cerca de 0,27 g da solução inicial e seu peso completado para 20 g, obtendo-se uma solução com concentração igual a $0,0019 \text{ mol.L}^{-1}$.

5.1.9. Preparo da Solução para Extração

Para realizar o procedimento de extração, foi utilizada uma solução de acetonitrila mais o padrão interno.

As massas necessárias para obter a solução para a realização da extração das amostras estão apresentadas na TAB 4.

TABELA 4. Massa necessária para obter 20 g de solução para extração

Solução de Partida	$0,0019 \text{ Mol.L}^{-1}$
	o-Cresol
massa pesada (g)	1,88
massa final (g)	20
concentração final (mol.L^{-1})	0,0129

5.2. Método Proposto

5.2.1. Preparo das Amostras

A extração das amostras foi realizada segundo os seguintes procedimentos:

- 1) amostragem do testemunho realizada com um furador de metal de 1,5 mm de diâmetro interno, retirando-se cerca de 15 microdiscos.
- 2) transferência dos microdiscos para um vial de vidro de 2 mL contendo um vial secundário de 100 μ L
- 3) adição de 20 μ L de uma solução contendo o-cresol (padrão Interno) e acetonitrila.
- 4) agitação em agitador de tubos por cerca de 40 segundos.
- 5) repetição de adição de solução contendo padrão interno e acetonitrila e agitação por mais duas vezes, até completar 60 μ L e 2 minutos de agitação.

5.2.2. Verificações e Calibração do Espectrômetro de Massas

Previamente ao procedimento de calibração, algumas verificações devem ser executadas de forma a garantir a integridade do mesmo. Para verificar a existência de vazamentos no sistema GC-MS, monitoram-se a quantidade de ar e água através do software de controle “GCMSsolution Version 1.02 SU1”, monitorando os picos com m/z igual a 18 e m/z igual a 28, sendo estes da água e do nitrogênio respectivamente. Através do mesmo software de controle, verifica-se se o sistema de vácuo está trabalhando em uma pressão negativa adequada (< 1.0 Pa).

A calibração em si é um procedimento automático no qual o software de controle “GCMSsolution Version 1.02 SU1” executa algumas tarefas que levam à otimização da forma e intensidade dos picos cromatográficos. Este procedimento faz uso, em algumas etapas, do composto Perfluortributilamina (PFTBA), utilizado como substância de calibração pelo espectrômetro de massas. As seguintes funções são realizadas no procedimento de calibração:

- a) Verificam-se as concentrações de água e ar dentro do sistema.
- b) Verifica-se se o ganho do detector é 2kV ou menor.

- c) Realiza-se a calibração de massa. O programa automaticamente determina a relação entre a amplitude de voltagem de radiofrequência (RF) e os picos de massa do composto de calibração.

5.2.3. Condições Cromatográficas

Todas as amostras foram transferidas para o equipamento de GC-MS por injeção manual com uma seringa de 10 μ L da Hamilton (Bonduz, Switzerland). Uma alíquota de 2 μ L foi injetada no GC. A temperatura do injetor foi ajustada para 280°C e a temperatura da interface para 280°C. O fluxo de gás foi ajustado para 1.2 mL/min, no modo splitless. A temperatura do programa inicia-se a 50°C, com 1 minuto de retenção e aumentando a uma taxa de 10°C/min até 200°C, com 4 minutos de retenção. Na segunda fase a temperatura foi elevada a uma taxa de 25°C/min até 280°C, com retenção final de 4 minutos. O detector do espectrômetro de massas operou em modo scan, de 3.5 a 27.2 minutos. O detector foi programado para fazer uma varredura de compostos, abrangendo de 80 a 280 unidades de massa atômica (u)

6. QUANTIFICAÇÃO DO 2-FENOXIETANOL

6.1. Parâmetros para a Validação do Método Proposto

Validar um método é o processo de demonstrar que a seqüência analítica adotada é capaz de produzir resultados confiáveis e reprodutíveis. Dessa forma, um método analítico deve ser submetido a estudos laboratoriais que demonstrem que o mesmo atenda às exigências requeridas pelo tipo de determinação a que se destina.

A validação de uma metodologia analítica é fundamental para demonstrar a qualidade, confiabilidade e adequação ao propósito de um ensaio executado, permitindo uma comparação com valores similares encontrados na literatura.

Neste trabalho serão seguidas as recomendações Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos (DOQ-CGRE-008) [38], que discute os critérios utilizados na validação de um método analítico.

6.1.1 Linearidade

É a capacidade de um método em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A linearidade de um método consiste na proporcionalidade dos valores de tendência ao longo da faixa analítica estudada. É formulada como expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é apresentada na Eq.1.

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = Resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc)

x = Concentração

a = Inclinação da curva de calibração = sensibilidade

b = Interseção com o eixo y, quando x = 0

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. A correlação é, normalmente, calculada por intermédio do coeficiente r de Pearson ou pelo coeficiente de determinação, r^2 . Segundo Lanças [39] valores acima de 0,90 podem ser considerados satisfatórios, entretanto uma análise criteriosa da faixa de trabalho, dos erros de cada ponto da curva assim como os resíduos devem ser também levados em conta na interpretação final dos dados.

6.1.2. Limite de Detecção

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido pelo valor medido com confiabilidade maior do que a incerteza associada ao mesmo. O LDE é baseado na habilidade de distinguir entre sinal e ruído o valor obtido pelo equipamento analítico. [37]

O valor de LDE pode ser calculado como sendo o valor de três vezes desvio padrão da concentração do analito de interesse encontrada pela análise de soluções branco.

6.1.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de qualidade compatível com o objetivo da análise em execução. Pode ser considerado como sendo o valor correspondente a dez vezes o valor do desvio padrão da concentração do analito encontrada pela análise de soluções branco.

6.1.4. Precisão

Precisão é um termo utilizado para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio

da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão.

A repetitividade e a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida.

6.1.5. Repetitividade

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado nas mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições em curto espaço de tempo

6.1.6. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mesurando, efetuadas sob condições variadas de medição

6.1.7. Recuperação

A recuperação é uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente.

Estes estudos são efetuados adicionando-se soluções do padrão analítico de interesse de concentração conhecida à matriz isenta do analito. Efetuam-se as operações necessárias à recuperação do analito adicionado e o valor do analito é, então, determinado. Empregando-se esses valores na Eq. 2. apresentada a seguir, encontra-se a recuperação, ou seja, quanto do analito foi determinado no método.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

6.1.8. Robustez

A robustez de um método de ensaio é a capacidade do método de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método. A robustez mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar tolerâncias dos fatores do método.

6.1.9. Incerteza da medição

O resultado de uma medição é apenas uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando. Sendo assim, a representação completa desse mensurando deve incluir a incerteza de medição.

A palavra “incerteza” significa dúvida e assim, no sentido mais amplo, “incerteza de medição” significa dúvida sobre a qualidade do resultado de uma medição. A definição formal do termo incerteza de medição segundo o Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (VIM) é “parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando”.

A incerteza de medição da concentração de um analito em uma determinada matriz, por exemplo, é expressa na forma de desvio padrão, chamada de incerteza padrão. Entretanto, a incerteza total do método proposto é a soma de todas as incertezas geradas em cada passo do método pelos diversos componentes do processo de medição. Um experimento bem planejado pode, em muito, facilitar as avaliações confiáveis da incerteza e é um requisito importante na organização das atividades de medição.

O cálculo de incertezas associadas a técnicas cromatográficas depende da identificação de diversos parâmetros cromatográficos, que interferem na incerteza global do método proposto. Alguns parâmetros associados à determinação experimental podem influenciar nos estudos das incertezas, como a estabilidade do

detector, a temperatura da coluna, o fluxo de gás da fase móvel e etc. Os efeitos associados às pequenas mudanças nestes parâmetros podem influenciar na área e na altura dos picos cromatográficos da amostra e do padrão, podendo interferir em até 10% no cálculo final das incertezas associadas ao método. [8]

As incertezas associadas à determinação do 2-fenoxietanol serão calculadas utilizando-se como referência o Guia EURACHEM/CITAC [9], sobre a determinação da incerteza da medição analítica, considerando as diferenças existentes no estudo das incertezas associadas a métodos cromatográficos.

6.1.9.1. Diagrama de Causa e Efeito (Espinha de Peixe)

Para identificar as principais fontes de incertezas utiliza-se o Diagrama de Causa e Efeito, também conhecido como Diagrama de Ishiwaka ou Diagrama de Espinha de Peixe. O exame do diagrama pode levar à simplificação, seja agrupando as fontes de incerteza que podem ser consideradas em uma série de repetições, seja removendo termos duplicados. O diagrama simplificado pode, então, ser usado para assegurar que todas as fontes de incerteza foram levadas em conta. Os princípios da construção do Diagrama de Causa e Efeito estão descritos na norma NBR ISO 9004(2000) [40].

FIGURA 4. Diagrama de Causa e Efeito para o procedimento analítico na determinação do analito de interesse em amostras de tinta de caneta esferográfica

Como indicado na FIG. 4, as fontes de incerteza que contribuem na metodologia para a determinação do analito de interesse são os parâmetros associados à curva de calibração e os parâmetros associados à área do analito de interesse.

6.1.9.2. Incerteza Associada à Área do Analito

A incerteza para a área do analito é a combinação das incertezas da micropipeta utilizada na adição do padrão interno e da repetitividade da injeção da amostra no GC-MS.

Para a micropipeta utilizada na adição de padrão interno, o único dado fornecido pelo fabricante é a repetitividade em testes efetuados. Quando há um certificado ou limites especificando um limite de confiança, utiliza-se a distribuição retangular, portanto a incerteza para esses dados é obtida pela Eq. 3.

$$\mu_{fab} = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (3)$$

Onde:

a = repetitividade fornecida pelo fabricante da micropipeta (desvio padrão)

A Incerteza para a repetitividade de injeção no GC-MS é calculada pela Eq.4.

$$\mu_{repe} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

Onde:

S = desvio padrão das injeções

n = número de injeções realizadas

6.1.9.3. Incerteza Associada à Curva de Calibração

A incerteza para a curva de calibração é a combinação das incertezas da massa final da solução preparada, massa da solução original transferida para obter a solução padrão preparada e concentração ou pureza da solução original.

Para a obtenção da curva de calibração, prepararam-se duas soluções padrão a partir da solução original.

A incerteza *Solução 1* é obtida pela Eq 5.

$$\mu_{Solução} = C_{solução} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{Massa_solução}}{Massa_solução}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Massa_transferida}}{Massa_transferida}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Concentração_solução}}{Concentração_solução}\right)^2} \quad (5)$$

Onde:

$C_{Solução1}$ = concentração da solução preparada a partir da solução original

$Massa_solução$ = massa final da solução padrão diluída

$\mu_{Massa_solução}$ = incerteza da massa final da solução padrão preparada, calculada pela Eq. 6.

$$\mu_{\text{massa_solução}} = \sqrt{(\mu_{\text{repe}})^2 + (\mu_{\text{cert_balança}})^2} \quad (6)$$

Onde:

μ_{repe} = incerteza da repetitividade da balança utilizada (gráfico de controle obtidos no laboratório, pela calibração diária da balança com pesos calibrados)

$\mu_{\text{Cert_balança}}$ = incerteza fornecida pelo certificado da balança

Massa_transferida = massa da solução original transferida para obtenção da solução padrão diluída.

$\mu_{\text{Massa_transferida}}$ = incerteza da massa da solução original transferida, obtida pela Eq. 7

$$\mu_{\text{massa_transferida}} = \sqrt{(\mu_{\text{micropipeta}})^2 + (\mu_{\text{repe}})^2} \quad (7)$$

Onde:

μ_{repe} = incerteza da repetitividade da balança utilizada (gráfico de controle)

$\mu_{\text{micropipeta}}$ = incerteza da micropipeta utilizada, obtida pela Eq. 8.

$$\mu_{\text{micropipeta}} = \frac{M_{\text{Transf}} \times \mu_{\text{repe_certificado}}}{\sqrt{3}} \quad (8)$$

Onde:

M_{Transf} = massa transferida da solução original

$\mu_{\text{repe_certificado}}$ = repetitividade da micropipeta informada no certificado do fabricante

Concentração_solução = Concentração da solução original

$\mu_{\text{Concentração_solução}}$ = Concentração ou pureza da solução original, calculada pela Eq. 9.

$$\mu_{\text{Concentração_solução}} = \frac{C_{\text{original}} \times V_{\text{impurezas}}}{\sqrt{3}} \quad (9)$$

Onde:

C_{original} = Concentração da solução original

$V_{\text{impurezas}}$ = Impurezas presentes na solução original

A incerteza *Solução 2* é obtida pela Eq. 10, onde alguns valores calculados anteriormente serão substituídos na equação a seguir.

$$\mu_{\text{Solução2}} = C_{\text{solução2}} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{\text{massa_solução}}}{\text{Massa_solução}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{Massa_transferida}}}{\text{Massa_transferida}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{Concentração_solução1}}}{\text{Concentração_solução1}}\right)^2} \quad (10)$$

Massa_solução = massa final da solução padrão diluída

$\mu_{\text{Massa_solução}}$ = incerteza da massa final da solução padrão preparada

Massa_transferida = massa da solução original transferida para obtenção da solução padrão diluída.

$\mu_{\text{Massa_transferida}}$ = incerteza da massa da solução original transferida

$\text{Concentração_solução1}$ = Concentração da solução padrão diluída 1

$\mu_{\text{Concentração_solução1}}$ = incerteza calculada para a solução 1

6.1.9.4. Incerteza total do método

A Incerteza total do método é soma das incertezas relativas de cada fonte de contribuição das fontes principais: área do analito e curva de calibração e é calculada a partir da Eq 11.

$$\mu_{C_{GC}} = C_{GC} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{Co}}{Co}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{solução1}}}{\text{solução1}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{solução2}}}{\text{solução2}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{padrão interno}}}{\text{padrão interno}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{repe}}}{\text{repe}}\right)^2} \quad (11)$$

7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1. Validação do Método Proposto

7.1.1 Linearidade

Qualquer amostra de tinta analisada pela técnica de GC-MS no laboratório é precedida da análise de um conjunto de soluções padrão em diferentes concentrações com adição de padrão interno, produzindo um gráfico com resultados obtidos para a área do pico do padrão pela área do pico do padrão interno versus concentração de cada solução padrão e dessa maneira uma expressão matemática, na forma de equação da reta, que relaciona as duas variáveis é obtida como $y = ax + b$.

Com a análise de testemunhos de diferentes origens, verificou-se que a faixa de concentração em que se encontram é muito variada, portanto produziram-se duas curvas analíticas, para as concentrações mais altas e outra para as concentrações mais baixas

O desvio padrão relativo (RSD) é calculado a partir da Eq. 12.

$$RSD = \frac{100 \times s}{\bar{x}} \quad (12)$$

Onde:

S = Desvio padrão das concentrações obtidas

$\bar{x}$ = Valor médio das concentrações obtidas

As TAB. 5 e 6 apresentam as equações da reta obtidas, acompanhada com o coeficiente de correlação linear (r), para a curva analítica do padrão para as concentrações compreendidas entre 4,0 a 1,25 mmol.L⁻¹ e 1,0 a 0,175 mmol.L⁻¹.

TABELA 5. Linearidade obtida para o analito em concentrações compreendidas entre 4,0 a 1,25 mmol.L⁻¹.

Equação da reta	Coeficiente de correlação linear (r)	Concentração teórica de 2-fenoxietanol (mmol.L ⁻¹)	Concentração de 2-fenoxietanol calculada (mmol.L ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)
$y = 1,689x - 0,5708$	0,9995	4,0	4,17	14,24
		3,5	3,49	3,61
		2,5	2,5	5,69
		1,25	1,26	10,13

TABELA 6. Linearidade obtida para o analito em concentrações compreendidas entre 1,0 a 0,175 mmol.L⁻¹.

Equação da reta	Coeficiente de correlação linear (r)	Concentração teórica de 2-fenoxietanol (mmol.L ⁻¹)	Concentração de 2-fenoxietanol calculada (mmol.L ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)
$y = 1,326x - 0,2213$	0,9948	1,0	1,0	3,61
		0,75	0,76	3,95
		0,5	0,5	10,34
		0,35	0,35	6,22
		0,175	0,175	12,16

7.1.2. Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) foi calculado seguindo a teoria, previamente apresentada no item 6.1.2., onde o LD pode ser calculado através na equação $LD = 3S_0$, sendo S_0 o desvio padrão da média das concentrações do analito nas soluções branco.

A razão média entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno foi determinada através da análise de soluções branco com adição de padrão interno, e a partir deste valor, foi obtida a concentração média do analito nas soluções branco e o desvio padrão médio destas concentrações obtidas.

O valor de LD é apresentado na TAB. 7.

TABELA 7. Limite de detecção calculado para o método proposto

Razão média entre área do analito e área do padrão interno	Desvio padrão da média das concentrações	LD ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
0,002	0,089	0,269

7.1.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão.

Através da determinação da concentração do analito de interesse nas soluções branco, podemos determinar o LQ, que por definição é 10 vezes o valor do desvio padrão da média das concentrações do analito nas soluções branco, representado por $10S_0$, onde S_0 é o valor do desvio padrão.

O valor de LQ é apresentado na TAB. 8 a seguir.

TABELA 8. Limite de quantificação para o método proposto

Desvio padrão da média das concentrações obtidas	LQ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
0,089	0,897

7.1.4. Precisão

Como descrito anteriormente, a precisão pode ser expressa por meio da repetitividade. O cálculo da repetitividade instrumental será representado no item 7.1.4.1.

7.1.4.1. Repetitividade

Para o cálculo da repetitividade do método, foram preparadas soluções do padrão em diferentes concentrações, e estas analisadas diversas vezes, de forma sucessiva, da mesma solução. Com os desvios padrões obtidos para cada concentração, calcula-se o desvio padrão de repetitividade, pela Eq. 3.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} 100 \quad (3)$$

Onde: DP= desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

Os resultados obtidos para o cálculo da repetitividade estão apresentados na TAB. 9.

TABELA 9. Resultados óbitos pelo cálculo da repetitividade

Concentração da solução analisada (mmol.L ⁻¹)	Número de determinações (n)	Desvio padrão da concentração (mmol/L)	Desvio padrão da repetitividade (%)
3,50	10	0,038	3,46
1,25	10	0,027	11,42
0,75	10	0,011	14,24

7.1.5. Recuperação

O estudo da recuperação foi realizado adicionando-se soluções do padrão analítico de interesse de concentração conhecida à matriz isenta do analito, que contém apenas o solvente e o padrão interno. Foram efetuadas adições do padrão em três concentrações diferentes, e os valores obtidos estão apresentados a seguir.

TABELA 10. Resultado da recuperação do padrão de 2-fenoxietanol

Concentração adicionada (mmol.L ⁻¹)	Concentração determinada (mmol.L ⁻¹)	Recuperação (%)
3,50	3,06	84,98
1,25	1,30	105,37
0,75	0,96	113,30

Os valores obtidos na TAB. 10 estão de acordo com os procedimentos analíticos de validação encontrados na teoria, que determina que os valores de recuperação dentro da faixa 70-120% são aceitos. [39]

7.1.6. Robustez

A robustez de um método de ensaio é a capacidade do método de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método. A robustez mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar tolerâncias dos fatores do método.

Em alguns parâmetros da metodologia proposta foram feitas pequenas variações, para verificar sua eficiência, sendo estes o tempo de extração da amostra, a quantidade de solvente empregado na extração e a quantidade de amostra para o processo de extração. Estas variações e seus resultados são apresentados a seguir.

7.1.6.1. Tempo de extração

O tempo de extração da amostra de tinta pode influenciar na quantidade de amostra e de solvente extraídos. Foram verificadas as concentrações do analito estudado com diferentes tempos de agitação, no processo de extração. Os resultados estão apresentados na TAB. 11

TABELA 11. Concentração do analito extraído em diferentes tempos de extração

Tempo de extração (min)	Concentração de 2- fenoxietanol (mmol.mm ⁻²)
1	0,0088
2	0,0185
4	0,0187
6	0,0188
8	0,0193

Como pode ser observado, com o aumento do tempo de extração, aumenta a eficácia de extração do analito de interesse. Porém, como o método proposto visa o desenvolvimento de um método rápido e eficiente para a análise, foi determinado que 2 minutos de extração da amostra é eficaz para os objetivos propostos.

7.1.6.2. Quantidade de amostra

As amostragens de tinta são retiradas dos testemunhos utilizando-se um furador de 1,5 mm de diâmetro interno e para verificar a influência da quantidade de amostra inicial na eficiência da extração, foram feitas análises com diferentes quantidades de amostra (microdiscos), mantendo o mesmo volume de solvente, conforme pode ser verificado na TAB. 12.

TABELA 12. Variação da concentração do analito extraído em função da quantidade inicial de amostra

Quantidade de amostra (microdiscos)	Concentração de 2- fenoxietanol (mmol.L ⁻²)
5	
10	0,0082
15	0,0187
30	0,0195

Pode-se observar que com o aumento da quantidade de amostra, obtêm-se um aumento não linear da quantidade do analito extraída. A metodologia proposta visa o desenvolvimento de um método aplicável à rotina de um laboratório forense. Na maioria dos casos enfrentados onde é necessária a utilização de um método destrutivo, o analista visa minimizar a destruição do documento. Para esta metodologia, utilizou-se a menor quantidade de amostra possível para a produção de resultados confiáveis, com amostragem de 15 microdiscos do testemunho produzido.

7.1.6.3. Quantidade de solvente

A variação da quantidade de solvente para efetuar a extração foi verificada, em função da qualidade de extração, verificando a concentração do analito extraído das amostras de tinta.

Foram realizadas 5 extrações com volumes diferentes de solvente, como pode ser observado na TAB. 13.

TABELA 13. Resultados da concentração de 2-fenoxietanol obtidas com a variação do volume de solvente

Volume de solvente (μL)	Concentração de 2-fenoxietanol (mmol.L^{-2})
20	0,0309
40	0,0215
60	0,0187
80	0,0090
100	0,0074

Observa-se que à medida que se aumenta o volume de solvente ocorre uma correspondente diluição do analito extraído. Entretanto, optou-se em utilizar o volume de $60\mu\text{L}$ de solvente para o preparo das amostras, pois volumes muito pequenos de solução dificultam a retirada do volume a ser injetado no equipamento conforme o método proposto.

7.1.7. Fontes de Incertezas e Suas Respectivas Incertezas Padrão

A Incerteza do resultado final foi estimada pela combinação das componentes descritas na TAB. 14

TABELA 14. Valores intermediários e incertezas na determinação de 2-fenoxietanol

Fontes de Incerteza	Valor (X_i)	Incerteza $u(X_i)$	Incerteza Relativa $u(X_i)/X_i$
Concentração na alíquota (mmol.mm ⁻²)	1,5944	0,0789	0,0494857
Solução 1(mol.L ⁻¹)	0,093	0,005	0,053763441
Solução 2 (mol.L ⁻¹)	0,00152	0,000082	0,053947368
Padrão interno (µL)	60	0,035	0,000583333
Repetitividade	2,49	0,0873	0,035060241
Concentração $\pm$ incerteza expandida (mmol mm ⁻²); K=2, 95% nível de confiança			
$C_{GC} = 1,5944 \pm 0,3105$			

Como pode ser observado na FIG.5, as fontes de incerteza que mais contribuem no valor da incerteza final são os valores correspondentes ao preparo das soluções padrão diluídas 1 e 2, sendo o valor referente à incerteza da micropipeta utilizada na adição do padrão interno, de menor influência.

FIGURA 5. Contribuição individual das fontes de incerteza na incerteza final para 2-fenoxietanol

Os resultados obtidos permitem a análise do fator fundamental relacionado à qualidade de um resultado analítico. A curva analítica utilizada para essa metodologia apresenta uma faixa de concentração bem ampla ($3,5 - 0,175 \text{ mmol.L}^{-1}$), necessária para quantificação das amostras no momento de aplicação no papel, com níveis mais elevados, e após a degradação quase total do solvente, com níveis próximos aos limites de detecção e quantificação.

Para as amostras com níveis mais elevados, a incerteza final está em torno de 19%. Ao se aproximarem dos limites inferiores da curva analítica, o valor da incerteza pode chegar a 100%. Observa-se aqui uma característica importante e muito comum em trabalhos analíticos de rotina.

Para uma melhora significativa dos valores da incerteza, pode-se utilizar uma curva analítica com uma faixa mais adequada às concentrações do analito e/ou preparar as amostras em concentrações mais elevadas, afastando-se dos limites de detecção e quantificação do método, cabendo essa decisão ao analista [41]

7.2. Estudo da Degradação do Solvente

Um estudo preliminar foi realizado com todas as canetas esferográficas obtidas para identificar o principal solvente utilizado na fabricação destas canetas. Após esta caracterização, foram preparados os testemunhos, conforme descrito anteriormente, utilizando todas as amostras de canetas esferográficas. O cromatograma obtido pela análise do solvente pode ser observado na FIG. 6

FIGURA 6. Cromatograma obtido pela análise de amostra de tinta de caneta esferográfica contendo 2-fenoxietanol e o padrão interno adicionado, 0-cresol

Imediatamente após a aplicação da tinta no papel, uma amostragem foi realizada para análise (dia 0), conforme a metodologia proposta. Os resultados obtidos com a análise das amostras do dia 0 produziram um perfil cromatográfico significativo [5], portanto a quantificação do 2-fenoxietanol pode ser realizada. Para as amostras do dia 0, a concentração de 2-fenoxietanol obtida foi cerca de 0,0763 mmol.mm⁻², como pode ser observada na TAB. 15.

TABELA 15. Concentração de 2-fenoxietanol, em $\text{mmol} \cdot \text{mm}^{-2}$ imediatamente após aplicação da tinta, de diferentes países, no papel.

País	Sob Luz Artificial	Ausência de Luz
Estados Unidos	0,0674	0,0684
Canadá	0,0564	0,0403
Espanha	0,0755	0,0860
Japão	0,1486	0,1255
Peru	0,0850	0,0750
Grécia	0,0427	0,0553

As diferenças na concentração do 2-fenoxietanol observada nas amostras de uma mesma caneta podem ser explicadas, segundo estudo realizado por Lociciro et al. (2004), pela diferença da aplicação da tinta no papel (grossura da linha), pelo mecanismo de evaporação do solvente, e pelo erro na amostragem do testemunho para a análise.

Os estudos preliminares realizados demonstraram que há uma evaporação contínua do solvente ao longo do tempo e uma grande quantidade do solvente é degradado nos primeiros dias de aplicação na tinta no papel.

A partir desses resultados, dois testemunhos foram preparados para cada país e como propostos anteriormente, estes foram armazenados em diferentes condições. Um testemunho foi armazenado sob luz artificial e um testemunho foi armazenado na ausência de luz.

Todos os testemunhos foram preparados e analisados conforme os métodos descritos anteriormente, e os resultados demonstraram que a maior parte do solvente, cerca de 92%, se degrada nos primeiros cinco dias após a aplicação da tinta no papel, conforme TAB. 16

TABELA 16. Porcentagem de degradação do solvente após cinco dias de aplicação da tinta no papel, em relação à concentração inicial (dia 0).

País	Degradação do solvente sob luz artificial (%)	Degradação do solvente em ausência de luz (%)
Estados Unidos	89,0	86,9
Canadá	87,3	84,9
Espanha	96,9	97,2
Japão	96,0	93,4
Peru	92,6	92,7
Grécia	93,8	96,5

Foram realizadas análises periódicas dos testemunhos preparados, com o objetivo de verificar a degradação do solvente ao longo do tempo. Com os valores obtidos pelas análises realizadas, foram construídas curvas de decaimento do solvente para cada país, para os testemunhos armazenados sob luz artificial.

Visando verificar a qualidade dos resultados obtidos com a análise dos testemunhos, as análises referentes a 140 e 280 dias foram feitas em triplicata, ou seja, análise de três amostras diferentes de um mesmo testemunho para verificar a repetitividade da metodologia, e o desvio padrão calculado e o valor adicionado à curva de degradação do solvente. As curvas obtidas podem ser verificadas nas FIG. 7 a 12.

FIGURA 7. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica dos Estados Unidos e armazenado sob luz artificial

FIGURA 8. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Canadá e armazenado sob luz artificial

FIGURA 9. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Peru e armazenado sob luz artificial

FIGURA 10. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Japão e armazenado sob luz artificial

FIGURA 11. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica da Espanha e armazenado sob luz artificial.

FIGURA 12. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica da Grécia e armazenado sob luz artificial.

Os testemunhos armazenados na ausência de luz também foram analisados periodicamente, e com os valores obtidos, foram construídas curvas de decaimento do solvente, estando apresentadas nas FIG. 13 a 18.

FIGURA 13. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica dos Estados Unidos e armazenado na ausência de luz.

FIGURA 14. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Canadá e armazenado na ausência de luz.

FIGURA 15. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Peru e armazenado na ausência de luz.

FIGURA 16. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica do Japão e armazenado na ausência de luz.

FIGURA 17. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica da Espanha e armazenado na ausência de luz.

FIGURA 18. Representação gráfica dos resultados obtidos para a concentração de 2-fenoxietanol em relação ao tempo de preparo, no testemunho preparado com caneta esferográfica da Grécia e armazenado na ausência de luz.

Através das representações gráficas apresentadas, pode-se observar que canetas esferográficas obtidas de países diferentes possuem a mesma tendência e decaem em direção a um limite similar, mesmo que estas sejam de marcas diferentes. Isso se deve ao 2-fenoxietanol ter comportamento semelhante em todas as tintas analisadas.

Segundo os resultados obtidos, pode-se observar que diferentes tipos de armazenagem dos testemunhos tendem a influenciar pouco no processo de degradação do solvente. Os testemunhos armazenados sob luz artificial apresentaram degradação do solvente em torno de 98% e os armazenados na ausência de luz apresentaram cerca de 96% de degradação em relação a concentração inicial, ou seja, quando a tinta foi aplicada no papel, como pode ser observado na TAB. 17

TABELA 17. Degradação do solvente após 280 dias em relação à concentração inicial (dia 0)

País	Degradação do solvente sob luz artificial (%)I	Degradação do solvente em ausência de luz (%)
Estados Unidos	97,8	93,6
Canadá	99,7	92,1
Espanha	98,4	99,5
Japão	99,3	96,3
Peru	97,8	96,1
Grécia	96,8	98,2

7.3. Determinação da recentidade

As representações gráficas do decaimento do solvente fornecem uma função logarítmica, que pode ser utilizada para calcular o tempo em que a entrada no testemunho foi realizada, ao fornecer o valor da concentração do 2-fenoxietanol encontrada na análise.

Nas TAB. 18 e 19 estão apresentadas as equações obtidas na curva, para cada país de origem do testemunho, em função do armazenamento.

TABELA 18. Equações fornecidas pelas curvas de degradação do solvente de cada país, nos testemunhos armazenados sob luz artificial

País	Equação
Estados Unidos	$y = -0,0015\ln(x) + 0,0180$
Canadá	$y = -0,0016\ln(x) + 0,0183$
Peru	$y = -0,0016\ln(x) + 0,0186$
Japão	$y = -0,0015\ln(x) + 0,0180$
Espanha	$y = -0,0003\ln(x) + 0,0121$
Grécia	$y = -0,0003\ln(x) + 0,0120$

TABELA 19. Equações fornecidas pelas curvas de degradação do solvente de cada país, nos testemunhos armazenados na ausência de luz.

País	Equação
Estados Unidos	$y = -0,0008\ln(x) + 0,0170$
Canadá	$y = -0,0008\ln(x) + 0,0170$
Peru	$y = -0,0008\ln(x) + 0,0169$
Japão	$y = -0,0008\ln(x) + 0,0170$
Espanha	$y = -0,0005\ln(x) + 0,0133$
Grécia	$y = -0,0005\ln(x) + 0,0132$

Segundo os dados obtidos neste experimento, existe uma similaridade entre as equações obtidas pelos resultados dos testemunhos analisados preparados com canetas provenientes dos Estados Unidos, Canadá, Peru e Japão. Os testemunhos provenientes da Espanha e Grécia apresentaram um comportamento distinto. Portanto, para melhor qualidade da análise dos resultados, estes serão divididos em dois grupos, grupo 1 e grupo 2, respectivamente.

Devido ao fato das equações propostas para a determinação da recentidade da tinta em cada grupo possuir essa similaridade, a substituição no termo da equação referente às concentrações obtidas é pertinente, para verificar se estas poderão ser utilizadas futuramente para a finalidade proposta.

Os cálculos para os países com origem no grupo 1, para os testemunhos armazenados sob luz artificial estão apresentados nas TAB. 20 a 23.

TABELA 20. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0.0015\ln(x) + 0.0180$ de origem dos Estados Unidos e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Canadá (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Peru (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Japão (dias)	Variação (%)
1	0,6	40	0,6	35	0,7	31
2	1,1	44	1,3	36	1,6	20
3	2,1	32	1,5	49	2,5	18
4	4,9	23	3,2	20	3,2	20
5	6,0	21	5,1	2	7,6	53
20	27,2	36	23,1	15	29,2	46
40	37,0	7	42,5	6	38,2	5
60	73,6	23	54,7	9	61,0	2
140	134,6	5	106,5	25	138,1	2
230	171,5	26	200,9	13	186,0	19
280	199,6	29	219,8	22	215,0	23

Calculando-se a idade da tinta a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem dos Estados Unidos, obteve-se um resultado consistente para os países Canadá, Peru e Japão com variação média do resultado em torno de 23%.

TABELA 21. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0016\ln(x) + 0,0180$ de origem do Canadá e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Estados Unidos (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Peru (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Japão (dias)	Variação (%)
1	1,0	2	0,8	20	0,8	15
2	2,0	0	1,5	24	1,9	6
3	2,1	29	1,8	41	2,8	6
4	3,1	21	3,6	10	3,6	10
5	5,0	0	5,6	11	8,1	62
20	20,4	2	22,9	14	28,5	42
40	30,5	24	40,5	1	36,7	8
60	69,1	15	51,4	14	56,9	5
140	114,0	19	158,1	12	122,5	13
230	163,9	29	174,0	25	161,8	30
280	201,8	28	189,3	32	185,4	34

Calculando-se a idade da tinta a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem do Canadá, obteve-se um resultado consistente para os países Estados Unidos, Peru e Japão com variação média do resultado em torno de 18%.

TABELA 22. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0016\ln(x) + 0,0186$ de origem do Peru e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Estados Unidos (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Canadá (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Japão (dias)	Variação (%)
1	1,2	23	0,9	10	1,0	2
2	2,4	20	1,6	19	2,3	13
3	2,6	15	2,9	5	3,4	13
4	3,8	5	5,5	37	4,4	9
5	6,0	20	7,8	57	6,8	36
20	24,5	23	32,2	61	34,4	72
40	36,8	8	43,0	7	44,2	11
60	83,3	39	71,8	20	68,6	14
140	137,6	2	144,1	2	147,7	5
230	197,7	14	192,6	17	195,2	15
280	243,4	13	208,6	26	223,6	20

A partir da equação proveniente da curva de degradação de origem do Peru, calculou-se a idade da tinta e obteve-se um resultado consistente para os países Estados Unidos, Canadá e Japão com variação média do resultado em torno de 20%.

TABELA 23 Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0015\ln(x) + 0,0180$ de origem do Japão e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Estados Unidos (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Canadá (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Peru (dias)	Variação (%)
1	0,8	16	0,6	40	0,6	35
2	1,7	15	1,1	44	1,3	36
3	1,8	39	2,1	32	1,5	49
4	2,8	30	4,9	23	3,2	20
5	4,5	9	6,0	21	5,1	2
20	20,4	2	27,2	36	23,1	15
40	31,4	21	37,0	7	42,5	6
60	75,0	25	73,6	23	54,7	9
140	128,0	9	134,6	5	181,5	29
230	188,5	18	183,3	21	200,9	13
280	235,3	16	299,6	7	219,8	22

O cálculo feito a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem do Japão para os países Estados Unidos, Canadá e Peru forneceram resultados consistentes, com variação média em torno de 21% em relação ao valor teórico.

Nas TAB. 24 e 25 estão apresentados os cálculos para os países com origem no grupo 2, para os testemunhos armazenados sob luz artificial.

TABELA 24. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0003\ln(x) + 0,0121$ de origem da Espanha e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Grécia (dias)	Variação (%)
1	1,7	74
2	2,6	29
3	3,4	14
4	3,8	4
5	6,7	34
20	25,2	26
40	46,7	17
60	60,3	0
140	153,9	9
230	216,9	6
280	367,4	31

O cálculo feito a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem da Espanha para a Grécia forneceu resultados consistentes, com a variação média em torno de 22% em relação ao valor teórico.

Tabela 25. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0003\ln(x) + 0,0120$ de origem da Grécia e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Espanha (dias)	Variação (%)
1	0,7	34
2	0,8	61
3	2,4	19
4	3,4	14
5	5,1	2
20	23,1	15
40	39,7	1
60	73,5	22
140	130,5	7
230	228,1	1
280	398,7	42

O cálculo feito a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem da Grécia para Espanha forneceu resultado similar ao cálculo feito a partir da equação de origem da Espanha, pois ambas são iguais, portanto a variação média calculada foi em torno de 20% em relação ao valor teórico.

Para os testemunhos armazenados na ausência de luz, a degradação do solvente é diferente. Portanto as equações obtidas pelas curvas de degradação para cada país de origem da caneta esferográfica são diferentes. Nesses testemunhos, a Espanha e a Grécia também apresentaram um comportamento diferenciado. Por essa razão, manteve-se a separação dos testemunhos em dois grupos, sendo o grupo 1, consistido pelos países Estados Unidos, Canadá, Peru e Japão, e o grupo 2, pela Espanha e Grécia.

Nas TAB. 26 a 29 serão apresentados os cálculos para os países com origem no grupo 1

TABELA 26. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,00081\ln(x) + 0,0170$ de origem dos Estados Unidos e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico do tempo (dias)	Valor calculado para Canadá	Variação (%)	Valor calculado para Peru	Variação (%)	Valor calculado para Japão	Variação (%)
1	0,9	8,1	1,8	82,4	0,5	54,9
2	1,5	26,2	2,1	5,8	2,5	24,1
3	2,2	27,5	2,5	17,2	3,4	12,9
4	4,4	9,5	5,0	25,7	4,0	1,1
5	5,1	1,4	5,6	12,6	5,0	0,0
20	19,8	1,0	23,6	18,0	19,1	4,3
40	34,8	13,0	55,4	38,5	42,5	6,3
60	55,6	7,4	62,3	3,8	65,1	8,4
140	137,4	2,6	115,5	18,1	120,5	14,5
230	221,3	4,2	161,1	30,2	182,6	20,9
280	293,9	5,0	188,6	32,6	242,1	13,5

Calculando-se a idade da tinta a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem dos Estados Unidos, obtiveram-se resultados consistentes para os países Canadá, Peru e Japão, com variação média do resultado em torno de 26% para o Peru, e em torno de 12% para o Canadá e Japão.

TABELA 27. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0008\ln(x) + 0,0170$ de origem do Canadá e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Estados Unidos (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Peru (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Japão (dias)	Variação (%)
1	0,7	26	0,6	41	0,5	0,7
2	1,7	17	2,4	20	2,8	1,7
3	4,5	51	2,8	6	3,8	4,5
4	6,4	59	5,7	42	4,6	6,4
5	6,9	38	6,4	28	5,7	6,9
20	17,1	15	26,7	34	21,7	17,1
40	30,7	23	49,2	23	48,2	30,7
60	58,1	3	70,6	18	73,7	58,1
140	118,5	16	130,8	7	136,6	118,5
230	248,9	8	182,6	21	206,9	248,9
280	285,1	2	213,8	24	274,4	285,1

Com o cálculo da idade da tinta a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem do Canadá, obtiveram-se resultados consistentes para os países Estados Unidos, Peru e Japão com variação média do resultado em torno de 23% em relação ao valor teórico.

TABELA 28. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0008\ln(x) + 0,0169$ de origem do Peru e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Estados Unidos (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Canadá (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Japão (dias)	Variação (%)
1	0,7	35	0,9	8	0,5	55
2	1,5	26	1,5	26	2,5	24
3	4,0	33	2,2	27	3,4	13
4	5,6	41	4,4	9	4,0	1
5	6,1	22	5,1	1	5,0	0
20	15,1	25	19,8	1	19,1	4
40	27,1	32	34,8	13	42,5	6
60	51,3	14	55,6	7	65,1	8
140	104,6	26	137,4	3	120,5	15
230	219,7	5	221,3	4	182,6	21
280	251,6	10	293,9	5	242,1	14

Calculando-se a idade da tinta a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem do Peru, obtiveram-se resultados consistentes para os países Estados Unidos, Canadá e Japão, com variação média do resultado em torno de 24% para os Estados Unidos, e em torno de 12% para o Canadá e Japão.

Os resultados foram similares aos obtidos a partir da equação proveniente dos Estados Unidos, já que o Peru obteve resultado similar ao valor obtido para os Estados Unidos, como pôde ser observado anteriormente.

TABELA 29. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0008\ln(x) + 0,0170$ de origem do Japão e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Estados Unidos (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Canadá (dias)	Variação (%)	Valor calculado para Peru (dias)	Variação (%)
1	0,7	26	1,0	4	0,6	41
2	1,7	17	1,7	16	2,4	20
3	4,5	51	2,5	18	2,8	6
4	6,4	59	5,0	24	5,7	42
5	6,9	38	5,7	15	6,4	28
20	17,1	15	22,4	12	26,7	34
40	30,7	23	39,4	1	49,2	23
60	58,1	3	63,0	5	70,6	18
140	118,5	16	155,7	10	130,8	7
230	248,9	8	250,7	9	182,6	21
280	285,1	2	333,0	19	213,8	24

Para a equação proveniente da curva de degradação de origem do Japão, os resultados da variação dos Estados Unidos e Peru apresentaram variação média em torno de 23% e 24% respectivamente, sendo esses resultados consistentes com os anteriormente apresentados. Para o Canadá, a variação foi em torno de 12%, o que condiz com os resultados prévios.

Nas TAB. 30 e 31 estão apresentados os cálculos para os países com origem no grupo 2, para os testemunhos armazenados na ausência de luz.

TABELA 30. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0005\ln(x) + 0,0133$ de origem da Espanha e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Grécia (dias)	Variação (%)
1	1,4	37
2	2,2	12
3	3,4	12
4	4,1	1
5	6,3	26
20	25,0	25
40	46,8	17
60	57,9	3
140	136,1	3
230	263,5	14
280	330,5	18

O cálculo feito a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem da Espanha para Grécia forneceu resultado similar aos previamente apresentados, com a variação calculada em torno de 15% em relação ao valor teórico.

TABELA 31. Determinação do tempo dos testemunhos analisados através da utilização da equação $y = -0,0005\ln(x) + 0,0132$ de origem da Grécia e a variação dos resultados em relação ao valor teórico.

Valor teórico tempo (dias)	Valor calculado para Espanha (dias)	Variação (%)
1	0,5	49
2	1,1	44
3	2,0	32
4	5,4	34
5	6,7	34
20	17,9	10
40	33,4	16
60	58,0	3
140	115,2	18
230	181,4	21
280	275,5	2

Para o cálculo feito a partir da equação proveniente da curva de degradação de origem da Grécia, com os resultados obtidos na análise dos testemunhos da Espanha, o resultado da variação do valor calculado em relação ao teórico ficou em torno de 24%, estando assim consistente com os valores apresentados anteriormente.

8. CONCLUSÃO

A utilização do GC-MS para a realização deste trabalho permitiu a identificação e a quantificação do principal solvente utilizado na formulação de grande parte das tintas de caneta esferográfica, sendo este tipo o principal foco do trabalho, já que é o tipo de caneta mais utilizada comumente.

Com a identificação do 2-fenoxietanol como o solvente utilizado na formulação de todas as canetas obtidas pelo laboratório pôde-se então iniciar o estudo da degradação do solvente nos testemunhos preparados.

A análise periódica dos testemunhos demonstraram que cerca de 88% do solvente degrada um dia após a aplicação da tinta no papel. Cerca de cinco dias após a aplicação, ocorre grande parte da degradação do solvente, e após esse período, o decaimento se torna vagaroso.

A influência do tipo de armazenamento do testemunho na degradação do solvente está de acordo com outros trabalhos descritos na literatura, confirmando uma maior porcentagem de degradação nos testemunhos armazenados sob luz artificial em relação aos armazenados na ausência de luz. A influência de outros fatores ambientais nos testemunhos não foi possível de ser concluído, tornando-se objeto para estudos posteriores.

Com os resultados obtidos nesse experimento para decaimento da concentração do solvente nas amostras, foram obtidas curvas da degradação do solvente em relação ao tempo para cada amostra de países de origem diferentes. A partir das curvas, foram obtidas equações logarítmicas, com o objetivo de propor equações que possam ser utilizadas para determinar a idade relativa de uma entrada de tinta no papel.

As equações propostas demonstraram ser capazes de distinguir o quão recente a tinta de caneta esferográfica foi aplicada no papel, com cerca de 20% de variação do resultado em relação à idade teórica da tinta.

Os principais fatores que podem influenciar essa variação do resultado são a consistência na aplicação da tinta no papel, a variação na amostragem, o preparo das amostras, a origem da caneta, já que se assumiu como país de origem o mesmo da fabricação, a degradação da tinta na própria caneta e a falta de análises em

períodos maiores de tempo, Estes resultados estão de acordo com a incerteza calculada, que está em torno de 19%.

O cálculo da estimativa de incerteza associada ao processo de medição permitiu a compreensão de cada etapa do procedimento analítico e a identificação das fontes de incertezas possibilitando assim melhorias ou ajustes.

Os maiores fatores que influenciam no cálculo de incerteza consistem na faixa de concentração da curva analítica e o preparo das soluções padrão necessárias para sua obtenção. Estes parâmetros podem variar dentro da rotina de um laboratório exigindo do analista uma avaliação contínua dos resultados obtidos em função das principais figuras de mérito da técnica e do procedimento analítico empregado, corrigindo cada etapa conforme a necessidade, cabendo ao analista tomar as melhores decisões para se alcançar um resultado satisfatório.

Em respeito à proposta do trabalho, a utilização da metodologia proposta para a determinação da recentidade de uma amostra de tinta de caneta esferográfica, mostra-se com um potencial possivelmente aplicável, para a determinação na idade relativa de uma tinta.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WILKINSON, T.J.; PERRY, D.L.; MARTIN, M.C.; MCKINNEY, W.R.; CANTU, A.A. Use of Synchrotron Reflectance Infrared Spectromicroscopy as a Rapid, Direct, Nondestructive Method for the Study of Inks on Paper. ***Society of Applied Spectroscopy***, v. 56, n.6, p. 800-803, 2002.
2. History Detectives . Investigative Techniques . Overview / PBS. Disponível em: <<http://www.pbs.org/opb/historydetectives/techniques/index.html>>. Acesso em: 4 de julho de 2005.
3. LAGE, M.C.S.M. Análise Química de Pigmentos de Arte Rupestre do Sudeste do Piauí. Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia, São Paulo, p. 89-101, 1997. Suplemento 2,
4. MENDES, L.B., *Documentoscopia*. 2. ed. São Paulo.: Millenium, 2003.
5. WEYMANN, C.; KIRSCH, D.; VERA, C.C.; SPENGLER, B. A GC/MS Study of the Drying of Ballpoint Pen Ink on Paper. ***For. Sci. Int.*** v. 168, p. 119-127, 2007.
6. HOFER, R. Dating of Ballpoint Pen Ink. ***J. Forensic Sci.***, v. 49, n. 6, 2004.
7. Comunicação Pessoal com Dra. Regina Branco, Perita da Polícia Civil de São Paulo
8. STEWART, L.F. Ballpoint Ink Age Determination by Volatile Component Comparison-A Preliminary Study. ***J. Forensic Sci.*** v. 30, n. 2, p. 405-411, 1985.
9. EURACHEM/ CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Editors: Ellison, S.R.L., Rosslein, M., Williams, A. 2nd. Ed., 2000.
10. AGINSKY, V.N. Some New Ideas for Dating Ballpoint Inks – A Feasibility Study. ***J. Forensic Sci.*** v. 38, n. 5, p. 1134-1150, 1993.
11. LAPORTE, G.M.; WILSON, J.D.; CANTU, A.A.; MANCKE, A.; FORTUNATO, S.L. The Identification of 2-Phenoxyethanol in Ballpoint Inks Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry – Relevance to Ink Dating. ***J. Forensic Sci.***, v. 49, n. 1, p. 155-159, 2004.
12. LOCICIRO, S.; DUJOURDY, L.; MAZZELLA, W.; MARGOT, P. Dynamic of the Ageing of Ballpoint Pen Inks: Quantification of Phenoxyethanol bt GC-MS. ***Forensic Sci. Soc.***, v. 44, n. 3, p. 165-171, 2004.

13. Baugh, P.J., *Gas Chromatography – A Practical Approach*, Oxford University Press, 1993.
14. BRUNELLE, R.L.; LEE, H. Determining the Relative Age of Ballpoint Ink Using a Single-Solvent Extraction, Mass-Independent Approach. **J. Forensic Sci.** v. 34, n. 5, p. 1166-1182, 1989.
15. Comunicação Pessoal com Dr. Gerald M. LaPorte, United State Secret Service, Forensic Services Division, Questioned Document Branch, Washington, DC
16. ZLOTNIK, J.A.; SMITH, F.P. Chromatographic and Electrophoretic Approaches in Ink Analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 733, p. 265-272, 1999.
17. CAPELLO, R.E. *Tratado de Criminalística – Tomo I – Documentos – Su Estudio Analítico-Pericial*. Argentina.: Policial, 1980.
18. STEWART, L.F. Ballpoint Ink Age Determination by Volatile Component Comparison-A Preliminary Study. **J. Forensic Sci.** v. 30, n. 2, p. 405-411, 1985.
19. ANDRASKO, J. Changes in Composition of Ballpoint Pen Inks on Aging in Darkness. **J. Forensic Sci.** v. 47, n. 2, p. 324-327, 2001.
20. GERNANDT, M.N.; URLAUB, J.J. An Introduction to the Gel Pen. **J. Forensic Sci.** v. 41, n 3, p. 503-504, 1996.
21. AGINSKY, V.N. Forensic Examination of “Slightly Soluble” Ink Pigments Using Thin-Layer Chromatography. **J. Forensic Sci.** v. 38, n.5, p. 1131-1133, 1993.
22. CANTU, A.A. Sketch of Analytical Method for Documents Dating Part II. The Dynamic Approach Determining Age Dependent Analytical Profiles, Journal of Forensic Document Examiners. **J. Forensic Doc.** v.2, n.3, p. 192-208, 1996.
23. AGINSKY, V.N. Microspectrophotometric Method for Dating Ballpoint Inks – A Feasibility Study. **J. Forensic Sci.** v. 40, n.3, p. 475-478, 1995.
24. AGINSKY, V.N. Comparative Examination of Inks by Using Instrumental Thin-Layer Chromatography and Microespectrophotometry. **J. Forensic Sci.** v.38, n. 5, p. 1111-1113, 1993.
25. SAMANIDOU, V.F.; NIKOLAIDOU, K.I.; PAPADOYANNIS, I.N. Development and Validation of a Gradient-HPLC-PDAD Method for the Identification of Ballpoint Pen Ink Components: Study of Their Decomposition on Aging for Forensic

- Science Application. **J. Liq. Chromatogr. Related Technol.** V. 27, n. 2, p. 215-235, 2004.
26. THANASOULIAS, N.C.; PARISIS, N.A.; EVMIRIDIS, N.P. Multivariate Chemometrics, for the Forensic Discrimination of Blue Ball-Point Pen Inks Based on Their Vis Spectra. **Forensic Sci. Int.** v. 138, p. 75-84, 2003.
 27. ROUX, C.; NOVOTNY, M.; EVANS, I.; LEONARD, C. A Study to Investigate the Evidential Value of Blue and Black Ballpoint Pen Inks in Australia. **Forensic Sci. Int.** v. 101, p. 167-176, 1999.
 28. ANDRASKO, J. HPLC Analysis of Ballpoint Pen Inks Stored at Different Light Conditions. **J. Forensic Sci.** v. 46, n. 1, p. 21-30, 2001.
 29. GRIM, D.M.; SIEGEL, B.S.; ALISSON, J. Does Ink Age Inside of a Pen Cartridge?. **J. Forensic Sci.** v. 47, n. 6, 2002.
 30. CANTU, A.A.; PROUGH, R.S. On the Relative Aging of Ink – The Solvent Extraction Technique. **J. Forensic Sci.** v. 32, n. 5, p. 1151-1174, 1987.
 31. BRUNELLE, R.L.; LEE, H. Determining the Relative Age of Ballpoint Ink Using a Single-Solvent Extraction, Mass-Independent Approach. **J. Forensic Sci.** v. 34, n. 5, p. 1166-1182, 1989.
 32. BAUGH, P.J. ., *Gas Chromatography – A Practical Approach*. Oxford.: University Press, 1993.
 33. CIOLA, R. *Fundamentos da Cromatografia a Gás*. 2 ed. São Paulo.: Edgard Blücher. 1985.
 34. KARASEK, F.W.; CLEMENT, R.E. *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Principles and Techniques*. 1 ed. Amsterdam.: Elsevier Science. 1988.
 35. MCEWEN, C.N.; KITSON, F.G.; LARSEN, B.S. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Boston.: Academic Press. 1996.
 36. MCMASTER, M.; MCMASTER, C. *GC/MS – A Practical User's Guide*. Canadá.: Wiley-VCH. 1998.
 37. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Guide for Test Methods for Forensic Writing Ink Comparision**. Jan. 10, 1998. (E1422-98)

38. INMETRO DOQ-CGRE-008, Revisão 02-JUNHO/2007- Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGRE-8_02.pdf, acesso em dezembro de 2008.
39. LANÇAS, F. M., *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. São Paulo.: Rima, 2004.
40. NBR ISO 9004. Quality management systems- guidelines for performance improvements. ISO 9004:2000.
41. BERTINELLI, M. ICP-MS Determination of Pt in Biological Fluids of patients Treated with Antitumor Agents: Evaluation of Analytical Uncertainty. ***Microchem. J.*** n. 79, p. 357-363, 2005.