



Mariana Cardoso de Albuquerque

ANÁLISE POR HPLC-DAD E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DAS MOLÉCULAS DA COR DE ESFEROGRÁFICAS AZUIS

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mariana Cardoso de Albuquerque

Análise por HPLC-DAD e métodos quimiométricos das moléculas da cor de esferográficas azuis

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Forense

Orientadores: Professor Doutor J. Sérgio Seixas de Melo
Mestre Ana Cristina Assis

Setembro de 2017

Universidade de Coimbra

“Recomeça... se puderes, sem angústia e sem pressa e os passos que deres, nesse caminho duro do futuro, dá-os em liberdade, enquanto não alcances não descanses, de nenhum fruto queiras só metade.”

Miguel Tor

Agradecimentos

Ao Professor Doutor João Sérgio Seixas de Melo, orientador deste trabalho, um sentido agradecimento pelos seus ensinamentos, por me ter recebido no seu grupo de investigação, do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade, análises críticas e sugestões ao longo desta investigação.

À Mestre Ana Cristina Assis, Especialista Superior do Laboratório de Polícia Científica, orientadora deste trabalho, pela oportunidade de realizar o estágio no laboratório de físico-química do Laboratório de Polícia Científica, pela sua disponibilidade e sugestões no decorrer desta investigação.

Ao Doutor Carlos Farinha, Diretor do Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária, a oportunidade de realizar o estágio no Laboratório de Polícia Científica.

À Professora Doutora Ermelinda Eusébio por ter apostado no Mestrado em Química Forense, na sua vontade de querer sempre melhorar e pela sua disponibilidade a resolver os problemas que foram surgindo ao longo destes dois anos.

À Tânia Firmino e ao Professor Doutor Canelas Pais, agradeço a disponibilidade com a análise quimiométrica, imprescindível neste trabalho.

À Daniela, pela amizade e disponibilidade.

À Professora Teresa, pela amizade.

À Professora Helena Teixeira, pela amizade e cumplicidade.

À Sílvia pelos conselhos e por toda a disponibilidade sempre.

À Rita, pelas horas no laboratório (com música), pelos almoços, pelas tardes de compras e pela amizade.

Ao grupo de investigação pelos momentos de companheirismo e descontração nas pausas do trabalho. Ao Pina pela sua disponibilidade em qualquer momento e por me “ajudar a pensar”. Ao Ricardo pela amizade desde que entrei no Departamento de Química.

Aos tempos no NEQ/AAC, com quem me cruzei, pela amizade e pelos momentos “à parte” do estudo.

À Rita por ter sido uma madrinha, no verdadeiro sentido da palavra, desde o meu primeiro dia na faculdade.

À Mariana por ser a afilhada que é, por estar sempre presente, pela confiança desde o primeiro dia de caloiira.

Aos meus amigos “mais loucos” por todos os momentos que fomos vivendo ao longo destes anos, pela amizade e por nos irmos aturando uns aos outros, porque, cada um à sua maneira, são fundamentais. Ao Marcelo por me ensinar como “contar uma história”, aqui e sempre. Ao Bruno, pela cumplicidade, disponibilidade e amizade em qualquer momento.

Às minhas amigas de infância, à Rita pelas tardes de gelados e conversas sem fim. À Lili pela companhia em Lisboa e aqueles encontros inesperados. À Leonor que apesar da distância está sempre presente.

À Joana pela amizade genuína em qualquer momento e contra qualquer obstáculo.

A uma das maiores aventuras da minha vida que me trouxe tantos amigos: À Inês pela amizade, cumplicidade e por todos os momentos vividos desde Barcelona. À Alexandra pelas

tardes de conversa e gelados e amizade desde os primeiros dias. À Carla pelas conversas intermináveis, amizade e cumplicidade desde o primeiro dia na Vila Universitária da UAB. Ao Nuno pela amizade e momentos mais divertidos.

À Diana, à Patrícia, ao Eduardo e ao Barata, pela amizade, enequi's, pelos desabafos, choros e risos, pelas Queimas e Latadas, pelas tardes de estudo e noites.

Aos meus tios e primos por estarem sempre presentes. À Kiki e ao Lourenço pelas conversas e companhia ao lanche nas tardes mais livres.

À Rosa, por ser da família, pelas histórias e conselhos, pela amizade.

À tia Mabé por estar sempre presente e pela amizade.

À Ana, Caetana, Nuno e Tomás, pelos gelados e séries, no fundo por fazerem com que me sentisse sempre em casa.

Aos tios, primos e compadres, no fundo à família que somos, por fazerem parte de mim desde que me lembro, por todos os momentos já vividos, pelas lágrimas e gargalhadas.

Ao Nuno, por acreditar sempre, pelo apoio constante, orgulho ... Por cada momento.

Aos meus avós... Ao avô Queque, por me ter ensinado tanto e porque sei que estará orgulhoso. À avó Ana e Avô Zé, pela cumplicidade, amizade, por terem estado Sempre presentes, por terem vivido a minha vida académica tão intensamente, por tudo o que me ensinaram, por serem verdadeiros exemplos e porque sei que estarão cheios de orgulho neste momento. À avó Rosa pela sua alegria contagiante, pelos almoços e lanches e pela cumplicidade.

À Sofia, por ser sempre uma irmã no verdadeiro sentido da palavra e com tudo o que isso implica.

Aos meus Pais ... Pelo apoio incondicional, agora e Sempre ... Por tudo!

Obrigada!

Índice

Agradecimentos.....	v
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1 Análise de documentos no âmbito forense – a sua importância na investigação forense	1
1.2 Falsificação/Adulteração de documentos.....	2
1.3 Análise de tintas dos instrumentos manuais de escrita.....	2
1.4 Instrumentos de escrita – composição química das tintas	3
1.4.1 Tipos de instrumentos de escrita	4
1.4.2 Composição química das tintas dos instrumentos manuais de escrita	5
1.5 Métodos analíticos mais utilizados na análise forense de documentos - evolução histórica	8
1.6 Objetivo do Trabalho.....	14
Capítulo 2 - Materiais e Métodos.....	15
2.1 Solventes utilizados	15
2.2 Amostras de tinta de esferográficas azuis.....	15
2.3 Preparação dos padrões.....	17
2.3.1 Estrutura química dos padrões (agentes corantes)	18
2.4 Métodos analíticos	19
2.4.1 HPLC.....	19
2.5 Análise de Resultados ^{28,29}	23
2.5.1 Análise de agrupamento hierárquico (HCA).....	23
2.5.2 Análise de componentes principais (PCA)	24
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	25
3.1 Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos padrões (agentes corantes).....	25
3.2 Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das esferográficas azuis (método LPC).....	27
3.3 Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das esferográficas azuis (método DQ-Coimbra).....	28
3.4 Espectros de Absorção	30
3.5 Comparação dos perfis químicos das tintas de esferográficas com os padrões.....	30
3.6 Análise dos resultados por métodos de quimiometria (HCA e PCA)	37

Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas Futuras.....	41
Bibliografia.....	43
Capítulo 5 - Anexos.....	47

Lista de Abreviaturas

CE – Capilar electroforesis

CV – Crystal violet

DQ-UC – Departamento de Química da Universidade de Coimbra

EI – Electronic Impact

ES – Electrospray

GC – Gas Chromatography

HCA – Hierarquical Cluster Analysis

HPLC-DAD – High-Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector

IR – Infra-red

LDI-MS – Laser Desorption/Ionization - Mass Spectrometry

LPC – Laboratório da Polícia Científica

MALDI – Matrix-assisted laser desorption/ionization

MS – Mass Spectrometry

PCA – Principal Component Analysis

TBAHS – Tetrabutylammonium hydrogen sulfate

TLC – Thin Layer Chromatography

TOF-SIMS – Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry

UV – Ultra violeta

Resumo

Um dos aspetos menos estudados na análise forense de tintas de esferográficas é a análise da composição química destas, mais precisamente dos corantes ou pigmentos (moléculas responsáveis pela cor) existentes nas mesmas. Desde a sua constituição às diferentes proporções, quando existe mais do que um, a caracterização destas tintas pode constituir um elemento fundamental para o investigador forense.

Neste trabalho estudaremos amostras de tinta de esferográficas azuis por HPLC-DAD, através da análise dos seus corantes principais. Estas serão comparadas com padrões conhecidos previamente pesquisados na literatura como sendo os mais prováveis de se encontrarem neste tipo de tintas. É exemplo o Violeta de Cristal, cuja presença se observou na maioria das tintas analisadas. A análise dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (nomeadamente dos seus tempos de retenção, áreas integradas e máximos de absorção) foi posteriormente analisado recorrendo a métodos quimiométricos, nomeadamente a PCA e HCA.

Numa primeira abordagem foram analisadas 57 amostras de tinta de esferográficas azuis (Laboratório da Polícia Científica) e de seguida apenas 35 amostras de tinta de esferográficas azuis (Departamento de Química da Universidade de Coimbra) e 7 padrões de agentes corantes através da técnica HPLC-DAD acoplada a métodos quimiométricos para a análise dos resultados obtidos.

Foi, então, possível agrupar estas amostras em seis grupos. Por comparação com os padrões foi possível perceber que a maioria das esferográficas apresenta na sua composição Violeta de Cristal. Algumas tintas, para além de terem na sua constituição este corante apresentam ainda dois picos que não conseguimos identificar. Duas tintas de duas esferográficas, BB161 e BB166, apresentam na sua composição os padrões de Azul de vitória R (do inglês *Victoria blue R*) e Azul de vitória puro BO (do inglês *Victoria pure blue BO*), respetivamente.

Podemos então, dizer que o método de HPLC-DAD acoplado com métodos quimiométricos permite uma ótima discriminação das tintas de esferográficas, sendo possível identificar os constituintes destas.

Abstract

One of the least studied aspects in the forensic analysis of ballpoint pen ink is the analysis of the chemical composition of these, more precisely of their dyes or pigments (molecules responsible for the color). Since its composition to different proportions, when there is more than one, the characterization of these inks can be a fundamental element for the forensic investigator.

In this work we will study samples of blue ballpoint pens by HPLC-DAD, through the analysis of their main dyes. These will be compared to previously known patterns in the literature as being the most likely to be found in this type of ink. Using Crystal Violet as an example, whose presence was observed in most of the inks analyzed. The analysis of the chromatograms obtained by HPLC-DAD (in particular its retention times, integrated areas and absorption maxima) was later analyzed using chemometric methods, namely PCA and HCA.

In a first approach, 57 ink samples of blue ballpoint pens (Laboratory of the Scientific Police) were analyzed, followed by only 35 samples of blue ballpoint ink (Department of Chemistry of the University of Coimbra) and 7 dye standards using the HPLC-DAD technique coupled with chemometric methods for the analysis of the results obtained.

Due to this it was then possible to group these samples into six groups. By comparison with the standards it was possible to notice that most of the ballpoint pens present in their composition is Crystal Violet. Some dyes, besides having in their constitution this dye still have two peaks that could not be identified. Two inks of two ballpoint pens, BB161 and BB166, present in their composition the patterns of Victoria Blue R and Victoria Pure Blue BO, respectively.

We can therefore say that the HPLC-DAD method coupled with chemometric methods allows an optimal discrimination of ballpoint paints, and it allows to identify the constituents of these.

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Análise de documentos no âmbito forense – a sua importância na investigação forense

“If you do it, write it. If you write it, do it. If it isn’t written, it didn’t happen.”¹

Podemos definir como documento, todo o suporte material (papel, plástico, etc.) que contém informação útil (manuscritos, impressões, imagens, etc.). Os documentos fazem parte do dia-a-dia e têm diversas aplicações – identificação de indivíduos, celebração de contratos, comprovativos de filiação ou estado civil, etc.^{2,3} Na verdade, a vida começa com um documento (declaração de nascimento) e acaba com outro (declaração de óbito), podemos pois concluir, que toda a nossa vida se encontra documentada e cada documento conta um pouco da nossa história.

É importante realçar que, apesar de vivermos numa era digital e de presenciarmos diariamente o rápido desenvolvimento das tecnologias, os documentos em papel continuam a ser a principal fonte de informação em muitas áreas.³

Em suma, um perito nesta área está envolvido em questões como:

- Determinação de adulterações;
- Identificação da origem das informações documentais com instrumentos de escrita ou impressoras, identificação e comparação de tintas (formulação química);
- Determinação da sequência temporal de escrita de vários fragmentos de texto;
- Determinação da época (datação) em que um documento foi produzido.

Resumindo, o principal objetivo é a determinação da autenticidade e autoria de um determinado documento considerado suspeito e que se considerou oportuno submeter a análise.³

Os principais quesitos na área dos documentos são:

- Há quanto tempo a tinta foi depositada no papel?
- Dois fragmentos de texto contêm a mesma tinta?
- Dois fragmentos de texto foram escritos ao mesmo tempo?⁴

1.2 Falsificação/Adulteração de documentos

Sendo a documentação imprescindível em vários aspetos na sociedade moderna, os documentos tornaram-se uma das principais ferramentas para os criminosos.⁵

Por este motivo, os documentos são facilmente alvos de fraudes e adulterações e existem vários casos criminais relativos a falsificações dos mesmos. Esta questão é muito atual devido ao crescente desenvolvimento da atividade económica, da falsificação de contratos, documentos de identificação, assinaturas, cartas, ataques terroristas, etc.^{2,6-8}

É importante saber que a falsificação de um documento é um crime previsto e punido no artigo 256º do Código Penal – *Falsificação ou contrafação de documento*.

1.3 Análise de tintas dos instrumentos manuais de escrita

A análise forense de documentos é uma área da investigação forense que inclui o funcionamento de impressoras e fotocopiadoras, escrita manual, a estrutura química e física do papel e a “idade” dos documentos.

O principal analito é a tinta, que se revela bastante importante, devido ao impacto que os registos manuscritos têm na nossa vida e as consequências que existem se estes sofrerem algum tipo de alteração. A análise de tintas pode, assim, determinar se a escrita foi alterada, se um documento foi adulterado, qual a idade relativa de fragmentos de texto, estimando assim a “idade” do documento (principais questões da análise forense de documentos). O objetivo central desta análise é a determinação da composição química da tinta, uma vez que quando esta é identificada, é possível saber a data de produção, distribuição geográfica e prevalência no mercado, ou seja, perceber qual a história do documento que temos em mãos.⁵

Este analito (tinta) pode evidenciar uma fraude sob a forma de adição de um fragmento de texto com uma tinta diferente nos documentos analisados, por exemplo. Por esta razão, têm sido feitos esforços no sentido do desenvolvimento deste campo, sendo o principal foco a melhoria do poder discriminante dos métodos de análise.⁹

Neste contexto, interessa-nos, principalmente, saber que a diferenciação da composição das tintas ajuda a detetar fragmentos de texto falsificados num documento em análise, sendo que a sua discriminação é uma tarefa importante, assim como a determinação da sua “idade”. Podemos, então, afirmar que um dos objetivos da investigação forense nesta área é realçar a heterogeneidade num documento considerado suspeito, sendo que a presença, num mesmo documento, de duas ou mais tintas diferentes (por exemplo, diferentes instrumentos de escrita) pode indicar a sua falsificação. Entre os componentes que podem ser facilmente analisados, os corantes são os preferencialmente, escolhidos por serem os “ingredientes” característicos e mais estáveis das tintas.^{6,7,9-11}

Aquando da análise em laboratório da tinta é importante ter em conta que estas, ao contrário das drogas, não são analitos isolados mas sim, misturas que se alteram com o tempo. Sendo assim, quando esta é aplicada no papel, uma série de processos ocorrem simultaneamente: a tinta seca devido à evaporação do solvente, a absorção do solvente na superfície do papel, a difusão do solvente dentro do papel, a descoloração da tinta devido à polimerização das resinas, entre outros.^{3,4}

O processo de “envelhecimento” da tinta depende de vários fatores: luz, humidade, temperatura, isto é das condições de armazenamento. O estudo da “idade” artificial ou natural das tintas é, também, uma tarefa importante a nível criminalístico, judicial e social.^{3,12}

É importante referir que a análise forense de tintas deve ir mais além do que uma mera comparação – em primeiro lugar é importante interpretar as diferenças observadas no espectro ou cromatograma, - uma vez que a identificação dos corantes fornece informação acerca da sua composição química. Apesar de serem aplicados estudos de grafologia (análise da escrita manual relacionada com a psicologia humana), a análise físico-química é a mais aplicada por ser a mais completa. Primeiro que tudo, para identificar corantes de diferentes tintas, é necessário interpretar as diferenças observadas no espectro ou cromatograma, aumentando, assim, a precisão e confiabilidade dos relatórios forenses. Gallabino et al. nos seus estudos ainda acrescentaram: *“the accuracy of discriminations based on unidentified peaks must be carefully considered, because their reproducibility was observed to be less reliable than that of identified signals”*.

De facto, na investigação forense, qualquer conhecimento adicional sobre a composição da tinta facilita a pesquisa da sua origem e é uma informação importante para a construção de uma biblioteca forense de tintas, como por exemplo a *“US Secret Service Digital Ink Library”*. Em ciência forense, este conhecimento é também o princípio do estudo da datação de tintas, a descoberta de novos corantes nas fórmulas de tinta que se degradam à medida que esta envelhece ou a estimativa do momento em que uma determinada tinta apareceu no mercado.^{3,8,10}

A deteção dos corantes orgânicos sintéticos nas tintas e tecidos tem grande interesse para investigadores de diversas áreas, por exemplo, os tecidos manchados por tintas podem constituir uma prova/vestigio significativa na investigação forense.^{10,13}

Resumindo, as tintas são, normalmente, analisadas por duas razões:

- Comparar duas ou mais tintas com o objetivo de determinar semelhanças e diferenças que podem fornecer informação sobre fragmentos de texto, nomeadamente se estes foram adicionados à *posteriori* ou alterados;
- Determinar se dois ou mais fragmentos de texto foram escritos com a mesma fórmula e lote de uma determinada tinta, com o intuito de fornecer pistas sobre se estes foram ou não escritos com o mesmo instrumento de escrita.

1.4 Instrumentos de escrita – composição química das tintas

Começamos por rever alguns conceitos básicos. Um sistema fechado assume que a tinta se encontra dentro do reservatório no instrumento de escrita enquanto um sistema aberto pressupõe que a tinta se encontra no papel, sujeita às condições do ambiente. Por outro lado perfil estático e perfil dinâmico são estabelecidos para sistemas abertos, ou seja, aqueles em que a tinta “envelhece” fora do reservatório da esferográfica - no papel. Um perfil é considerado estático quando inclui as propriedades estáveis da tinta, isto é, não sofre variação ao longo do tempo; ao contrário do perfil dinâmico que é considerado o perfil analítico de uma tinta que considera os processos e mudanças que ocorrem nos diferentes componentes da tinta, tendo em conta os fatores que já mencionamos neste trabalho.¹²

1.4.1 Tipos de instrumentos de escrita

Como bem sabemos, temos disponível no mercado inúmeras variedades de canetas de diferentes marcas. Devemos ter presente que qualquer uma delas consiste numa mistura complexa de compostos químicos, cada um deles com funções diferentes e específicas. Antes de avançar para os instrumentos de escrita analisados neste trabalho é importante ter uma noção daqueles que também podemos encontrar no mercado atual:

- **Canetas de tinta permanente**

Este tipo de instrumentos de escrita podem ser de dois tipos: ¹⁾ “*iron gallotannate*” e ²⁾ soluções aquosas de corantes sintéticos. As tintas modernas do tipo 2) contêm corantes sintéticos azuis responsáveis pela cor azul da tinta que, gradualmente, se torna preta com a oxidação do papel – nome original “*blue-black fountain pen inks*”. Estas canetas são muito estáveis e insolúveis em água. As tintas são brilhantes e com cores atrativas, sendo que as mais modernas contêm corantes pigmentados, como por exemplo, a ftalocianina de cobre que lhes confere um caráter permanente.^{1,6}

- **Rollerball**

Estas canetas foram introduzidas no Japão em 1968 e só depois nos EUA. São tintas à base de água e contêm líquidos orgânicos com o objetivo de retardar o processo de secagem das tintas. Estas são solúveis em água.¹⁰

- **Gel**

A composição destas tintas é diferente da composição das tintas de esferográficas. Os agentes corantes têm, geralmente, pH ácido e podem ser mais facilmente extraídos do papel do que os pigmentos. As moléculas deste tipo de corantes contêm anéis aromáticos ou um sistema conjugado o que lhes confere maior sensibilidade à luz, decompondo-se lentamente às condições ambiente, assim a análise de corantes pode fornecer informação muito útil acerca da datação destas tintas.¹⁴ As bandas de absorção máximas de UV situam-se entre os 500 e 700nm e a maioria dos corantes tem uma absorção máxima perto dos 580nm, sendo assim o detetor é programado para este comprimento de onda.^{14,15} Um facto interessante é que as tintas de gel, geralmente, contêm alguns componentes de corantes com cores diferentes que são misturadas proporcionalmente para obter a cor preta.¹⁴

- **Esferográficas**

Finalmente, focamo-nos nos instrumentos de escrita relevantes para este trabalho.

As esferográficas foram desenvolvidas na Europa em 1939 e inicialmente distribuídas na Argentina em 1943. Só em 1946 é que foram comercializadas nos EUA.

São tintas à base de óleo, viscosas e insolúveis, sendo que a sua composição consiste em 25% de agentes corantes, 50% de solventes e 25% de resinas. Outros aditivos, com a finalidade de modificar as suas propriedades, podem ser adicionados pelas indústrias, que não fornecem as suas “receitas”. Estes “ingredientes” podem ser ácidos gordos, resinas, “*surface activate agentes*”, compostos de controlo de corrosão e ajustadores de viscosidade – os ácidos gordos atuam como lubrificantes na esfera da caneta e ajudam a solubilizar corantes, resinas naturais ou polímeros

sintéticos, por forma a ajustar a viscosidade das tintas, conferir maior aderência à superfície e maior elasticidade.

Após o ano de 1950, as tintas fabricadas passaram a ser à base de glicol (uso de etileno glicol ou derivados do glicol nos solventes dos corantes); em 1953, foram introduzidos os corantes quelatos que são mais estáveis à luz e em 1968 as tintas de esferográfica são pressurizadas, isto é, contêm um sistema de alimentação pressurizado em vez do fluxo por gravidade, sendo estas características ligeiramente diferentes das tintas de glicol, onde a composição é muito idêntica, com a diferença de que esta tinta não é fluida.^{10,14,15}

1.4.2 Composição química das tintas dos instrumentos manuais de escrita

Como já fomos dizendo ao longo do texto, a tinta é um meio complexo e, idealmente, homogêneo, composto por solventes, pigmentos, corantes, resinas, lubrificantes, solubilizadores, surfatantes, partículas fluorescentes e outros materiais. Esta mistura de componentes, geralmente protegida por patente, é importante na medida em que confere cor, controla a densidade ou a fluidez, modifica a cinética de secagem, isto é, são os responsáveis pela aparência final da tinta. Em particular, os agentes corantes desempenham um papel importante na sua composição.⁸ Na tabela 1.1 podemos ver alguns componentes da tinta e as suas funções.

Tabela 1.1: Composição da tinta de esferográfica¹⁶

Componentes da tinta	Características	Propriedades
Material corante		Aparência
Corantes	Classificados como ácido, básico dependendo das suas características. Solúvel.	Coloração
Pigmentos	Consistem em partículas multimoleculares. Insolúvel.	Coloração
Veículo		Características de fluxo e secagem
Óleos	Linhaça, soja, mineral, etc.	
Solventes	Orgânicos ou água.	Viscosidade
Resinas	Naturais ou sintéticas.	Secura e endurecimento
Outros aditivos		
Secantes	Catalisam a oxidação dos óleos secantes	Secantes
Plastificantes	Conferem à tinta mais elasticidade	Modificação da película
Surfatantes	Modificam a tensão superficial da tinta	Capacidade hidratante
Ceras	Incrementam a flexibilidade das tintas. Ceras hidrocarbonadas.	Dureza/flexibilidade
Marcadores químicos	Quelatos. Substâncias fluorescentes.	

Solventes

Os solventes são a parte volátil da tinta e utilizam-se comumente solventes orgânicos e/ou água no seu fabrico. Inicialmente as tintas de esferográfica continham um suporte oleoso (oleína, óleo de castor, óleo mineral, adicionadas de éter de petróleo ou benzeno), sendo que os mais utilizados são o polietilenglicol, 1,3-butilenglicol, octilenglicol, 1,2propilenglicol, hexilenglicol, glicerina. Em 1985, Stewart, fala dos seguintes solventes como os utilizados neste contexto. Em 2003, Brunelle e Crawford, revolucionaram a formulação das tintas de esferográfica dos últimos 20 anos com a eliminação do tolueno.¹⁶

Agentes corantes

Os agentes corantes são fundamentais na composição de uma tinta de qualquer instrumento de escrita uma vez que são os responsáveis pela sua cor. É importante realçar que uma molécula pode ser classificada como corante ou pigmento dependendo do veículo utilizado no fabrico da tinta. Isto é, se na caneta X uma molécula for solúvel no veículo esta será classificada como corante; se na caneta Y essa mesma molécula não for solúvel no veículo será denominada como pigmento.²

(a) Corantes^{10,12}

Os corantes são solúveis no veículo e são usados em tintas viscosas e fluidas. Os componentes das tintas com maior interesse são, normalmente, os corantes, uma vez que estes são menos suscetíveis de sofrer degradação quando comparados com outros. Este processo de degradação pode demorar alguns anos sob condições naturais devido a reações fotoquímicas que ocorrem após a absorção de luz visível ou UV. A absorção de luz por uma molécula orgânica conduz à formação de um estado eletronicamente excitado; no estado excitado a molécula pode sofrer processos de fotodegradação. Várias reações podem então acontecer nos corantes da família dos triarilmetano:

- N-desmetilação – o grupo metilo é substituído por um átomo de hidrogénio quando exposto à luz;
- Clivagem fotooxidativa da ligação C-fenilo ocorre, provavelmente, através do oxigénio singleto que resulta na formação de benzofenona e fenol. Sabe-se que a fotólise dos corantes de triarilmetano conduz à formação de oxigénio singleto não só em solução como no papel;
- Fotorredução do catião excitado para forma leuco incolor. Aqui a fotorredução do catião excitado é alcançada pela adição de um eletrão aos estados foto excitados ou pela hidrogenação fotoquímica do corante.^{3,17}

O ano de 1955 ficou marcado pelo momento em que são introduzidas as tintas de quelatos metálicos – mais comum é a ftalocianina de cobre, – que são compostos estáveis à luz e têm uma excelente solubilidade (um simples teste usando metanol é suficiente para colocar em evidência se uma tinta azul/verde os contém).^{12,16}

Corantes, tais como, Violeta de Cristal (do inglês *Crystal Violet*) e Violeta de Metilo (do inglês *Methyl Violet*) não são estáveis e podem decompor-se não só sob irradiação de luz mas também no escuro devido à oxidação pelo oxigénio presente na atmosfera. Todos estes processos podem ocorrer nas mesmas condições e competem entre si.³ Na figura 1.1 apresentamos o mecanismo da N-desmetilação do Violeta de Cristal, que pela perda de um grupo metilo dá origem ao Violeta de Metilo 2B (produto de degradação).

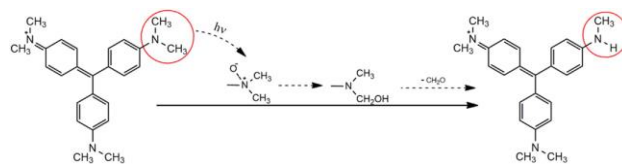


Figura 1.1: Mecanismo da N-desmetilação do Violeta de Cristal (*Crystal Violet*)

Na figura 1.2 é possível ver o mecanismo de degradação do Violeta de Metilo que consiste no ataque de um oxigénio singuleto.

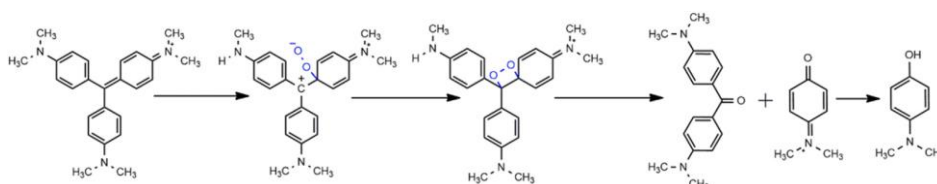


Figura 1.2: Mecanismo de degradação do Violeta de Metilo (*Methyl Violet*) pelo ataque de um oxigénio singuleto.

(b) Pigmentos

Estes compostos encontram-se dispersos no veículo e, em certos casos, são usados em tintas fluidas para além dos corantes.¹⁶

Resinas

As resinas são substâncias naturais ou sintéticas, com pesos moleculares altos. Encontram-se em fase líquida numa solução. Não são solúveis em água mas em solventes orgânicos.¹⁶

Veículos

Os veículos são constituídos por solventes e como o nome indica são responsáveis por solubilizar e/ou dispersar os componentes da tinta, de forma a torná-la homogênea e fluida.²

Outros aditivos

Para além dos grupos de compostos que já foram referidos, podem ser encontrados outros, que são adicionados pelos fabricantes para melhorar a composição da tinta. São eles, aceleradores da secagem; fluidificantes; lubrificantes – permitir a rotação da esfera na ponta da esferográfica; antimicrobianos; inibidores da corrosão da esfera.¹⁶

1.5 Métodos analíticos mais utilizados na análise forense de documentos - evolução histórica

O principal objetivo ao comparar amostras de tinta de diferentes fragmentos de texto suspeitos, é a minimização do número de falsos negativos e, desta forma, evitar uma diferenciação errada destas amostras. Diferenciações falsas ou errôneas podem levar a erros judiciais que podem ser prejudiciais na vida de alguém.⁸

Muitas vezes coloca-se a questão: quantos métodos são suficientes para discriminar tintas em documentos que se suspeita terem sido escritos por tintas diferentes ou na identificação de uma fórmula química semelhante?⁷

Como já foi referido, muitos estudos têm como objetivo principal a estimativa da "idade" de um documento, com o intuito de perceber se este foi ou não alterado. No entanto, muitas pesquisas publicadas estudam a discriminação de amostras de tintas com a identificação dos componentes principais de cada amostra e posterior comparação, tendo em conta a sua degradação com o tempo e sob condições ambientais controladas.

Os primeiros estudos das tintas eram realizados através da observação das propriedades físicas da amostra, tanto no papel (espessura, textura) como em solução (cor). Atualmente, algumas destas técnicas, especialmente a análise ótica, são comuns no laboratório devido ao seu carácter não destrutivo, à sua rapidez, simplicidade e fácil interpretação dos resultados. No entanto, as tintas podem ser semelhantes apenas a "olho nu" e diferentes na composição química, portanto, ao longo dos anos, surgiu a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas, com o intuito de aumentar o poder discriminatório.

Apesar desta evolução, as metodologias implementadas preferencialmente, são aquelas que apresentem carácter não destrutivo e que forneçam resultados objetivos, muitas vezes as mais clássicas. O uso complementar de diversas técnicas analíticas (novas abordagens e clássicas) tenta fornecer resultados complementares, permitindo uma discriminação melhor e mais eficaz.⁸

As esferográficas foram escolhidas como os instrumentos de escrita analisados neste trabalho, uma vez que são muito usadas no dia-a-dia, sendo por isso que muitas técnicas analíticas já foram propostas para discriminar diferentes formulações das suas tintas no papel.

A investigação padrão de documentos começa, na maioria dos casos, com uma análise ótica das propriedades das tintas (absorção e luminescência) com a vantagem de ser rápida e não destrutiva e, muitas vezes, suficiente para responder às principais questões num caso forense. É útil quando é possível fazer uma comparação direta entre a tinta presente nos documentos em análise com amostras de referência, uma vez que uma diferença observada é uma forte indicação que as amostras de tinta não são as mesmas, no entanto, um "match" indica apenas que as amostras são semelhantes.

A par com a análise ótica podem ser feitos testes de solubilidade, que são considerados muito úteis devido à sua rapidez e com a vantagem de serem efetuados *in situ*. Estes testes têm o objetivo de diferenciar as tintas, identificar os seus constituintes ou selecionar o solvente adequado para a sua extração do documento para posterior análise recorrendo a outras técnicas. São úteis para elucidar sobre qual o passo que deve ser dado a seguir e que tipo de técnica será adequada a cada amostra. Sendo assim, são aplicadas pequenas quantidades de solvente sobre o traço de tinta ainda no suporte ou numa amostra de tinta previamente removida; de seguida é possível fazer a diferenciação entre tintas de canetas esferográficas e tintas fluidas. Sendo assim, podemos

considerar que um dos passos fundamentais numa investigação deste calibre é uma análise ótica, sendo que nesse momento é essencial a experiência do perito, que apenas com uma análise visual consegue perceber se se trata de um documento falsificado ou não.^{2,18}

Em alguns casos a análise ótica não é suficiente sendo necessária a separação dos componentes da tinta que é feita, normalmente, por TLC uma vez que se revelou com bom poder de discriminação. O problema desta metodologia é que requer uma destruição local do documento para extrair as amostras de tinta, o que para além da destruição óbvia das provas implica uma autorização do tribunal para a efetuar. Além disso, a preparação da amostra e análise são processos que consomem algum tempo. Métodos óticos não destrutivos alternativos, como a microespectrofotometria (MSP) são também propostos, no entanto têm o inconveniente de ser menos discriminantes.^{5,11}

Temos, então, por um lado técnicas destrutivas mas com maior poder discriminante e por outro técnicas não destrutivas, permitindo a preservação do documento mas com menor poder discriminante.

Sabendo que, a investigação forense de um determinado documento suspeito, deve começar com a utilização de técnicas e métodos mais simples, económicos e rápidos de forma a preservar o máximo possível a integridade dos vestígios e do material questionado judicialmente, os métodos analíticos não destrutivos devem ser a primeira opção. Os métodos não destrutivos incluem então: ¹⁾ análise ótica e microscópica, que permitem concluir acerca da cor e tipo de instrumento usado; ²⁾ refletância IV e luminescência para determinar se as tintas refletem ou absorvem luz no IV e se possuem características fluorescentes; ³⁾ análise das tintas com recurso a luz UV com comprimentos de onda pequenos e elevados para determinar se as tintas são fluorescentes sob estes comprimentos de onda.^{2,18} Podemos ainda dizer que a fluorescência é considerada um método sensível e seletivo. A distribuição espectral deste tipo de radiação é uma característica física e absoluta de uma determinada substância e muito útil para uma análise qualitativa.¹⁹

Ao longo dos anos têm sido aplicadas várias estratégias na discriminação de tintas de escrita, nomeadamente na deteção dos agentes corantes, incluindo a espectroscopia UV-Vis, Raman, TLC, electroforese capilar (CE), HPLC, GC, espectrometria de massa, entre outros.

De referir que os métodos espectroscópicos são geralmente os escolhidos para a classificação de tintas de esferográficas.

Destes métodos, destaca-se o TLC pela sua simplicidade e preparação simples de amostra e a CE que é considerada menos destrutiva que as técnicas de UV-vis e MS. Além disso, quando comparamos o TLC, GC e HPLC, a técnica de CE tem uma capacidade de análise mais rápida, um consumo de amostra inferior e é útil na análise de corantes. Muitos estudos têm-se debruçado na análise de corantes em solventes aquosos, mas recentes pesquisas concluíram que muitos corantes orgânicos sintéticos não se dissolvem completamente em água uma vez que têm na sua constituição materiais hidrofóbicos.^{10,13,14}

Os métodos espectroscópicos permitem fazer medidas de absorção, emissão ou dispersão da radiação eletromagnética dos átomos ou moléculas dos compostos em análise. O resultado será um espectro que é função do comprimento de onda e depende do nível de energia da estrutura do analito, sendo útil para caracterizar e identificar os compostos.^{8,18}

As técnicas cromatográficas têm o objetivo de separar, caracterizar e identificar os componentes de uma mistura. Na análise de documentos todos estes aspetos são essenciais, pelo que estas técnicas são bastante utilizadas.¹⁸

Nestes casos, a separação dos compostos é feita pela sua distribuição entre a fase estacionária e a fase móvel. As substâncias em análise são separadas tendo em conta a sua afinidade pela fase estacionária durante a interação com a fase móvel – a adsorção à fase estacionária é, frequentemente, causada pela interação entre uma molécula com uma dada polaridade, presente na fase estacionária, e uma molécula de diferente polaridade na amostra. Os componentes que sofreram a separação são depois processados para visualizar a separação com recurso a um detetor que origina um sinal que pode ser exibido graficamente (cromatograma). Podemos admitir que é conseguida uma identificação e quantificação de vestígios, e consequentemente, uma discriminação das amostras mais objetiva e confiável.

Estes métodos são, normalmente, combinados com deteção espectrométrica, por forma a permitir a identificação dos compostos com mais pormenor.^{8,18}

São exemplos: o TLC, considerada uma metodologia clássica na discriminação de amostras de tinta desde os anos 60. Atualmente continua a ser uma das técnicas mais aceites e mais estudadas para comparação e identificação de tintas, uma vez que consegue separar os corantes e os componentes orgânicos invisíveis e permite uma comparação direta da composição das tintas que são analisadas na mesma placa de TLC. Para determinar as concentrações relativas dos corantes presentes na tinta que foram separados por TLC, é necessário fazer um “scan” com recurso a “TLC scanning densiometer” que é considerado um método rápido, confiável e barato.^{8,18}

Podemos ainda acrescentar que esta é usada por vezes para confirmar resultados de outras técnicas como por exemplo, UV-Vis, CE, TOF-SIMS, LDI-MS ou Raman uma vez que o TLC é considerado o método “oficial”. O método de LDI-MS é relativamente recente e consiste num laser de nitrogénio com pulsos de energia máxima de 300uJ/feixe.¹¹

As esferográficas azuis e pretas são as mais analisadas e a extração com metanol é indicada como o método ideal para extrair a tinta do papel.⁸

O HPLC, CE, GC (na maioria das vezes acoplado com MS e pirólise) são outros métodos cromatográficos utilizados nesta área.¹⁸

Ainda antes de iniciarmos este trabalho e para uma melhor compreensão da importância desta área na investigação forense, fizemos uma pesquisa sobre quais os trabalhos desenvolvidos no campo da análise forense dos documentos até ao momento.

Um dos estudos revela uma pesquisa com canetas do tipo rollerball e esferográficas a par com a análise de nove corantes de referência por LC-DAD-orbitrap. Por comparação foi possível identificar os corantes ácidos e os básicos e concluir que não foram detetados corantes ácidos nas esferográficas e corantes básicos nas canetas tipo *rollerball*. Os corantes ácidos são: Azul Ácido 1, Azul ácido 9 e Vermelho Ácido 52; os corantes básicos são: Violeta de Cristal e o seu produto de degradação (Violeta de Metilo 2B), Violeta de Etilo, Azul Vitória B, Azul Vitória R e Azul Básico 7. Para os picos obtidos por HPLC-DAD que não se conseguiram identificar, procurou-se obter informação adicional por HPLC-MS.¹⁰

Com este estudo chegou-se à conclusão que as técnicas de cromatografia líquida permitem uma melhor separação da mistura dos corantes, o que facilita a identificação de compostos desconhecidos presentes nas tintas, por MS.¹⁰

Várias foram as pesquisas interessantes em que os instrumentos de escrita escolhidos foram as esferográficas azuis de variedades diferentes submetidas a análise por diversas técnicas. Algumas escolheram o HPLC e IR, nas quais foi feita a extração em quatro comprimentos de onda diferentes e, posteriormente a técnica de PCA foi útil para perceber o grau de separação entre as amostras de esferográfica. Sendo assim, podemos concluir que o HPLC acoplado com técnicas de quimiometria é

uma ferramenta poderosa para a discriminação para um químico forense. Para além destas, outra técnica muito usada neste tipo de análise é LDI-MS (modos positivo e negativo). Assim, várias soluções referência de corantes orgânicos e pigmentos inorgânicos podem ser submetidas a análise e os resultados obtidos para as soluções de referência são comparados com os obtidos para as tintas das esferográficas, sendo possível concluir acerca da composição química de cada instrumento de escrita analisado. Com este estudo foi possível perceber que os espectros no modo positivo permitiram a caracterização dos compostos catiónicos: Violeta de Cristal, Azul Vitória puro BO, Azul Vitória B, Violeta de Etilo e Azul Solvente 2 e que, pelo contrário, os espectros no modo negativo caracterizaram os compostos aniónicos, que apresentam maior interesse uma vez que nunca foram aprofundados em pesquisas anteriores: Azul Solvente 38, Azul Pigmento 15 (Ftalocianina de Cobre) e Azul ácido 92.^{7,11,20}

Outro estudo, com esferográficas azuis, revela que a análise ótica é bastante útil. Numa primeira abordagem, foi possível dividir as 18 tintas em 10 grupos. Prosseguindo a análise destes compostos recorrendo ao método de GC-MS foi possível ainda, caracterizar dois solventes encontrados em 17 das 18 amostras estudadas, o Álcool Benzílico e o 2-fenoxietanol. De seguida, as tintas foram analisadas em duas placas de sílica de TLC. Por último, as amostras ainda foram submetidas a LC-MS/MS com o intuito de analisar os 4 corantes básicos utilizados no fabrico destas tintas: Violeta de Cristal, Violeta de Metilo, Azul Básico 7 e Azul Vitória B. As conclusões deste último método revelaram que os corantes de Violeta de Cristal e Violeta de Metilo são os predominantes nalgumas tintas (com concentrações muito semelhantes) e quando não o são predomina o Azul Básico 7.^{7,11,20}

Porém, não são só as canetas do tipo esferográficas as eleitas para este tipo de estudos, as canetas de gel também são um alvo muito escolhido. Um dos fatores mais estudado nestas tintas, à semelhança das esferográficas é a degradação dos seus corantes.¹⁵

Ao iniciar a análise com um teste de solubilidade usando como solvente o metanol, é possível concluir que a maioria das canetas de gel contém pigmentos.⁹

Sendo assim, o estudo da fotodegradação juntamente com a técnica de HPLC-ES-MS são importantes para identificar corantes e os seus produtos de degradação, neste tipo de tintas. As amostras são analisadas tendo em conta o seu “envelhecimento”, seja ele artificial ou natural, e as alterações que isso implica na composição química da tinta. Para a análise por HPLC são selecionados reagentes catiónicos na preparação da fase móvel, uma vez que os corantes são, geralmente, aniónicos. Com este estudo foi possível concluir que estas duas técnicas são uma forte combinação com a capacidade de caracterizar a estrutura dos corantes (os produtos de degradação também podem ser analisados e os resultados obtidos utilizados para a identificação dos corantes).¹⁵

Outra técnica utilizada na análise destas tintas é o LDI-MS que tem a vantagem da análise da amostra ser direta (não é necessária matriz).⁶

Outro estudo realizado na investigação forense de documentos foi com canetas de tinta permanente, no qual, canetas pretas e vermelhas de fabricos e países diferentes foram selecionadas. O foco deste estudo foi, mais uma vez a degradação dos componentes corantes presentes nas canetas de tinta permanente. A técnica analítica escolhida foi o HPLC de par iónico que permite monitorizar as alterações da composição química nestas tintas de diferentes marcas e modelos, depois da exposição à luz (envelhecimento artificial) ou sob condições naturais de envelhecimento, uma vez que este estudo permite oferecer evidências científicas para a determinação e datação destas tintas em documentos considerados suspeitos. Este estudo permitiu

a identificação de algumas tintas pretas e vermelhas com base no número e tipo dos componentes principais, tendo em conta os seus perfis nos cromatogramas.⁶

Como já dissemos neste trabalho, os agentes corantes são os componentes, das tintas, preferencialmente escolhidos para estudar e perceber qual a composição química destas, seja pela pesquisa da degradação destes ou pela análise direta dos documentos. Sendo assim, foi também efetuada uma pesquisa acerca dos agentes corantes. Este ponto é importante, uma vez que estes podem ter produtos de degradação que podem interferir nos resultados das tintas.³

Como já foi referido, os corantes como o Violeta de Cristal (*Crystal Violet*) e Violeta de Metilo (*Methyl Violet*) podem sofrer degradação mesmo em condições condicionadas e controladas (no escuro) pela oxidação do O₂. Neste sentido, foi feito um estudo onde foram preparados dois grupos de amostras de tinta com o intuito de estudar a influência de fatores ambientais na sua degradação. Este estudo permitiu a utilização de técnicas analíticas diferentes – TLC, Raman e GC. Todas as amostras foram previamente aquecidas e expostas à luz (foi utilizada uma lâmpada de xenon por ter um espectro de absorção semelhante ao espectro da luz solar, sendo possível mimetizar, desta forma, a luz solar).³

Sendo o Violeta de Cristal (*Crystal Violet*) considerado o composto corante presente na maioria dos instrumentos de escrita é, também ele, alvo de alguns estudos.

Um estudo que encontramos na literatura, particularmente interessante consiste no estudo do desaparecimento deste composto sob condições de luz, utilizando técnicas como HPLC-PDA, LC-MS e FORS em solução aquosa e no papel, por forma a retirar conclusões pertinentes acerca da sua degradação quando depositado no papel. Outros objetivos que se pretendem alcançar com este trabalho estão relacionados com alguns desenhos e documentos de Van Gogh. Feita uma pesquisa a estes detetou-se que a cor castanha original passou a roxa que demonstrou em testes preliminares ser constituída por Violeta de Metilo (*Methyl Violet*), entre outros. Sendo assim, é importante saber a composição desta tinta e explicar a mudança de cor - serão processos de descoloração? Desta forma, será também possível obter informação sobre a composição química da tinta original.²¹

Os resultados relevantes deste estudo podem ser divididos em três partes:

- A análise do CV em solução permitiu perceber que após a radiação desta solução há uma mudança de cor de roxo para avermelhado. Pela observação dos cromatogramas resultantes da análise por HPLC podemos tirar conclusões interessantes ao analisar as suas diferenças. É então, observada uma diminuição da concentração de CV e a formação de, pelo menos, onze produtos de degradação.
- Pela análise do mesmo corante no papel por HPLC-PDA foi possível os investigadores concluírem, que o conhecimento dos produtos formados durante o desaparecimento/desvanecimento do CV e a sua concentração fornece informação sobre o corante inicial usado na preparação da tinta e, conseqüentemente, a sua cor original, sendo possível estimar a data da sua produção. É importante, ainda, ter presente que o CV é frequentemente utilizado numa mistura com vários derivados desmetilados e seria necessário conhecer o “histórico” do fabrico da tinta e o método de produção do corante para não interpretar mal os dados das amostras de tinta.
- Quanto à análise dos desenhos e documentos do Van Gogh e seus contemporâneos é possível concluir com este estudo que a tinta roxa contém uma mistura de Violeta de Metilo (*Methyl Violet*) e *Fuchsine* que pode ser o resultado da degradação do CV no

papel ou a tinta original utilizada já continha na sua composição química estes corantes.²¹

Estudos recentes sugerem que a degradação de corantes de triarilmetano fornece a “idade” de um fragmento de texto escrito com tinta de esferográfica num documento. O maior problema na avaliação quantitativa da degradação é o facto de ser altamente dependente da exposição da luz.⁹

À semelhança do estudo anterior foram analisadas amostras de CV em solução e no papel. A solução aquosa e de metanol do corante puro foram expostas a uma lâmpada de xenon durante algumas horas numa célula de quartzo própria para espectrofotometria e posteriormente analisadas recorrendo às técnicas de MALDI-MS e UV-vis de hora a hora até os sinais do corante desaparecerem completamente, para garantir total degradação. Os fragmentos de tinta de 4 esferográficas diferentes, “envelheceram” naturalmente durante dois anos (um guardado no escuro e o outro deixada numa janela em contato com a luz solar) e de seguida analisadas por LDI-MS a cada 1-2 meses com o objetivo de acompanhar o seu processo de degradação.⁹

Foi possível concluir que os espectros de massa MALDI do corante puro CV são caracterizados pela presença de iões moleculares $M^+ = 372,2$ u. Estudos anteriores revelavam uma típica degradação do CV – perda de grupos CH_3 , enquanto que com este estudo podemos concluir que o CV tem 6 produtos de degradação ($m/z = 358,1$ u; $344,1$ u; $330,1$ u; $316,1$ u; $302,0$ u; $288,9$ u.) A presença de tantos picos no espectro inicial indica que o CV em pó quando foi comprado continha vestígios de produtos de degradação ($M^+ = 358,2$ u e $M^+ = 344,2$ u) para além do corante puro ($M^+ = 372,2$ u), tendo em conta que algumas tintas são compostas por corantes adicionais ou pigmentos, esses sinais podem interferir no espectro.⁹

Com estes estudos podemos concluir que com a ajuda dos métodos espectrométricos e espectroscópicos é possível entender melhor a degradação do corante CV para fins forenses. A reação dos corantes com os substratos de papel após exposição à luz e ao O_2 produzem o mesmo tipo de reação e induzem a degradação do corante e do papel. Todas as canetas mostram alta estabilidade na ausência de luz (apenas uma mostra ligeira degradação depois de 2 anos guardada no escuro). Estes resultados têm um peso significativo na datação forense de documentos, uma vez que eles implicam que os cientistas devem ter cuidado ao tentar datar a tinta medindo a degradação do corante e as peculiaridades como: condições de armazenamento, composição da tinta e a espessura das entradas deve ser tida em conta antes de ser feita uma declaração legal.⁹

Estabelecer a “idade” aproximada da tinta num documento é, normalmente, uma tarefa complicada e uma questão controversa em ciência forense, sendo por isso, necessário encontrar estratégias que o permitem fazer. Algumas delas, já fomos vendo ao longo deste trabalho que assentam na análise dos corantes, no entanto pode ser adotada outra abordagem que é a análise de solventes nas tintas esferográficas. Não esquecer que os solventes representam mais de 5% do peso das tintas de esferográficas e que desaparecem ao longo do tempo. O solvente mais estudado é o fenoxietanol, uma vez que está presente em 80% das esferográficas de uso comum, a diferentes concentrações. Este é um composto orgânico volátil, reconhecido como um solvente que evapora com o envelhecimento da tinta. As investigações mais recentes têm-se centrado na perda deste solvente, antes e depois de sofrer aquecimento. Durante décadas assistimos ao desenvolvimento de métodos que fossem eficazes na análise de compostos voláteis presentes nas tintas e capazes de fazer a sua datação através da monitorização da perda de fenoxietanol ao longo do tempo.²²⁻²⁴

1.6 Objetivo do Trabalho

Tendo em conta tudo o que já foi dito e a forte pesquisa efetuada, neste projeto científico propomo-nos a completar a base de dados já criada no Laboratório de Polícia Científica, na área da físico-química, reunindo e aplicando toda a informação recolhida na literatura quando for oportuno. Através da técnica de HPLC-DAD é possível separar e caracterizar alguns componentes, nomeadamente os corantes, presentes nas tintas de esferográficas azuis.

Numa primeira fase, as amostras de tinta, previamente extraídas do papel, foram analisadas por esta técnica resultando desta análise cromatogramas. De seguida, as amostras dos padrões dos agentes corantes foram analisadas utilizando a mesma técnica. Sendo assim, obtemos cromatogramas das tintas de esferográficas e dos padrões o que, por comparação, permitirá concluir sobre os componentes presentes nas esferográficas de marcas e modelos conhecidos.

Os resultados obtidos foram analisados através de métodos quimiométricos, nomeadamente HCA e PCA.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 Solventes utilizados

Na tabela 2.1 apresentamos os solventes utilizados neste trabalho, tanto para a preparação dos padrões como para o HPLC-DAD.

Tabela 2.1: Lista de reagentes e solventes utilizados

Nome	Fórmula Química	Fornecedor
Água Mili-Q	H ₂ O	
Acetona	C ₃ H ₆ O	Fisher
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	Fisher
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Fisher
Ácido Fórmico	CH ₂ O ₂	Montplet & Esteban (Barcelona)
Etanol	C ₂ H ₆ O	Fisher
Metanol	CH ₃ OH	Fisher
Tributilamonio hidrogenossulfato (TBAHS)	C ₁₆ H ₃₇ NO ₄ S	Fisher

2.2 Amostras de tinta de esferográficas azuis

Os instrumentos de escrita que usámos neste trabalho foram adquiridos em 2015 para a realização do trabalho anterior. No presente trabalho apenas foram analisadas as esferográficas azuis adquiridas nessa altura. Aproveitámos as fichas de identificação já criadas contendo informação sobre: marca, modelo, tipo de tinta, código do instrumento, lote/referência, número de carga, origem de aquisição, data de aquisição, recolha, análise e observações.²⁵

O código usado para cada esferográfica foi, também, o mesmo:

- Esferográfica (Ballpoint pen ink – B), cor azul (Blue – B) – código BBn

Na tabela 2.2 podemos encontrar a lista de esferográficas azuis cujas tintas foram analisadas.

Tabela 2.2: Lista de esferográficas azuis com o respetivo código de identificação, marca e modelo²⁵

Código	Marca	Modelo
BB1	BIC	E-O-30
BB2	BIC	U-E-08
BB3	BIC	P-F-26

Lista de esferográficas azuis com o respetivo código de identificação, marca e modelo (continuação)

Código	Marca	Modelo
BB4	BIC	N-H-9
BB5	BIC	T-G-4
BB6	BIC	T-G-10
BB7	BIC	A-H-10
BB8	BIC	Cristal GRIP (Q-H-19)
BB9	BIC	ATLANTIS
BB21	Pentel	SUPERB (BK77)
BB22	Pentel	STAR V (BK66)
BB31	Linha Branca	Estetica Dental Lopez (Espanha)
BB32	Linha Branca	i RISO
BB33	Linha Branca	www.FCT.unl.pt
BB34	Linha Branca	Caixa Geral de Depósitos
BB35	Linha Branca	Caixa Geral de Depósitos-Banco da EXPO 98 Lisboa
BB36	Linha Branca	Caixa Geral de Depósitos-Banco da EXPO 98 Lisboa
BB37	Linha Branca	Caixa Geral de Depósitos-Banco da EXPO 98 Lisboa
BB38	Linha Branca	Caixa Geral de Depósitos-Banco da EXPO 98 Lisboa
BB39	Linha Branca	Caixa Geral de Depósitos-Banco da EXPO 98 Lisboa
BB40	Linha Branca	Grupo Banco Espirito Santo (BES)
BB41	Linha Branca	Note it
BB42	Linha Branca	Note it
BB43	Linha Branca	Note it
BB44	Linha Branca	Sagres-Companhia de Seguros. s.a.
BB45	Linha Branca	Estúdio Fotográfico, Lda
BB46	Linha Branca	STAPLES (traço de 0,7mm)
BB47	Linha Branca	Note it
BB48	Linha Branca	USO
BB49	Linha Branca	IBEROSTAR,Hotels e Resorts (Tunisia)
BB50	Linha Branca	C A1
BB51	Linha Branca	STAPLES – REVU
BB52	Linha Branca	Santander Totta
BB53	Linha Branca	STAPLES-COMFORT STIC. 1.0
BB54	Linha Branca	KEESING Technologies
BB55	Linha Branca	LaborSpirit,Lda
BB56	Linha Branca	TECHNO SPEC

BB57	Linha Branca	Não tem
BB81	Uni Mitsubishi Pencil	Lakubo (uni SG-100 (07) blue)
BB91	Paper Mate	Ink Joy 100 1.0M (Ponta:1,0mm)
BB101	Corvina	WH-T (Ponta:1,0mm)
BB102	Corvina	51 (Ponta:1,0mm)
BB106	Reynolds	Medium 048
BB116	molin	Twisty
BB121	ACVILA	FINE 309
BB126	Lecce Pen	Não tem
BB127	Lecce Pen	Não tem
BB128	Lecce Pen	Não tem
BB131	RTC	Não tem

Lista de esferográficas azuis com o respetivo código de identificação, marca e modelo (continuação)

Código	Marca	Modelo
BB132	RTC	Não tem
BB136	Office Cover	ASTRO (Ponta: 1,0mm)
BB141	Pelikan	Não tem
BB151	LINC	Glycer fine
BB156	STABILO	galaxy 818 M
BB161	A.G. SPALDING BROS.	Não tem
BB166	WATERMAN	STANDARD MAX. (MOYENNE/MEDIUM)
BB171	WATERMAN	

2.3 Preparação dos padrões

Para se obter os cromatogramas dos agentes corantes comerciais (padrões) com o objetivo final de comparar com os resultados obtidos para as esferográficas, foram preparadas soluções de cada um destes padrões tendo em conta a sua solubilidade (pesquisada na literatura). Numa primeira fase, foram feitos os cálculos para uma concentração final de 10^{-4} com o intuito de saber a quantidade necessária de cada composto. Na preparação das várias soluções dos agentes corantes em estudo, utilizaram-se vários solventes tais como metanol 99,8% (FLUKA®), acetona 99,98% (Fisher Chemical®), etanol 99,99% (Fisher Chemical®) e água mili-Q.

No entanto, o principal desafio, neste ponto, foi encontrar a concentração ideal a injetar no HPLC, uma vez que esta não era igual para a obtenção de bons cromatogramas, variando de padrão para padrão.

Na tabela 2.3 apresentamos algumas características dos padrões utilizados para posterior comparação com as tintas.

Tabela 2.3: Algumas características dos padrões utilizados

Agente Corante	Índice de cor (C.I.)	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	Número CAS	Fabricante	Teor do corante (%)	Solúvel em:
Rodamina B	45170	$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$	479,01	81-88-9	ALDRICH R	80	Metanol
Violeta de Cristal	42555	$C_{25}H_{30}N_3Cl$	407,98	548-62-9	ALDRICH R	91	Água
Azul Vitória Puro BO	42595	$C_{33}H_{40}ClN_3$	514,14	2390-60-5	FLUKA R	95	Água
Azul Patente VF	42045	$C_{27}H_{31}N_2NaO_6S_2$	566,66	129-17-9	SIGMA-ALDRICH R	50	Água
Violeta de Metilo B base	42535:1	$C_{24}H_{25}N_3$	357,49	52080-58-7	ALDRICH R	85	Etanol
Violeta de Etilo	42600	$C_{31}H_{42}N_3Cl$	492,14	2390-59-2	ALDRICH R	75	Metanol
Azul Vitória R	44040	$C_{29}H_{32}ClN_3$	458,04	2185-86-6	ALDRICH R	80	Metanol

2.3.1 Estrutura química dos padrões (agentes corantes)

Na figura 2.1 apresentamos a estrutura de cada um dos agentes corantes (padrões) utilizados para posterior comparação com as esferográficas azuis em análise.

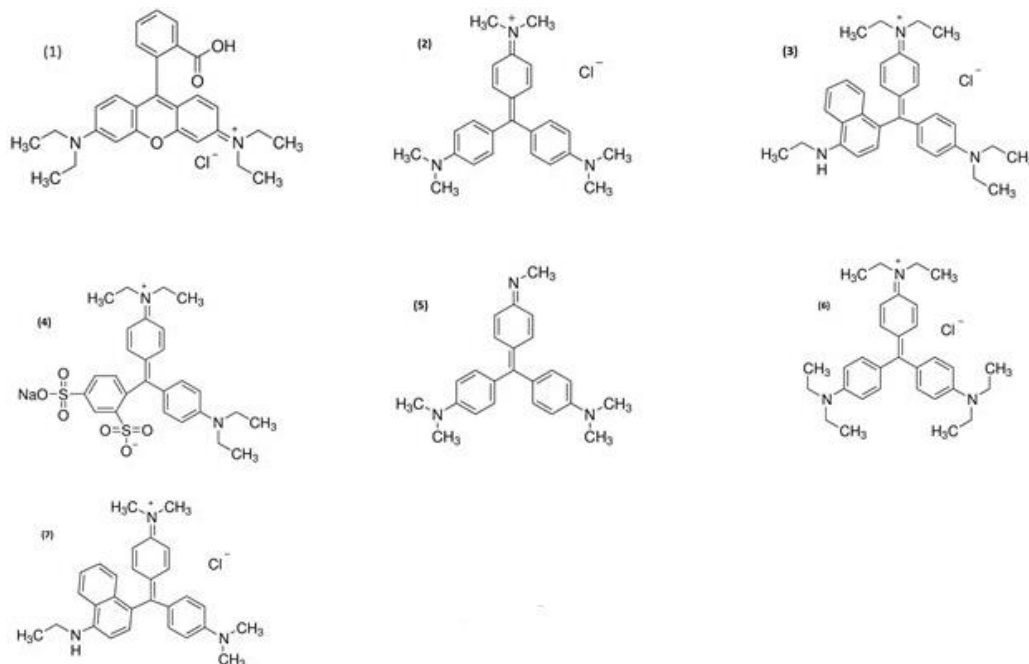


Figura 2.1: Estrutura química dos padrões: (1) Rodamina B (*Rhodamine B*); (2) Cristal Violeta (*Crystal Violet*); (3) Azul Vitória Puro BO (*Victoria pure blue BO*); (4) Azul Patente VF (*Patent Blue VF*); (5) Violeta de Metilo B base (*Methyl Violet B base*); (6) Violeta de Etilo (*Ethyl Violet*); (7) Azul Vitória R (*Victoria blue R*).

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 HPLC

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) é uma técnica analítica com grande impacto na atualidade e com várias aplicações em diferentes áreas. No âmbito forense esta é uma técnica utilizada essencialmente para a identificação de drogas, explosivos e tintas.

O que se pretende alcançar quando se utiliza este método é a separação de diferentes espécies químicas numa determinada amostra em estudo. A separação acontece através de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto (amostra) e as duas fases, a estacionária e a móvel. A fase estacionária consiste numa coluna cromatográfica, isto é, um cilindro rígido (normalmente de aço ou vidro) no interior do qual se encontra um material formado por pequenas partículas, normalmente de sílica. A fase móvel flui continuamente pela coluna de acordo com o fluxo escolhido pelo operador arrastando, consigo, a amostra até atingir o detetor.

É importante saber que as substâncias presentes na amostra, devido às suas estruturas moleculares e grupos funcionais, apresentam diferentes graus de “afinidade” com as fases móvel e estacionária e, como consequência, as velocidades de migração serão distintas, permitindo, desta forma, a separação cromatográfica. Podemos então concluir que a substância que elui primeiro será a que apresenta menor afinidade com a fase estacionária e por conseguinte, maior afinidade com a fase móvel.

Sendo assim, esta técnica separa as espécies químicas tendo em conta as suas estruturas moleculares e, por isso, pode ser utilizada para separar, identificar e quantificar substâncias presentes nas diferentes amostras que pretendemos analisar.²⁶

Tendo presente a definição deste método de separação, é fácil perceber porque foi o escolhido para este trabalho: sendo o principal objetivo a identificação dos compostos corantes das tintas esferográficas, a técnica mais adequada para o fazer é o HPLC, uma vez que permite a identificação e separação dos diversos componentes de uma amostra. Sendo assim, ao injetar a tinta previamente extraída de cada esferográfica iremos conseguir separar os seus componentes e, comparando com os cromatogramas de cada padrão de composto corante, perceber quais os agentes corantes que estão presentes em cada esferográfica.

Em primeiro lugar, desenhámos linhas em folhas de papel branco (Papel de Escritório Português 300%, folhas A4, tamanho 21x29,7, Portucel Soporcel) com cada esferográfica que seria, posteriormente, submetida a análise. De seguida, foram recortados pequenos círculos do papel contendo a tinta, com o auxílio de um instrumento de corte próprio para o efeito. De seguida, foi necessário extrair a tinta do papel - para isso preparámos uma solução de metanol/acetona (1:1 v/v), adicionámos 40uL desta solução aos círculos de papel recortados e colocámos num ependorf durante 40 minutos. Ao fim deste tempo, recolhemos 20uL da solução contendo a tinta e injetámos no HPLC-DAD. A tabela 2.4 resume as condições de extração da tinta.

Tabela 2.4: Condições de extração da tinta do papel: solução de extração

Solução de extração	Volume (uL)	Tempo (min)
Acetona/Metanol (1:1)	40	40

O equipamento utilizado no LPC tinha as seguintes características: sistema *Agilent ChemStation* com uma coluna Alltima C18 (3µm) 7x53mm. O método otimizado para análise de esferográficas azuis consiste num gradiente de acetonitrilo e um tampão (tributilamonio hidrogenossulfato – TBAHS e ácido cítrico monohidratado em água) (tabela 2.5), utilizando o equipamento de HPLC-DAD do LPC (fig. 2.2):

Tabela 2.5: Método HPLC-DAD – gradiente de solventes (tempo, % tampão e % ACN)

Tempo (min)	% Tampão	% ACN
0	30	70
18	30	70
25	50	50
40	50	50



Figura 2.2: equipamento HPLC-DAD (LPC)

A preparação do tampão era feita todos os dias, uma vez que este podia sofrer degradação de um dia para o outro. Este sistema tinha incorporado um sistema de filtração e degaseificação, pelo que não era necessário efetuar esses procedimentos previamente.

É, sim, necessário equilibrar o sistema - purga dos canais de forma a garantir que não existiam bolhas de ar. A injeção é manual.

O método utilizado (tabela 2.5) consiste em 40 minutos de análise, sendo que durante 18 minutos a percentagem de acetonitrilo é superior (70-30) e aos 25 minutos atingimos % 50-50 dos dois solventes que se mantém até ao fim da análise. O fluxo é constante e de 2ml/min e a temperatura fixada nos 40°C.

O método anterior foi alterado passando a ser utilizado um gradiente de água ácida (ácido fórmico) e acetonitrilo (tabela 2.6), utilizando o equipamento HPLC-DAD do laboratório do Departamento de Química da Universidade de Coimbra com as seguintes características: sistema *Elite Lachrom HPLC-DAD* com L-2455 *Diode Array Detector*, coluna do tipo L-23000 (RP-18), bomba L-2130 e injetor automático da amostra L-2200 (fig. 2.3).

Tabela 2.6: Método HPLC-DAD para a maioria das amostras de tinta – gradiente de solventes (tempo, %H₂O ácida e %ACN)

Tempo (min)	%H ₂ O ácida	% ACN
0	95	5
1,5	85	15
8	50	50
10	50	50
18	70	30
28	80	20
30	95	5



Figura 2.3: equipamento HPLC-DAD (DQ-UC)

A preparação dos solventes utilizados na análise por HPLC-DAD era feita todos os dias, e consistia, em primeiro lugar, na filtração de cada solvente que de seguida era submetida a um banho de ultrassons com o intuito de eliminar as bolhas de ar, durante 15 minutos.

Depois de equilibrar o sistema - purga de cada canal e da seringa de forma a eliminar qualquer bolha de ar existente, - o método utilizado como podemos ver na tabela 2.6, consiste em 30 minutos de análise em que a variação do gradiente de solventes (água ácida e acetonitrilo) é feita de uma forma gradual. Sendo assim, acontece uma diminuição da %H₂O ácida até atingir um gradiente de 50-50 (%H₂O ácida - %ACN) que é mantido durante 10 minutos. A partir dos 18 minutos, o sistema é programado para aumentar, gradualmente, a %H₂O ácida com o objetivo de atingir as condições iniciais de forma a equilibrar o sistema para nova injeção. De referir que o fluxo

foi constante, de 1,5ml/min e temperatura de 35°C, também constante. Este método foi usado tanto para a análise dos padrões como das tintas de esferográfica.

Uma das maiores dificuldades e um grande desafio foi perceber a razão pela qual, compostos como o Violeta de Etilo (*Ethyl Violet*), Azul de Vitória puro BO (*Victoria pure blue BO*) e Azul de Vitória R (*Victoria blue R*), não tinham qualquer resultado com o método que estávamos a utilizar. Sendo assim, tivemos que pensar nos conceitos de polaridade e afinidade com a coluna, uma vez que estes compostos têm vários grupos CH₃ (apolares) possuem elevada afinidade com a coluna C₁₈ (também apolar), ficando retidos nesta e não obtínhamos qualquer resultado. A solução que encontramos para resolver esta situação foi alterar o gradiente do método, aumentando a percentagem de acetonitrilo, composto mais apolar e por conseguinte com maior afinidade ao composto em análise “arrastando-o” até ao detetor.

Neste caso estamos perante corantes da família de triarilmetano, que são compostos orgânicos sintéticos contendo “espinhas dorsais” de trifenilmetano (Fig. 2.4). Sendo corantes, estes compostos são intensamente coloridos que podem ser agrupados por famílias de acordo com a natureza dos substituintes nos grupos arilo:

- Corantes do tipo Violeta de Metilo (*Methyl violet*) – grupos dimetilamino nas posições p de dois grupos arilo;
- Corantes *Fuchsine* – aminas primárias e secundárias (NH e NHMe) nas posições p de cada grupo arilo;
- Corantes do tipo Fenol (*Phenol*) – grupos hidroxilo nas posições p de, pelo menos, dois grupos arilo;
- Corantes *Malachite green* - semelhantes aos corantes do tipo Violeta de Metilo (*Methyl violet*) com a diferença que contêm um grupo fenil (CH);
- Corantes do tipo Azul Vitória (*Victoria blue*) - semelhantes aos corantes do tipo Violeta de Metilo (*Methyl violet*) com a diferença que contêm um grupo naftilamino. As diferenças são encontradas nos substituintes dimetilamina vs dietilamino nos anéis fenilo e na amina secundária no grupo naftilo.²⁷

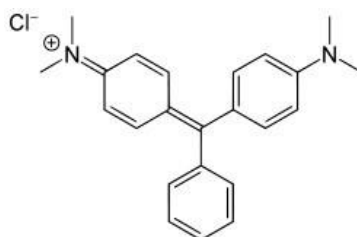


Figura 2.4: Estrutura base dos corantes da família triarilmetano²⁷

Atendendo ao que foi dito, o método de análise dos corantes da família dos triarilmetanos foi o que consta na tabela 2.7.

Tabela 2.7: método HPLC-DAD com maior percentagem de Acetonitrilo – gradiente de solventes (tempo, %H₂O ácida e %ACN)

Tempo (min)	%H ₂ O ácida	%ACN
0	60	40
2	50	50
6	40	60
10	30	70
20	20	80
30	30	70
31	50	50
32	60	40

Com este método, o sistema começa com 60% H₂O ácida e 40% acetonitrilo (ACN) e de forma gradual atinge o máximo de 80% de ACN aos 20 minutos, após este momento, o sistema volta, de forma gradual, às condições iniciais (60-40% H₂O ácida-ACN). Sob estas condições foi possível obter resultados para aqueles compostos Violeta de Etilo (*Ethyl Violet*), Azul de Vitória puro BO (*Victoria pure blue BO*) e Azul de Vitória R (*Victoria blue R*). Sendo assim, as tintas de esferográficas que contêm este tipo de agentes corantes serão submetidas a este método.

A grande vantagem do HPLC-DAD é que, para além, dos cromatogramas (intensidade em função do tempo de retenção) é possível obter os espectros de absorção de cada pico, importantes para perceber os máximos de absorção, que nestes compostos com cores bem visíveis será na zona dos 580nm.

2.5 Análise de Resultados^{28,29}

2.5.1 Análise de agrupamento hierárquico (HCA)

Sabendo que um dos objetivos deste trabalho é o agrupamento das esferográficas tendo em conta as semelhanças da sua composição química, foi necessário recorrer a métodos quimiométricos. No nosso caso o método que se revelou mais eficaz foi o HCA que pela produção de um dendograma permite associar/agrupar os objetos em estudo tendo em conta as suas semelhanças, segundo as variáveis, previamente, escolhidas. Sendo assim, os dendogramas são úteis, uma vez que permitem estabelecer as semelhanças entre os objetos representados por pontos no espaço. É, então possível agrupar os pares de pontos que se encontram mais próximos, recorrendo à distância euclidiana e substituí-los por um novo ponto localizado na metade da distância entre eles.^{30,31}

Este método consiste numa série de agrupamentos sucessivos entre objetos partindo de *n* grupos com apenas um objeto, que vão sendo agrupados sucessivamente até encontrar um grupo que inclui todos os *n* objetos. Começamos pela construção de uma “matriz de distâncias” que é

calculada e armazenada durante o processo. Nesta, cada elemento descreve o grau de diferença entre cada dois objetos com base nas variáveis escolhidas.³¹

Para calcular a distância entre grupos encontram-se disponíveis vários algoritmos de agrupamento já otimizados e testados (ligação simples – *single linkage*; ligação completa – *complete linkage*; média das distâncias – *average linkage*; centróide; mediana; soma dos quadrados/variância – Ward.³¹

A medida de distância permite definir uma medida de similaridade e/ou dissimilaridade, sendo que os objetos idênticos são então agrupados e os outros distribuídos por diferentes grupos.³¹

2.5.2 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) surgiu em 1901, sendo uma das técnicas deste tipo mais antigas e uma ferramenta de compressão da informação multivariada. O que se pretende com esta análise é, essencialmente, a redução da dimensão de um conjunto de dados que apresentem um grande número de variáveis inter-relacionadas, mantendo tanto quanto possível, a sua variabilidade. Esta redução é possível transformando num novo conjunto de variáveis, as componentes principais, não correlacionadas.³²⁻³⁴

Este método permite, então, a representação do conjunto de dados original num novo sistema de referência caracterizado por estas novas variáveis.³⁴

Cada componente (PC) tem o objetivo de explicar a maior variabilidade possível, contida no conjunto de dados original. As componentes principais (PC's), que são expressas como combinações lineares das variáveis originais, são ortogonais entre si e podem ser usadas para uma representação mais eficiente do sistema em estudo, com um número menor de variáveis do que na situação original.³⁴

Esta técnica apresenta uma grande variedade de aplicações.³⁴

O PCA é recomendado como uma ferramenta para encontrar tendências ou padrões, revelando *outliers* e agrupando dados desconhecidos. É um método simples, não paramétrico, de extração de informações relevantes a partir de conjuntos de dados multivariados.^{29,35-37}

Quanto aos métodos de agrupamento (*clustering*), o objetivo principal consiste em dividir os dados em grupos de objetos semelhantes, utilizando um método de aprendizagem não supervisionado. São várias as técnicas de agrupamento, como por exemplo, o agrupamento divisivo, hierárquico e o agrupamento baseado em densidade, assim como são vários os algoritmos de agrupamento.²⁹

Resumindo, os métodos hierárquicos baseiam-se em sucessivas divisões do conjunto de dados e o resultado final é uma sequência de agrupamentos, que pode ser representada num dendrograma.^{38,39}

Cada nível de associação do dendrograma representa uma divisão do conjunto de dados num número específico de grupos. Sendo assim, é possível definir o número de grupos, sendo este passo muitas vezes baseado na intuição tendo em conta a estrutura de dados.⁴⁰

Por todas estas razões tanto a análise de PCA como HCA se mostraram bastante úteis neste trabalho. Por um lado os dendogramas do HCA permitiram o agrupamento das tintas de esferográficas tendo em conta as suas semelhanças, e por outro o PCA permitiu a redução da dimensionalidade dos dados obtidos.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1 Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos padrões (agentes corantes)

Sendo o principal objetivo a comparação das tintas de esferográficas com os padrões de agentes corantes que poderão estar na sua composição, apresentamos nas figuras 3. os resultados obtidos aquando da análise destes padrões cujas estruturas químicas se encontram no Capítulo 2.

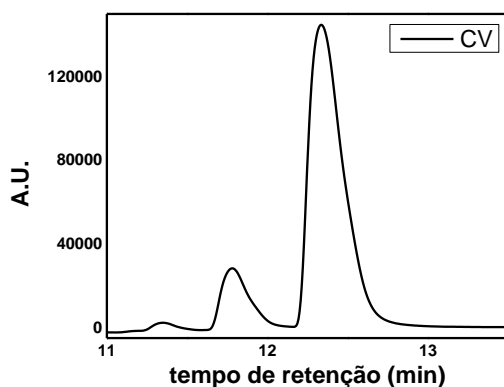


Figura 3.1: Cromatograma obtido por HPLC do padrão de Violeta de Cristal (*Crystal Violet* - CV)

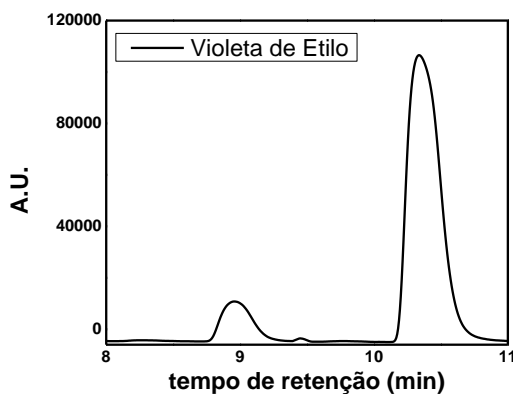


Figura 3.2: Cromatograma obtido por HPLC do padrão Violeta de etilo (*Ethyl Violet*)

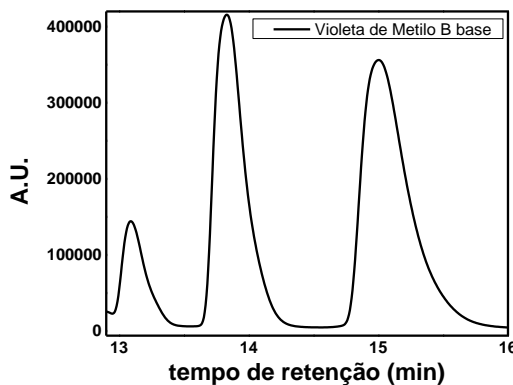


Figura 3.3: Cromatograma obtido por HPLC do padrão de Violeta de metilo B base (*Methyl violet B base*)

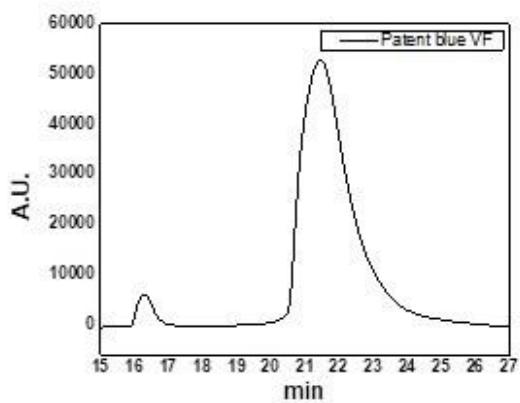


Figura 3.4: Cromatograma obtido por HPLC do padrão Patente azul VF (*Patent blue VF*)

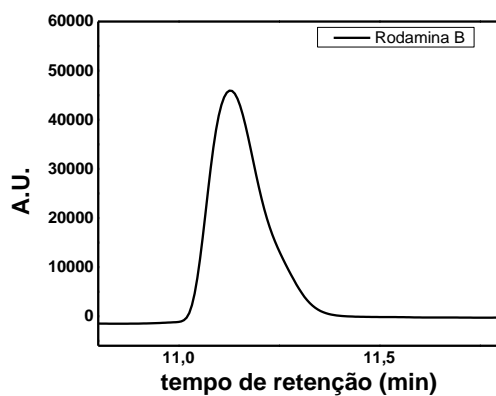


Figura 3.5: Cromatograma obtido por HPLC do padrão Rodamina B (*Rhodamine B*)

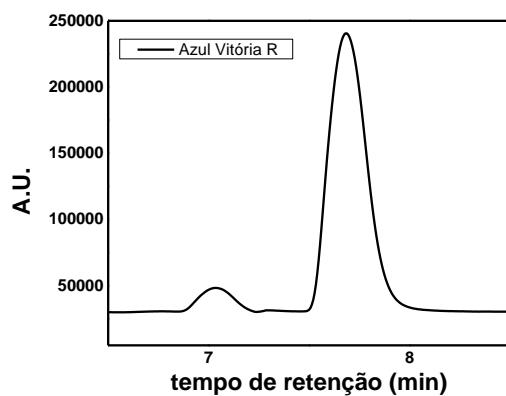


Figura 3.6: Cromatograma obtido por HPLC do padrão Azul Vitória R (*Victoria blue R*)

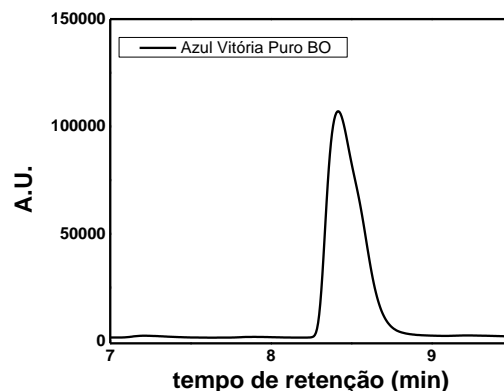


Figura 3.7: Cromatograma obtido por HPLC do padrão Azul vitória puro BO (*Victoria pure blue BO*)

3.2 Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das esferográficas azuis (método LPC)

Apresentaremos em seguida os resultados obtidos por HPLC para as tintas das esferográficas azuis utilizando o método otimizado no LPC e que foi apresentado no Capítulo 2 (fig. 3.8).

O modelo de apresentação dos resultados segue o do trabalho anterior. Sendo assim, na figura 3.8 podemos ver uma fotografia do instrumento de escrita do qual foi extraído a tinta para análise (fig. 3.8-A) e o respetivo cromatograma obtido por HPLC-DAD (fig. 3.8-B), onde são visíveis os picos com tempos de retenção e áreas.

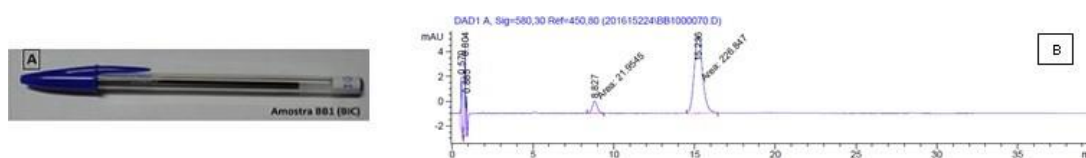


Figura 3.8: Esferográfica BB1 em que A – fotografia da amostra da qual foi retirada a tinta; B – Cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB1

As fotos e respetivos cromatogramas para as restantes esferográficas encontram-se no Anexo A, figuras A1 a A54.

Apesar deste método se ter mostrado eficaz para a análise das tintas de esferográfica, não se revelou do mesmo modo para a análise dos padrões dos agentes corantes. Sendo assim, este trabalho teve continuação no Laboratório do Departamento de Química da Universidade de Coimbra e outro método foi otimizado.

3.3 Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das esferográficas azuis (método DQ-Coimbra)

Tendo em conta o método proposto pela Professora Conceição Oliveira do Instituto Superior Técnico de Lisboa para análise de esferográficas, este foi otimizado por forma a obter os melhores resultados para o presente trabalho. Sendo assim, o método utilizado é o que está explicado no Capítulo 2 (tabela 2.6). Uma vez que o método foi alterado, tivemos que analisar novamente as tintas de esferográficas, já analisadas no LPC, para ser possível a comparação com os padrões dos agentes corantes que encontramos na literatura, como sendo aqueles que estão presentes nas tintas dos instrumentos de escrita deste tipo, pois só com o mesmo método a comparação feita é eficaz. Sendo assim, selecionámos apenas 35 amostras das tintas de esferográficas já analisadas pelo método do LPC.

Numa primeira análise foi possível agrupar as tintas de esferográficas em cinco grupos, tendo em conta a presença dos padrões. Apresentamos nas figuras 3.9, 3.10, 3.11, 3.12 e 3.13 um exemplo de cada um.

O modelo de apresentação destes resultados será o mesmo do anterior e encontra-se nas figuras seguintes.

Os restantes resultados encontram-se no Anexo B, figuras B1 a B31.

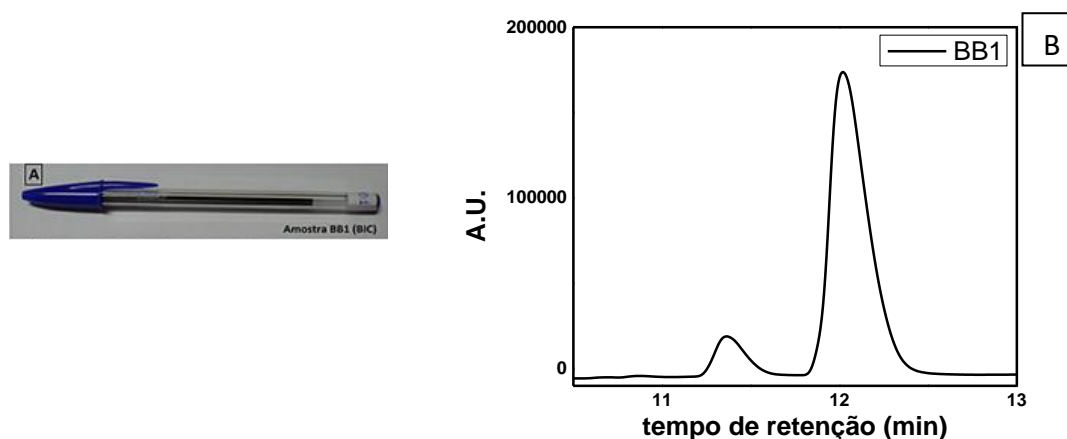


Figura 3.9: Esferográfica BB1 (Bic) em que A – fotografia da amostra da qual foi retirada a tinta; B – Cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB1

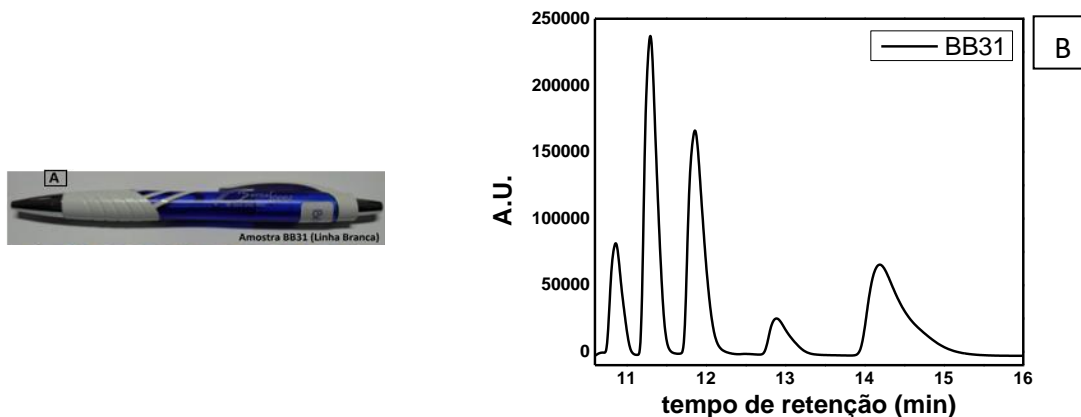


Figura 3.10: Esferográfica BB31 (linha branca) em que A – fotografia da amostra da qual foi retirada a tinta; B – Cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB31

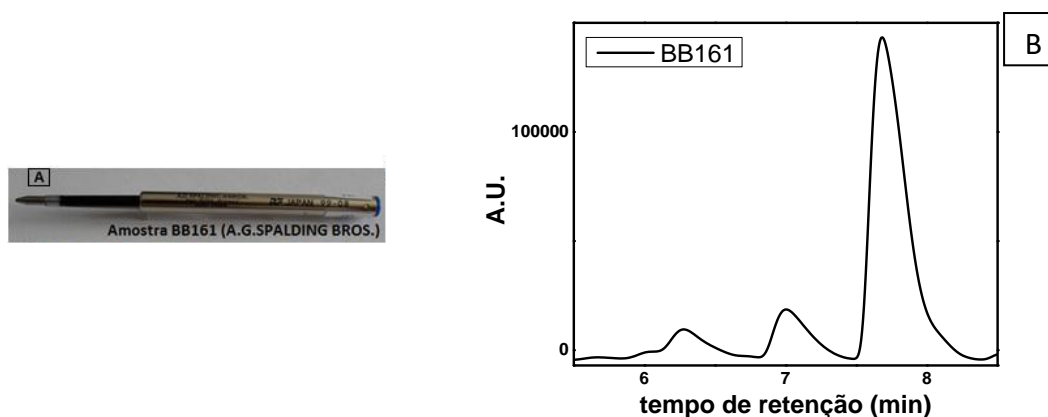


Figura 3.11: Esferográfica BB161 (A.G. Spalding Bros.) em que A – fotografia da amostra da qual foi retirada a tinta; B – Cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB161.

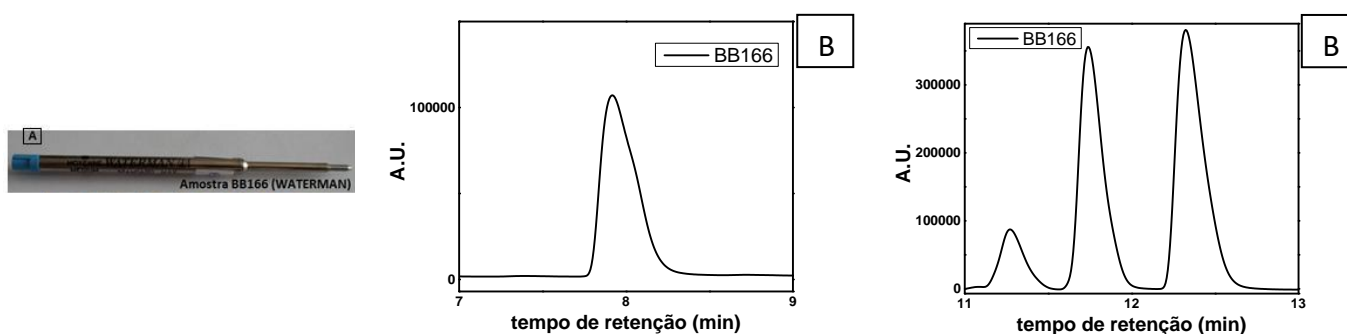


Figura 3.12: Esferográfica BB166 (LINC) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB166.

3.4 Espectros de Absorção

Sendo esta técnica HPLC-DAD significa que temos informação adicional dos espectros de absorção de cada pico do cromatograma, uma vez que o detetor acoplado assim o permite (DAD, do inglês *Diode Array Detector*). Esta informação é bastante útil neste caso, uma vez que conseguimos perceber em que região do espectro as tintas, e por conseguinte, os seus constituintes absorvem, sendo mais um ponto que pode ser comparado entre as tintas e os padrões. Neste caso, como estamos perante compostos corados, estes irão absorver na região do visível, neste caso a maioria das tintas absorve a 590nm, conforme pesquisado na literatura. Fizemos, então a representação da sobreposição dos perfis químicos das tintas analisados com os padrões que mais se assemelham e a sobreposição dos espectros de absorção dos mesmos. Na figura 3.13 apresentamos um exemplo sendo que os restantes resultados se encontram no Anexo C, figuras C1 a C32.

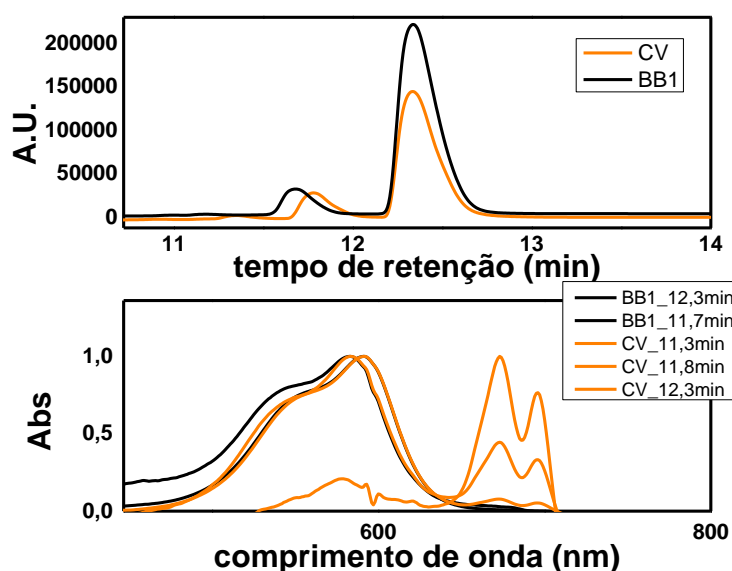


Figura 3.13: de cima para baixo: Cromatogramas normalizados da esferográfica BB1 e do padrão de Cristal Violeta (CV); espectros de absorção normalizados da esferográfica e padrão.

3.5 Comparação dos perfis químicos das tintas de esferográficas com os padrões

De seguida fizemos a comparação entre os perfis das tintas de cada instrumento de escrita e os padrões analisados. Para isso, sobrepôs-se a caneta com o respetivo padrão, sendo possível retirar algumas conclusões.

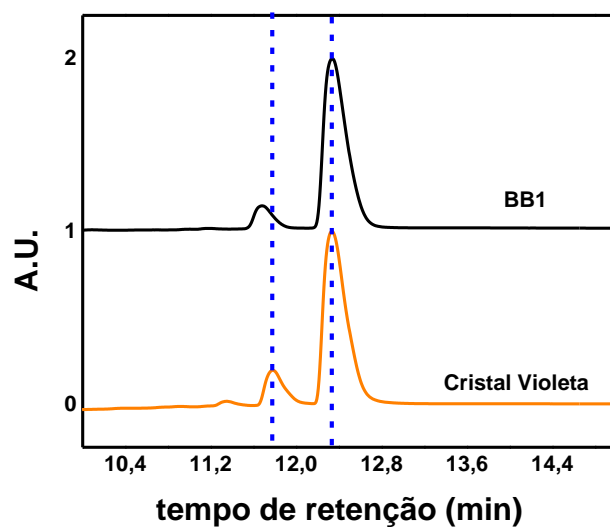


Figura 3.14: Comparação do cromatograma normalizado da esferográfica BB1 com o padrão que mais se assemelha ao seu perfil químico - Cristal Violeta.

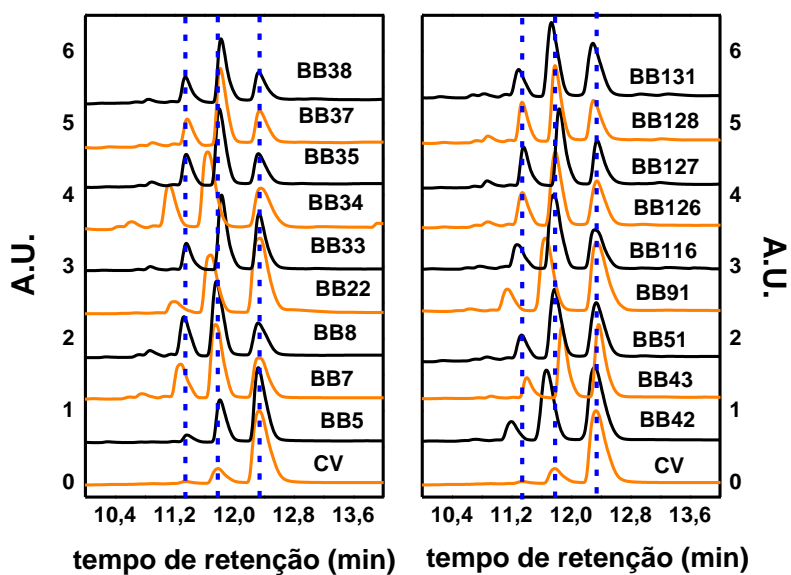


Figura 3.15: Comparação dos cromatogramas normalizados das esferográficas pertencentes ao grupo B com o padrão que mais se assemelha ao seu perfil químico - Cristal Violeta.

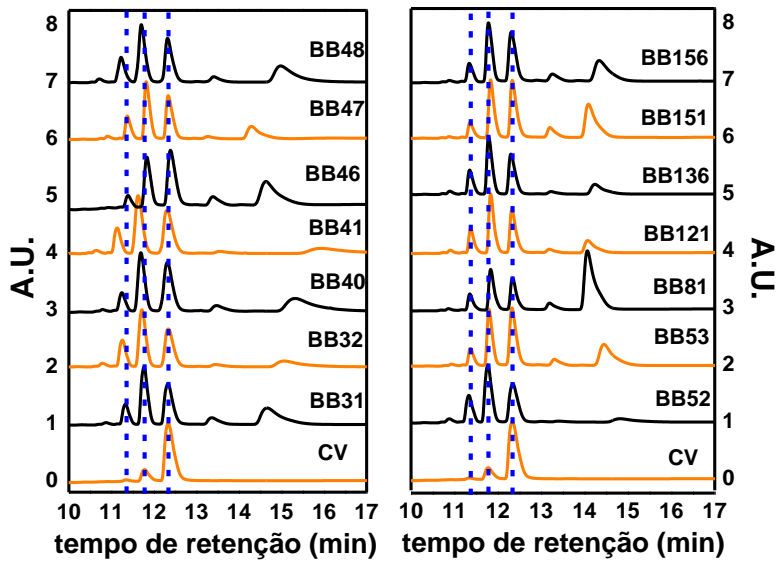


Figura 3.16: Comparação dos cromatogramas normalizados das esferográficas pertencentes ao grupo C com o padrão que mais se assemelha ao seu perfil químico - Cristal Violeta.

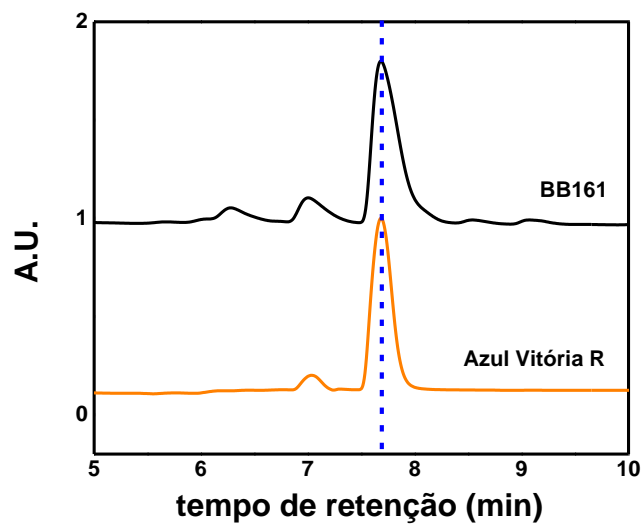


Figura 3.17: Comparação dos cromatogramas normalizados da esferográfica BB161 com o padrão que mais se assemelha ao seu perfil químico - Azul de Vitória R (Grupo D).

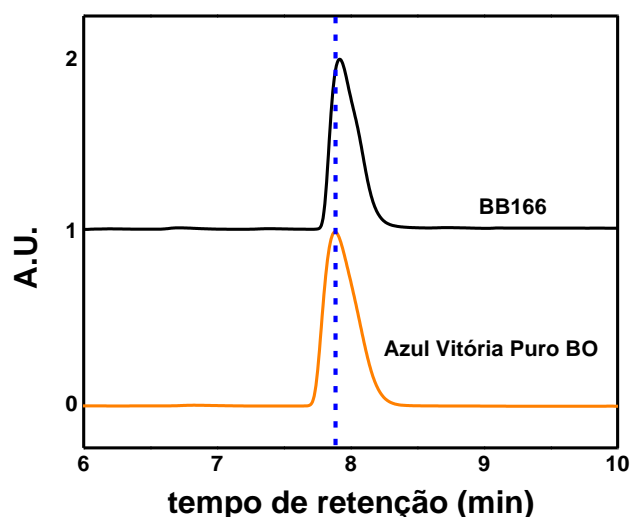


Figura 3.18: Comparação dos cromatogramas normalizados da esferográfica BB166 com o padrão que mais se assemelha ao seu perfil químico - Azul de Vitória puro BO (Grupo E).

Antes de mais, é importante referir que a razão pela qual o padrão de apresenta três picos está explicada no Capítulo 1. De facto, este corante apresenta produtos de degradação, o que pode servir para identificação específica da tinta utilizada.

Fazendo uma análise detalhada, destas figuras podemos perceber que é possível agrupar as esferográficas analisadas em 5 grupos. Na figura 3.14 podemos perceber que a tinta da esferográfica BB1 (grupo A) tem na sua composição o padrão de Cristal Violeta apresentando apenas dois picos.

Na figura 3.15, podemos encontrar o maior grupo de esferográficas (grupo B). Estas apresentam o Cristal Violeta como único componente, como é possível concluir pela sobreposição dos espectros. Todos apresentam três picos que correspondem, eventualmente, a produtos de degradação deste padrão. Neste caso, seria ainda interessante utilizar a espectrometria de massa como técnica complementar para confirmar a estrutura química do composto associado a cada pico.

Na figura 3.16, podemos encontrar outro grupo de esferográficas (grupo C), que pela sobreposição dos espectros podemos concluir que apresentam o Cristal Violeta e outro componente na sua composição química. Os picos com tempos de retenção de, aproximadamente, 14 minutos não foram associados a nenhum dos padrões analisados. Neste caso, seria fundamental a análise por espectrometria de massa de forma a concluir acerca da estrutura química destes picos desconhecidos.

Na figura 3.17, podemos ver que a esferográfica BB161 (grupo D) apresenta o padrão Azul Vitória R, como único componente, dada a sobreposição dos picos.

Por último, na figura 3.18, é possível observar que a esferográfica BB166 (grupo E), para além de Cristal Violeta, apresenta na sua constituição o padrão de Azul Vitória puro BO que só foi detetado aquando da alteração de gradiente para maior percentagem de acetonitrilo.

Com o intuito de resumir toda a informação que foi possível extrair de cada cromatograma, espectro e espectro de absorção, nomeadamente, tempos de retenção, área e máximos de absorção de cada pico para as esferográficas e padrões, criámos tabelas para cada uma amostra com estas informações. Apresentaremos um exemplo de cada grupo das tintas (tabelas 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5) e de cada padrão analisado (tabelas 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12).

As restantes encontram-se no Anexo D, figuras D1 a D31.

Tabela 3.1: Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB1

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB1	11,7	6957	7,9	583
	12,3	54895		591
	11,7	4033	10,6	583
	12,3	42920		591

Tabela 3.2: Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB5

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB5	11,4	768	21,8	576
	11,8	7634	2,2	583
	12,3	16708		592
	11,4	958	19,2	575
	11,8	8576	2,1	583
	12,3	18417		592

Tabela 3.3: Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB31

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB31	11,3	14493	3,0	575
	11,8	43196		583
	12,3	37681	1,1	592
	13,4	8282	5,2	600
	14,7	34582	1,2	618
	11,3	4963	3,3	575
	11,8	16420		583
	12,4	14376	1,1	592
	13,3	2796	5,9	600
	14,7	13787	1,2	618

Tabela 3.4: Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB161

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB161	6,3	1174	33,0	583
	7,1	3645	10,6	593/621
	7,7	38744		592
	6,9	2517	8,1	584
	7,2	3165	6,41	621
	7,7	20277		592

Tabela 3.5: Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB166

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB166_ACN	7,9	102361		611
	7,9	66673		611
BB166	11,3	15149	4,8	575
	11,7	58833	1,2	583
	12,3	73097		592
	11,3	9411	5,1	575
	11,7	38382	1,3	583
	12,3	48212		592

Tabela 3.6: Tempos de retenção (t_r), área e máximo de absorção (λ_{max}) do padrão de Cristal Violeta (*Crystal Violet*).

Padrão	T_r	Área	λ_{max}
Cristal Violeta (<i>Crystal Violet</i>)	11,3	375	576
	11,8	5790	583
	12,3	35623	591

Tabela 3.7: Tempos de retenção (t_r), área e máximo de absorção (λ_{max}) do padrão de Rodamina B (*Rhodamine B*).

Padrão	T_r	Área	λ_{max}
Rodamina B (<i>Rhodamine B</i>)	11,1	7014	557

Tabela 3.8: Tempos de retenção (t_r), área e máximo de absorção (λ_{max}) do padrão de Violeta de metilo B base (*Methyl Violet B base*).

Padrão	T_r	Área	λ_{max}
Violeta de Metilo B base (<i>Methyl Violet B base</i>)	13,1	32410	576/673/696
	13,9	112745	583/673/696
	15,0	144129	591/672/696

Tabela 3.9: Tempos de retenção (t_r), área e máximo de absorção (λ_{max}) do padrão de Azul de Patente VF (*Patent blue VF*).

Padrão	T_r	Área	λ_{max}
Azul de Patente VF (<i>Patent blue VF</i>)	21,6	87914	638

Tabela 3.10: Tempos de retenção (t_r), área e máximo de absorção (λ_{max}) do padrão de Azul de Vitória puro BO (*Victoria pure blue BO*).

Padrão	T_r	Área	λ_{max}
Azul de Vitória puro BO (<i>Victoria pure blue BO</i>)	8,5	65744	612

Tabela 3.11: Tempos de retenção (t_r), área e máximo de absorção (λ_{max}) do padrão de Violeta de Etilo (*Ethyl Violet*).

Padrão	T_r	Área	λ_{max}
Violeta de Etilo (<i>Ethyl Violet</i>)	9,0	5124	588
	10,4	32455	593

Tabela 3.12: Tempos de retenção (t_r), área e máximo de absorção (λ_{max}) do padrão de Azul de Vitória R (*Victoria blue R*).

Padrão	T_r	Área	λ_{max}
Azul de Vitória R (<i>Victoria blue R</i>)	7,0	3949	458/591
	7,7	46570	609

Só pela análise e comparação dos valores de tempos de retenção e máximos de absorção das tintas de esferográfica e dos padrões, conseguimos agrupar as esferográficas tendo em conta a presença de cada padrão. Sendo assim, foi possível fazer 5 grupos, como já dissemos anteriormente:

- Grupo A: BB1
- Grupo B: BB5, BB7, BB8, BB22, BB33, BB34, BB35, BB37, BB38, BB42, BB43, BB51, BB91, BB116, BB126, BB127, BB128, BB131
- Grupo C: BB31, BB32, BB40, BB41, BB46, BB47, BB48, BB52, BB53, BB81, BB121, BB136, BB151, BB156
- Grupo D: BB161
- Grupo E: BB166

3.6 Análise dos resultados por métodos de quimiometria (HCA e PCA)

Para atingir um dos objetivos a que nos propusemos no início deste trabalho, os resultados obtidos foram analisados recorrendo a métodos quimiométricos, nomeadamente HCA e PCA, por forma a agrupar os perfis químicos das tintas de esferográfica tendo em conta as áreas normalizadas e tempos de retenção. Sendo assim, os resultados obtidos através da análise de HCA apresentam-se sob a forma de dendogramas, representados nas figuras 3.19 e 3.21. Estes foram obtidos utilizando a distância Euclidiana e o método de ligação de Ward considerando as áreas normalizadas e os tempos de retenção.

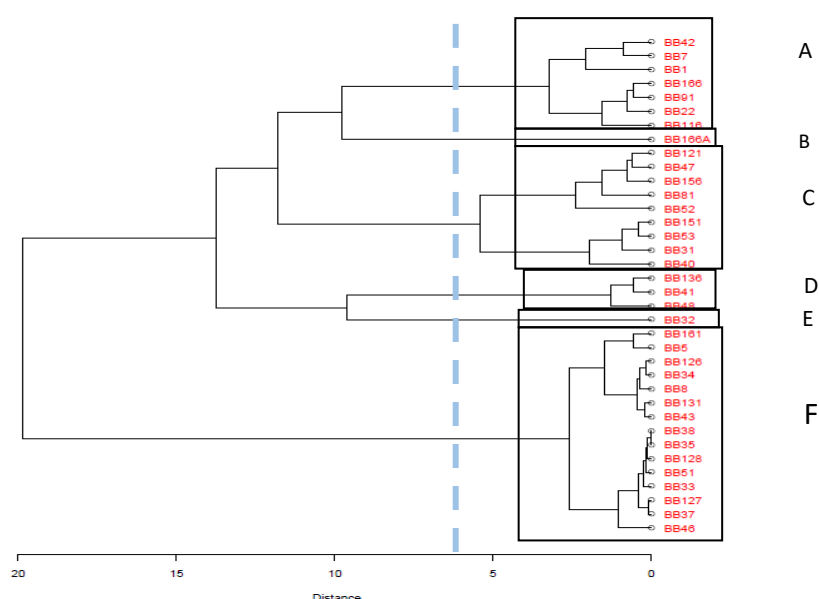


Figura 3.19: Dendrograma obtido por aplicação da análise hierárquica de agrupamentos sobre os dados referentes ao conjunto amostras de tinta de esferográfica, analisadas por HPLC e resultantes do cálculo das áreas normalizadas. O dendrograma foi construído com base no cálculo da distância euclidiana e na aplicação do método de ligação Ward.

Admitindo uma distância de 6, é possível identificar seis grupos de tintas de esferográficas com perfis químicos idênticos e observam-se dois *outliers*, BB32 e BB166_A. Este último é explicado pela mudança de gradiente no método utilizado. Aplicando o PCA sobre as áreas normalizadas, figura 3.20, é possível obter uma representação com base numa maior discriminação, uma vez que, permite analisar a posição relativa entre as amostras de tinta com base na informação mais relevante para a discriminação.

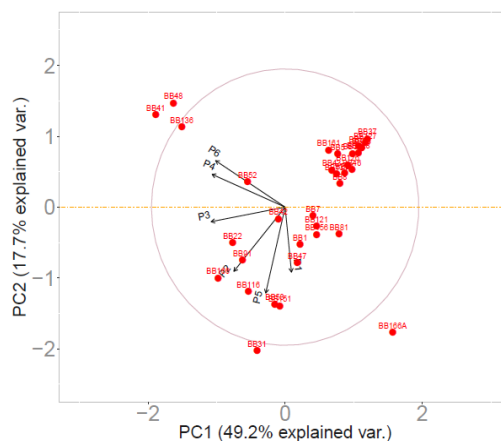


Figura 3.20: Representação sob a forma de biplot, obtida por aplicação da análise de componentes principais sobre as áreas normalizadas.

Ao analisar todos os pontos podemos observar que estes se encontram mais dispersos ao longo do eixo de PC1 (49,2%) o que significa que este eixo é aquele que retém a informação mais relevante e que discrimina melhor as amostras enquanto a componente PC2 acresce 17,7% à informação total. Neste gráfico podemos ainda observar os vetores que correspondem aos picos do cromatograma, sendo que o sentido da seta indica o sentido do crescimento, isto é, da área dos picos. Numa análise deste tipo temos que ver os picos que têm maior contribuição para a discriminação entre as amostras, ou seja, quanto maior o afastamento da origem mais importante será a variável, isto é, maior contribuição terá para a discriminação. Neste caso, temos todos os vetores (picos) a “crescer” no sentido negativo do eixo PC1, o que significa que ao projetar os vetores percebemos que o mais importante na discriminação será o P3 seguido do P2, P4 e P6; se olharmos para PC2 teremos P5 com maior contributo na discriminação seguido de P2 e P1. Uma vez que PC1 é a componente responsável por recuperar mais informação vamos analisar, fundamentalmente os vetores P3, P2, P4 e P6. Tendo isto presente, são visíveis extremos como BB41, BB48 e BB136 com maiores áreas de P6, P4 e P3; temos ainda, um grupo com tintas muito semelhantes BB161 e BB27, por exemplo, com áreas muito pequenas ou ausentes nos picos P6, P4 e P3. Quanto à tinta da esferográfica BB31 de todas as amostras, será aquela que tem maior área de P5, P1 e P2. No entanto, estes resultados foram complementados com a análise dos tempos de retenção, uma vez que a área de cada pico (proporcional à intensidade – concentração da tinta) depende de vários fatores externos, como por exemplo, a força que se imprime no papel ao fazer o traço com a esferográfica e por conseguinte zonas de tinta estarão mais concentradas que outras o que dará áreas e intensidades diferentes que não podem ser comparadas. Sendo assim, analisaremos o dendograma tendo em conta os tempos de retenção (figura 3.21).

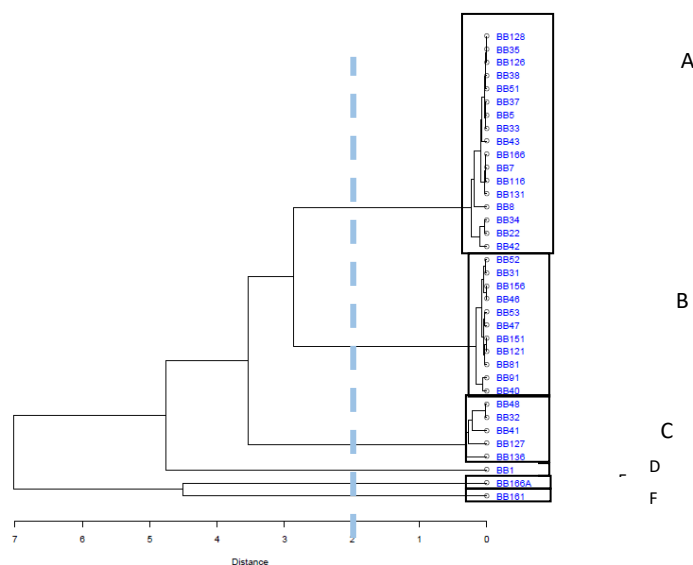


Figura 3.21: Dendrograma obtido por aplicação da análise hierárquica de agrupamentos referente ao conjunto de amostras de tinta de esferográfica, analisadas por HPLC e resultantes do cálculo dos tempos de retenção. O dendrograma foi construído com base no cálculo da distância euclidiana e na aplicação do método de ligação Ward.

Admitindo, agora, uma distância de 2 é possível identificar, à semelhança das áreas normalizadas, seis grupos de esferográficas, sendo que estes são mais semelhantes aos que fizemos só pela análise a “olho nu”. Temos então:

- Grupo A: BB128, BB35, BB126, BB38, BB51, BB37, BB5, BB33, BB43, BB166, BB7, BB131, BB116, BB8, BB34, BB22, BB42
- Grupo B: BB52, BB31, BB156, BB46, BB53, BB47, BB151, BB121, BB81, BB91, BB40
- Grupo C: BB40, BB32, BB41, BB127, BB136
- Grupo D: BB1
- Grupo E: BB166-ACN
- Grupo F: BB161

Comparando estes grupos com aqueles que criámos com base nas tabelas, observam-se muitas semelhanças. Sendo que no Grupo A do dendrograma estão incluídas, praticamente, todas as esferográficas do Grupo B das tabelas.

No Grupo B criado com base no dendrograma estão presentes algumas das esferográficas com o composto desconhecido assim como o Grupo C, com exceção da esferográfica BB91 e BB127 que têm, inequivocamente, na sua constituição do Cristal Violeta.

No grupo D está presente a tinta da esferográfica BB1, apenas com dois picos, que sobrepõem com o cromatograma de Cristal Violeta.

E os dois últimos grupos, E e F, pertencem às tintas das esferográficas cujo gradiente do método de análise foi alterado para permitir a identificação dos padrões de Azul Vitória puro BO e Azul Vitória R, que pertencem respetivamente, às esferográficas BB166 e BB161.

Passamos agora à análise do biplot resultante do PCA representado na figura 3.22.

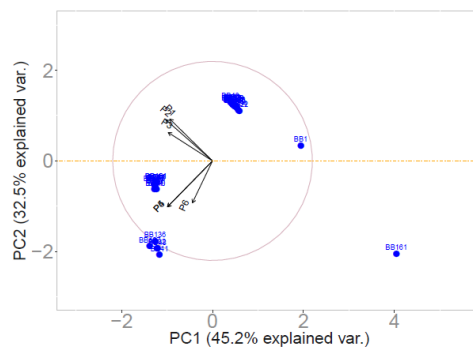


Figura 3.22: Representação sob a forma de *biplot*, obtida por aplicação da análise de componentes principais sobre os tempos de retenção.

Aplicando tudo o que foi dito para o PCA sobre as áreas normalizadas, podemos concluir que a sobreposição de amostras é muito significativa, surgindo apenas dois outliers, BB1 e BB161, que já apareciam em grupos isolados na análise do dendograma de HCA.

Temos dois grupos de tintas de esferográficas que seguem o crescimento dos vetores P4, P5 e P6, enquanto outro com alguma densidade também, segue o crescimento dos restantes vetores.

Os grupos formados pela análise do PCA seguem a tendência dos grupos formados por HCA.

NOTA: Não esquecer que a sobreposição dos pontos nesta última figura reflete também a sobreposição dos picos, fruto do alinhamento dos picos e do facto de as amostras apresentarem perfis químicos semelhantes.

Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho foram analisadas, numa primeira abordagem 57 amostras de tinta de esferográficas azuis (LPC) e de seguida apenas 35 amostras de tinta de esferográficas azuis (DQ-Coimbra) e 7 padrões de agentes corantes através da técnica HPLC-DAD acoplada a métodos quimiométricos para a análise dos resultados obtidos.

Foi possível agrupar estas amostras em seis grupos. Por comparação com os padrões foi possível perceber que a maioria das esferográficas apresenta na sua composição Cristal Violeta (*Crystal Violet*), sendo que, dois destes grupos, nomeadamente os grupos B e C, para além de terem na sua constituição este corante apresentam ainda dois picos que não conseguimos identificar a que padrão pertenciam. Duas tintas de duas esferográficas (BB161 e BB166) não foram detetadas pelo método inicial que estávamos a utilizar tendo sido ajustado o gradiente para um composto mais apolar (Acetonitrilo) revelando, assim a presença de Azul Vitória R (*Victoria blue R*) e Azul Vitória puro BO (*Victoria pure blue BO*) nestas tintas, respetivamente.

No futuro, seria interessante fazer a análise destas tintas (escolher uma de cada grupo já criado) por espectrometria de massa, de modo a identificar de forma inequívoca os “ingredientes” utilizados no fabrico destas tintas. Seria então importante começar por analisar o padrão de Cristal Violeta (*Crystal Violet*) com o intuito de saber quais os produtos de degradação presentes neste composto e, desta forma, explicar com mais certeza o porquê do aparecimento de mais do que um pico em algumas esferográficas e no próprio padrão, atribuindo a cada pico uma estrutura química. As tintas de esferográficas que não conseguimos discriminar totalmente, também seria importante analisar por espectrometria de massa, com o objetivo de determinar qual o outro composto presente ou se se trata de alguma mistura.

Chegámos ainda a outra interessante conclusão que se encontra parcialmente descrita na literatura. Parece ser consensual que é apenas uma empresa que fornece a formulação de uma tinta distribuindo-a por várias marcas. Assim sendo, cada marca apenas é responsável pelo fabrico da esfera e do invólucro da esferográfica. Só assim conseguimos explicar as semelhanças entre as composições químicas destas esferográficas com marcas e modelos tão variados. Seria interessante começar uma análise com esferográficas dos anos 1950, 1960 e anos seguintes. O obstáculo que poderá surgir é que para este estudo ser possível será necessário recorrer a colecionadores. Deixamos esta ideia para o futuro.

Como conclusão final, podemos afirmar que a técnica de HPLC-DAD acoplada a métodos quimiométricos fornece informação muito pertinente sobre os perfis químicos das tintas de esferográficas, sendo assim, possível criar uma base de dados forte que servirá de apoio na investigação forense da área de físico-química do LPC.

Bibliografia

- [1] J. A. Siegel, P. J. Saukko e G. C. Knupfer. «Encyclopedia of Forensic Sciences Volume three» (2000), pp. 50–100.
- [2] A. T. Bruni, J. A. Velho e M. F. Oliveira. «Fundamentos de Química Forense– uma análise prática da química que soluciona crimes». *Millennium editora* (2012), pp. 18–31.
- [3] K. O. Gorshkova, I. I. Tumkin, L. A. Myund, A. S. Tverjanovich, A. S. Mereshchenko, M. S. Panov e V. A. Kochemirovsky. «The investigation of dye aging dynamics in writing inks using Raman spectroscopy». *Dyes and Pigments* 131 (2016), pp. 239–245.
- [4] S. Bell. «Forensic Chemistry - Second Edition». *Pearson New International Edition* (2009), pp. 297–319.
- [5] R. W. Jones e J. F. McClelland. «Analysis of writing inks on paper using direct analysis in real time mass spectrometry». *Forensic science international* 231.1 (2013), pp. 73–81.
- [6] X.-F. Wang, J. Yu, M.-X. Xie, Y.-T. Yao e J. Han. «Identification and dating of the fountain pen ink entries on documents by ion-pairing high-performance liquid chromatography». *Forensic science international* 180.1 (2008), pp. 43–49.
- [7] Q. Sun, Y. Luo, Q. Zhang, X. Yang e C. Xu. «How Much Can a Forensic Laboratory Do to Discriminate Questioned Ink Entries?» *Journal of forensic sciences* 61.4 (2016), pp. 1116–1121.
- [8] M. Calcerrada e C. García-Ruiz. «Analysis of questioned documents: A review». *Analytica chimica acta* 853 (2015), pp. 143–166.
- [9] C. Weyermann, L. Bucher, P. Majcherczyk, W. Mazzella, C. Roux e P. Esseiva. «Statistical discrimination of black gel pen inks analysed by laser desorption/ionization mass spectrometry». *Forensic science international* 217.1 (2012), pp. 127–133.
- [10] Q. Sun, Y. Luo, X. Yang, P. Xiang e M. Shen. «Detection and identification of dyes in blue writing inks by LC-DAD-orbitrap MS». *Forensic science international* 261 (2016), pp. 71–81.
- [11] M. Gallidabino, C. Weyermann e R. Marquis. «Differentiation of blue ballpoint pen inks by positive and negative mode LDI-MS». *Forensic science international* 204.1 (2011), pp. 169–178.
- [12] M. Ezcurra, J. M. Góngora, I. Maguregui e R. Alonso. «Analytical methods for dating modern writing instrument inks on paper». *Forensic Science International* 197.1 (2010), pp. 1–20.
- [13] M. Park, S.-H. Bahng, N. Woo e S. H. Kang. «Highly sensitive wavelength-dependent nonaqueous capillary electrophoresis for simultaneous screening of various synthetic organic dyes». *Talanta* 152 (2016), pp. 236–243.
- [14] Y.-Z. Liu, J. Yu, M.-X. Xie, Y. Liu, J. Han e T.-T. Jing. «Classification and dating of black gel pen ink by ion-pairing high-performance liquid chromatography». *Journal of Chromatography A* 1135.1 (2006), pp. 57–64.
- [15] Y.-Z. Liu, J. Yu, M.-X. Xie, Y. Chen, G.-Y. Jiang e Y. Gao. «Studies on the degradation of blue gel pen dyes by ion-pairing high performance liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry». *Journal of chromatography A* 1125.1 (2006), pp. 95–103.
- [16] M. Gondra e G. Gravalos. *Análise Forense De Documentos, Vol.1 - Instrumentos de Escrita Manual e Suas Tintas*. Millenium Editora. isbn: 9788576252535.
- [17] J. A. Siegel, P. J. Saukko e G. C. Knupfer. «Encyclopedia of Forensic Sciences Volume one» (2000), pp. 120–150.

- [18] J. A. Siegel, P. J. Saukko e G. C. Knupfer. «Encyclopedia of Forensic Sciences Volume two» (2000), pp. 60–80.
- [19] H.-S. Chen. «Analyses of four ball point pen inks and two dyes by thin-layer chromatography with fluorescence detection and matrix assisted laser desorption timeofflight and electrospray ionization mass spectrometry». *Forensic Science Journal* 4 (2005), pp. 15–27.
- [20] A. Kher, M. Mulholland, E. Green e B. Reedy. «Forensic classification of ballpoint pen inks using high performance liquid chromatography and infrared spectroscopy with principal components analysis and linear discriminant analysis». *Vibrational spectroscopy* 40.2 (2006), pp. 270–277.
- [21] D. Confortin, H. Neevel, M. Brustolon, L. Franco, A. J. Kettelarij, R. M. Williams e M. R. van Bommel. «Crystal violet: study of the photo-fading of an early synthetic dye in aqueous solution and on paper with HPLC-PDA, LC-MS and FORS». *Journal of Physics: Conference Series*. Vol. 231. 1. IOP Publishing. 2010, p. 012011.
- [22] G. M. LaPorte, J. D. Wilson, A. A. Cantu, S. A. Mancke e S. L. Fortunato. «The identification of 2-phenoxyethanol in ballpoint inks using gas chromatography/mass spectrometry—relevance to ink dating». *Journal of Forensic Science* 49.1 (2003), pp. 1–5.
- [23] A. Koenig, S. Magnolon e C. Weyermann. «A comparative study of ballpoint ink ageing parameters using GC/MS». *Forensic science international* 252 (2015), pp. 93– 106.
- [24] I. San Román, L. Bartolomé, M. L. Alonso, R. M. Alonso e M. Ezcurra. «DATINK pilot study: an effective methodology for ballpoint pen ink dating in questioned documents». *Analytica chimica acta* 892 (2015), pp. 105–114.
- [25] F.I.R, Inácio. «Análise e caracterização de tintas de instrumentos de escrita por microespectrofotometria: construção de uma base de dados». Tese de mestrado. 2015.
- [26] R. B. Chust. «Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC)». *Boletim SPQ* 39 (1990), pp. 43–53.
- [27] R. LLC. *Triarylmethane dye*. url: https://www.revolvy.com/topic/Triarylmethane%5C%20dye&item_type=topic (acedido em 17/05/2017).
- [28] G. Gan, C. Ma e J. Wu. *Data clustering: theory, algorithms, and applications*. SIAM, 2007, pp. 3–17, 19–24, 67–71, 74–96.
- [29] T. F. G. G. Cova. «Aplicações em quimiometria. Do diagnóstico médico à cientometria». Tese de mestrado. 2011.
- [30] S. D. Brown, S. T. Sum, F. Despagne e B. K. Lavine. «Chemometrics». *Analytical Chemistry* 68.12 (1996), pp. 21–62.
- [31] R. A. Cazar. «An exercise on chemometrics for a quantitative analysis course». *J. Chem. Educ* 80.9 (2003), p. 1026.
- [32] R. G. Brereton. *Chemometrics: applications of mathematics and statistics to laboratory systems*. Ellis Horwood series in chemical computation, statistics, and information. E. Horwood, 1990. isbn: 9780131313507.
- [33] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte e L. Kaufman. «Chemometrics: a textbook» (1988).
- [34] I. T. Jolliffe. «Principal component analysis and factor analysis». *Principal component analysis* (2002), pp. 150–166.
- [35] L. Campanella, G. De Angelis e G. Visco. «Chemometric investigation of the efficiency of different TiO₂-based catalysts as principal components of TOC photochemical sensors under development». *Analytical and bioanalytical chemistry* 376.4 (2003), pp. 467–475.

- [36] S. Kokot, M. Grigg, H. Panayiotou e T. D. Phuong. «Data interpretation by some common chemometrics methods». *Electroanalysis* 10.16 (1998), pp. 1081–1088.
- [37] J. E. Jackson. *A user's guide to principal components*. Vol. 587. Wiley, 2005.
- [38] G. M. Downs e J. M. Barnard. «Clustering methods and their uses in computational chemistry». *Reviews in computational chemistry* 18 (2002), pp. 1–40.
- [39] M. Daszykowski, B. Walczak e D. Massart. «Density-based clustering for exploration of analytical data». *Analytical and bioanalytical chemistry* 380.3 (2004), pp. 370– 372.
- [40] J. A. S. Almeida, L. M. S. Barbosa, A. A. C. C. Pais e S. J. Formosinho. «Improving hierarchical cluster analysis: A new method with outlier detection and automatic clustering». *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 87.2 (2007), pp. 208– 217.

Capítulo 5 - Anexos

Anexo A - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das esferográficas azuis (método LPC)

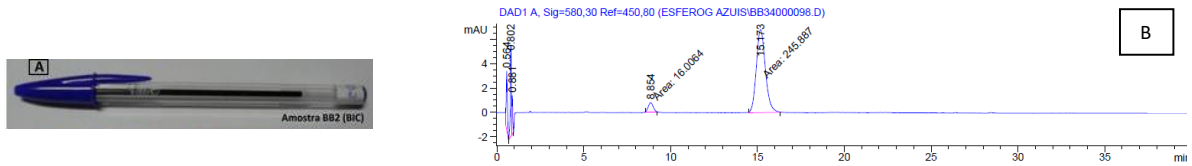


Fig. A1 – Esferográfica BB2 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB2.

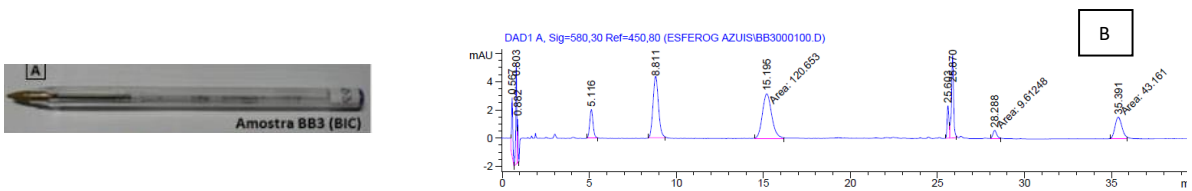


Fig. A2 – Esferográfica BB3 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB3.

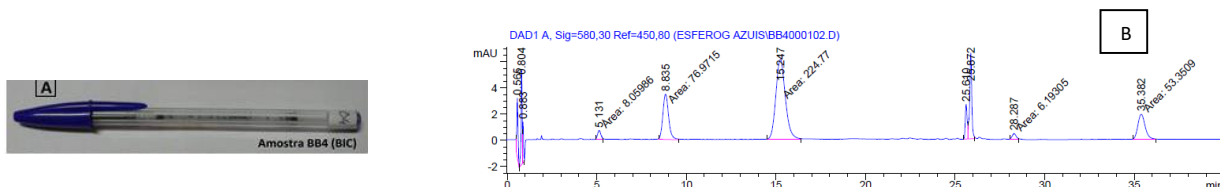


Fig. A3 – Esferográfica BB4 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB4.

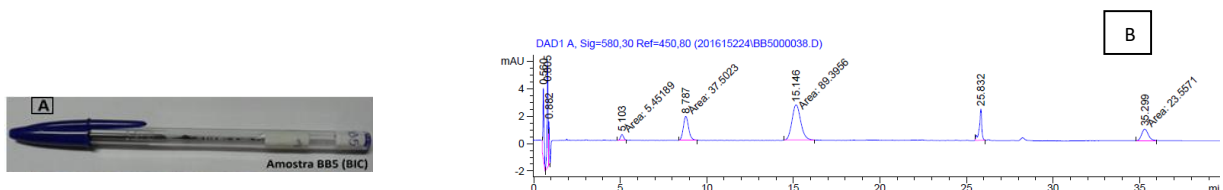


Fig. A4 – Esferográfica BB5 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB5.

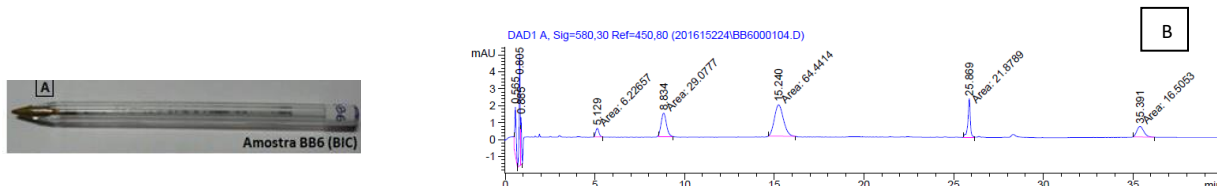


Fig. A5 – Esferográfica BB6 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB6.

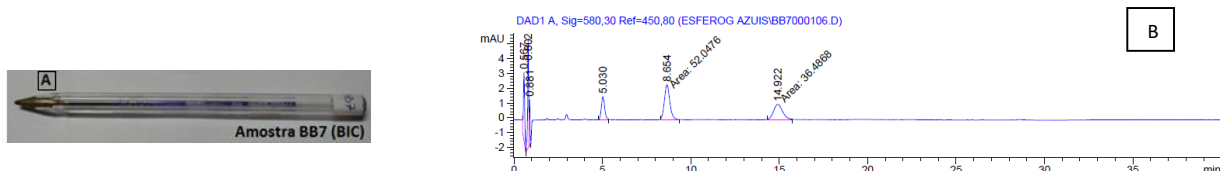


Fig. A6 – Esferográfica BB7 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB7.

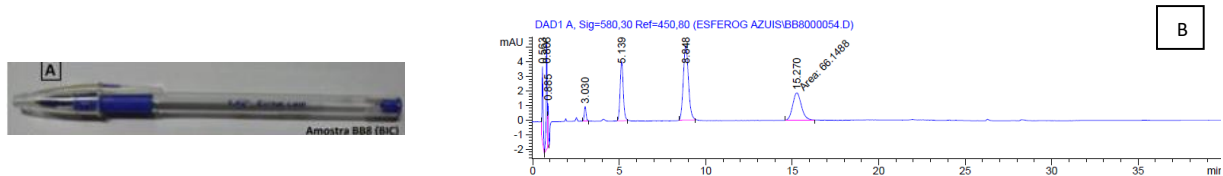


Fig. A7 – Esferográfica BB8 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB8.

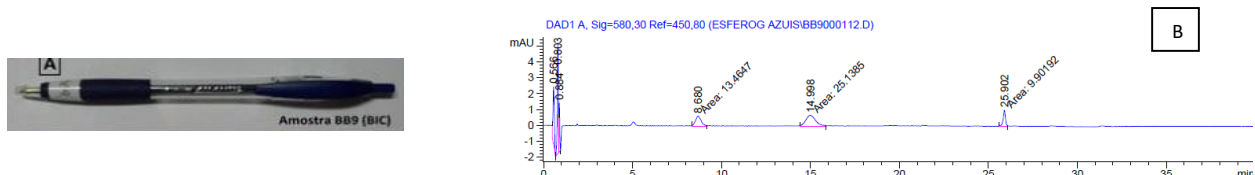


Fig. A8 – Esferográfica BB9 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB9.

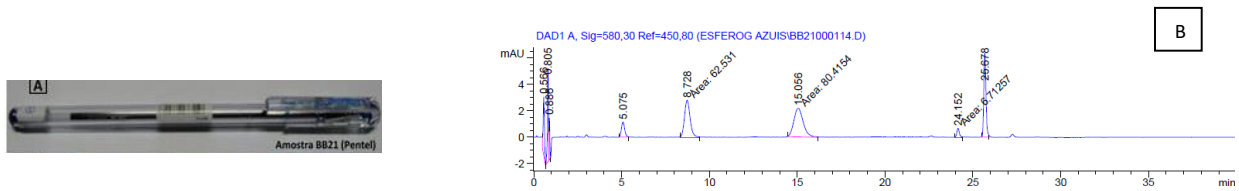


Fig. A9 – Esferográfica BB21 (Pentel) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB21.

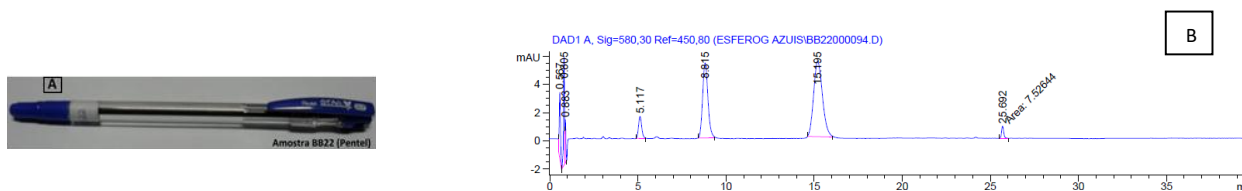


Fig. A10 – Esferográfica BB22 (Pentel) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB22.

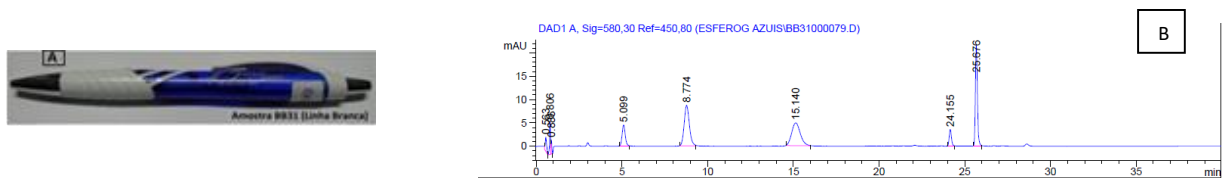


Fig. A11 – Esferográfica BB31 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB31.

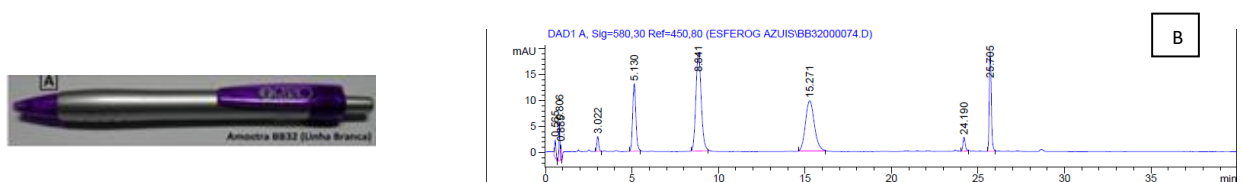


Fig. A12 – Esferográfica BB32 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB32.

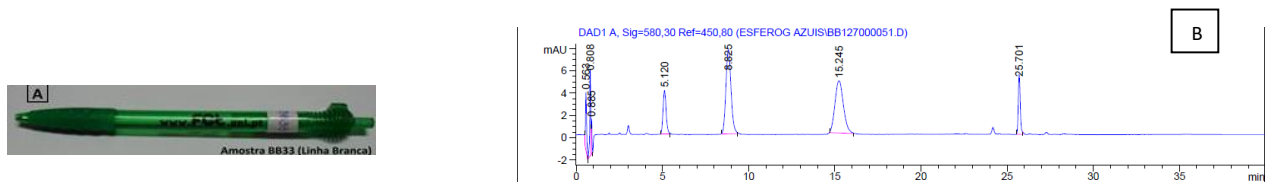


Fig. A13 – Esferográfica BB33 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB33.

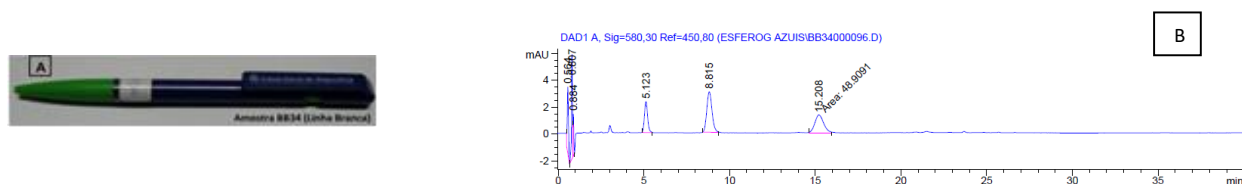


Fig. A14 – Esferográfica BB34 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB34.

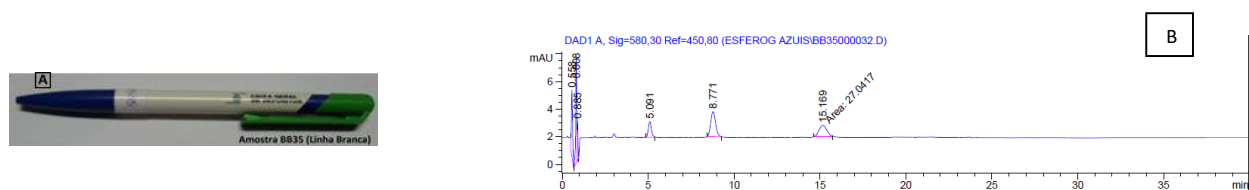


Fig. A15 – Esferográfica BB35 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB35.

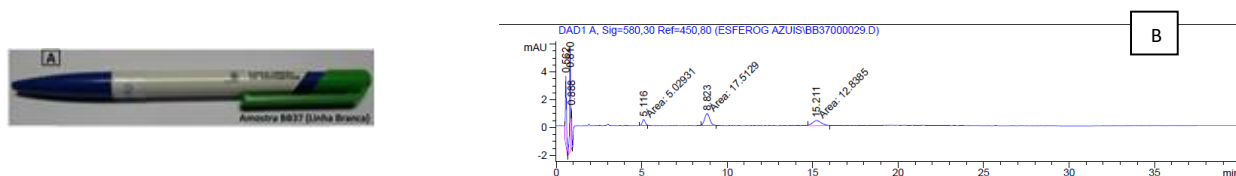


Fig. A16 – Esferográfica BB37 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB37.

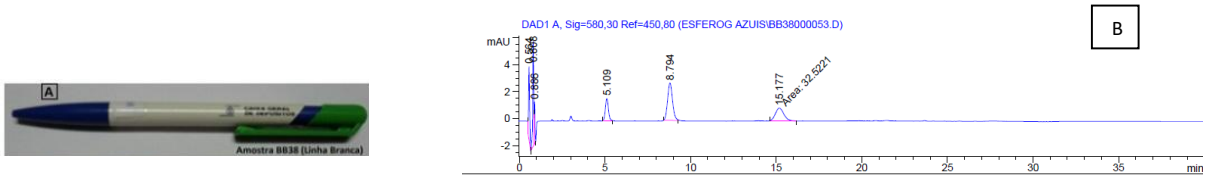


Fig. A17 – Esferográfica BB38 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB38.

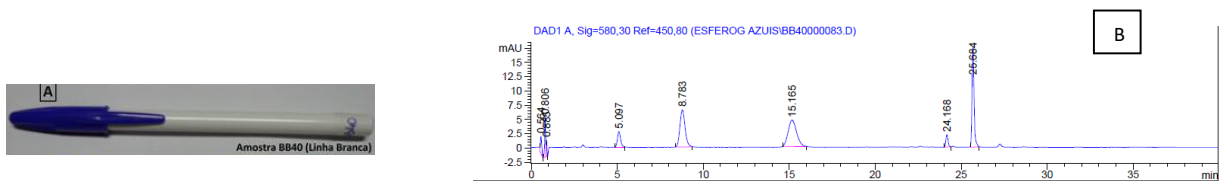


Fig. A18 – Esferográfica BB40 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB40.

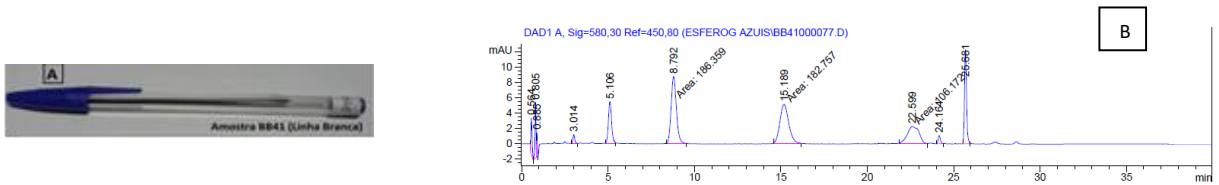


Fig. A19 – Esferográfica BB41 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB41.

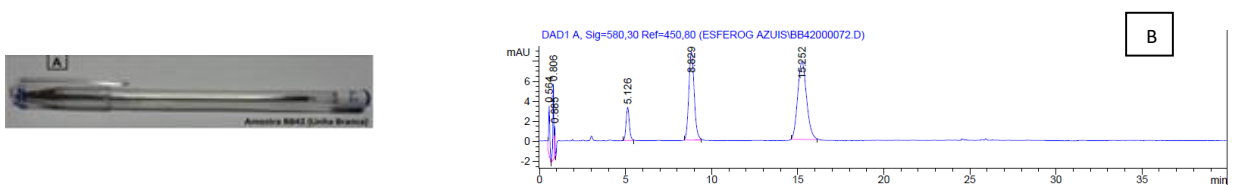


Fig. A20 – Esferográfica BB42 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB42.

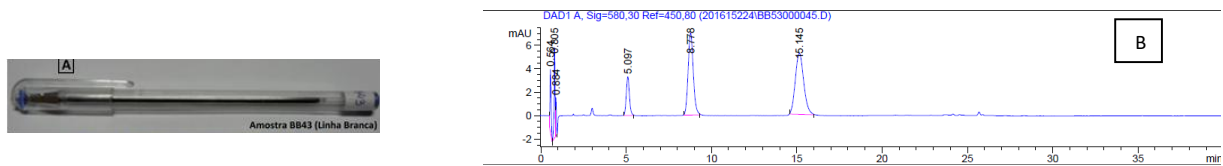


Fig. A21 – Esferográfica BB43 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB43.

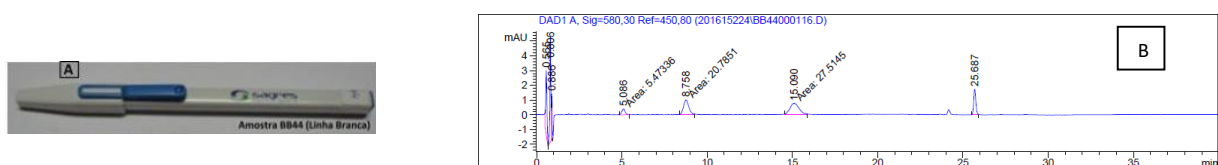


Fig. A22 – Esferográfica BB44 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB44.

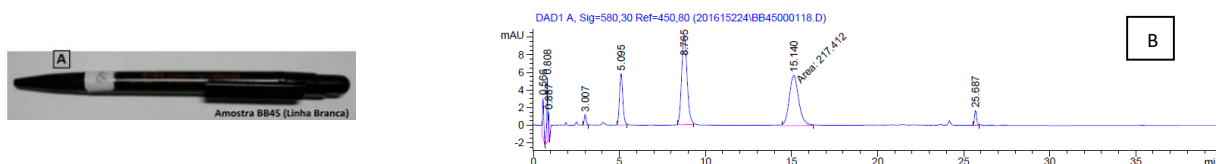


Fig. A23 – Esferográfica BB45 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB45.

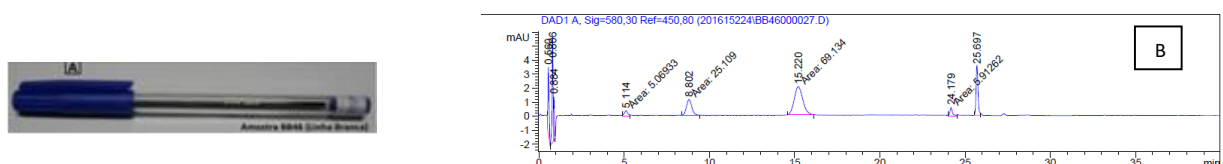


Fig. A24 – Esferográfica BB46 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB46.

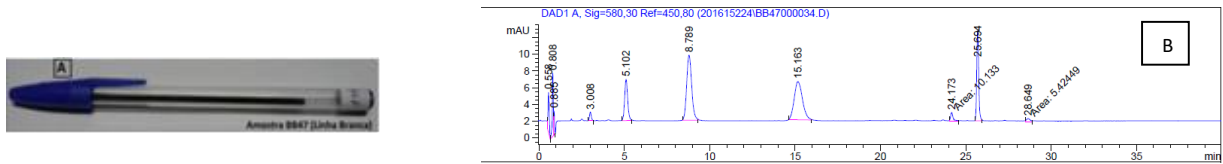


Fig. A25 – Esferográfica BB47 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB47.

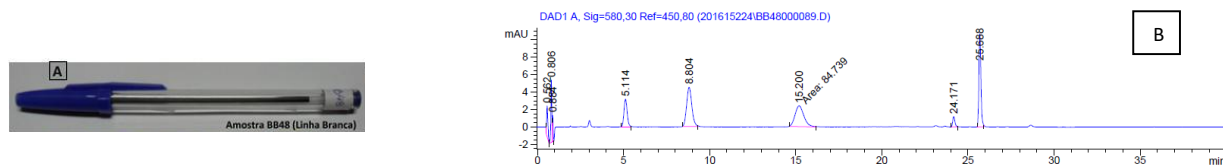


Fig. A26 – Esferográfica BB48 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB48.

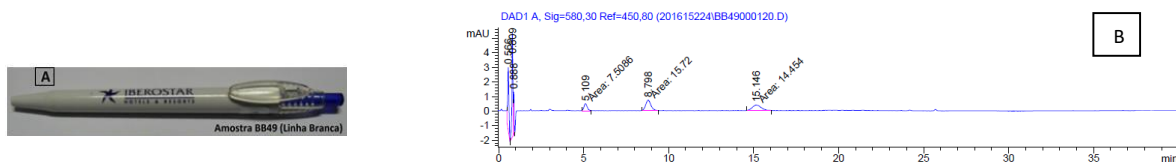


Fig. A27 – Esferográfica BB49 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB49.

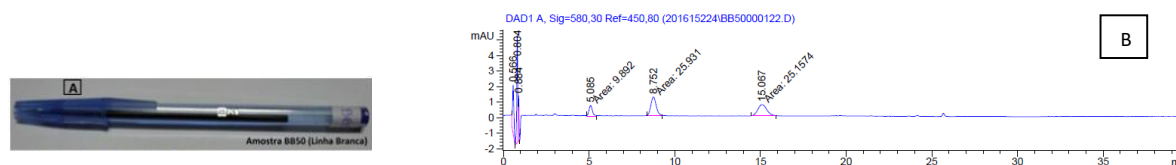


Fig. A28 – Esferográfica BB50 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB50.

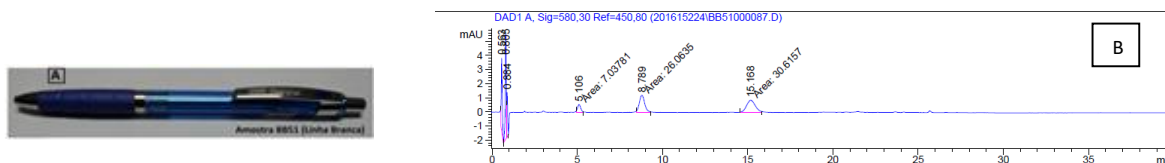


Fig. A29 – Esferográfica BB51 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB51.

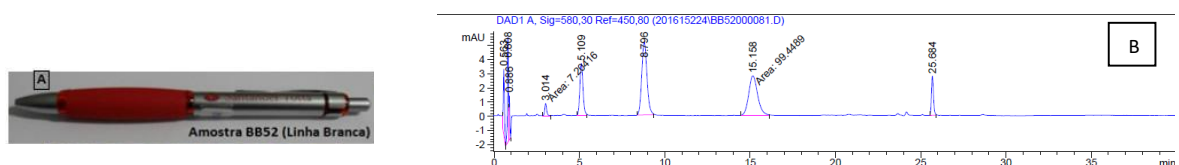


Fig. A30 – Esferográfica BB52 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB52.

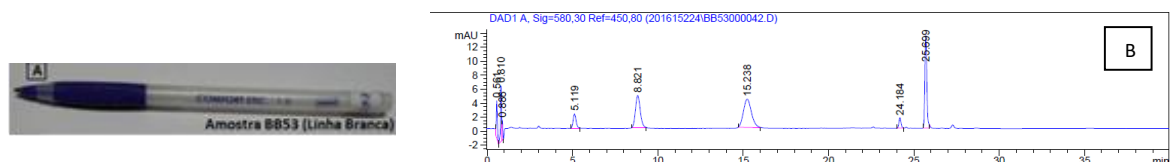


Fig. A31 – Esferográfica BB53 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB53.

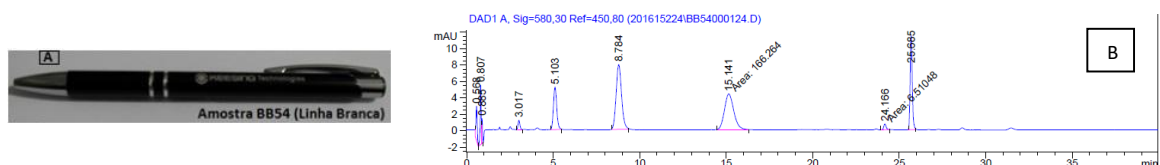


Fig. A32 – Esferográfica BB54 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB54.

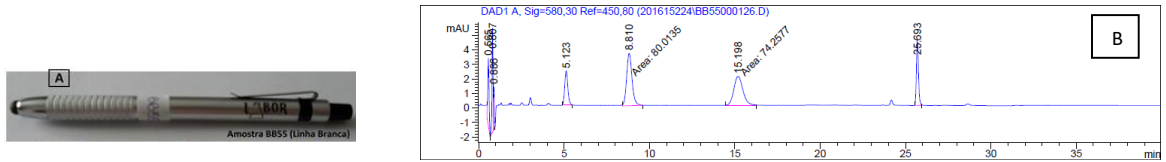


Fig. A33 – Esferográfica BB55 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB55.

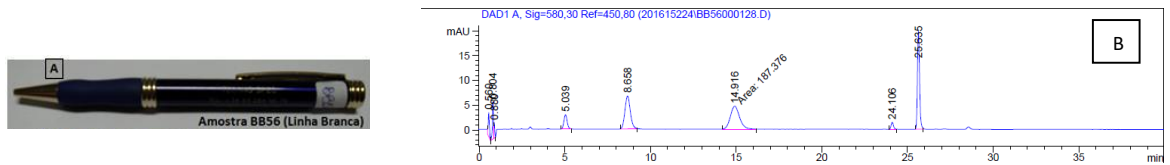


Fig. A34 – Esferográfica BB56 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB56.

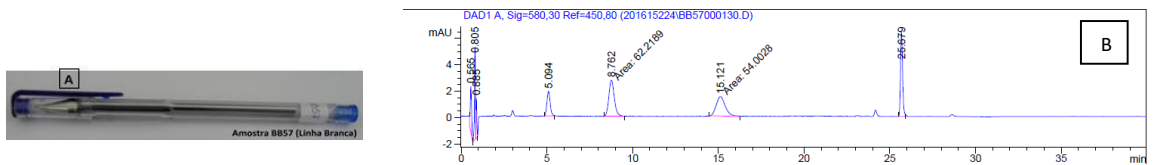


Fig. A35 – Esferográfica BB57 (Linha Branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB57.

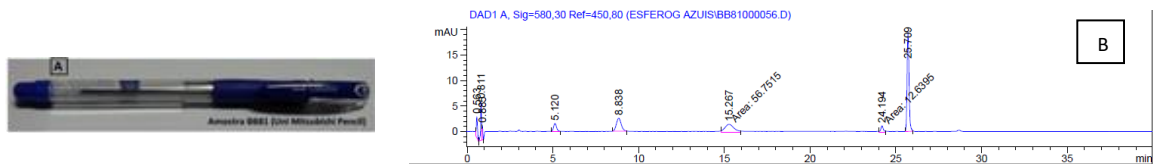


Fig. A36 – Esferográfica BB81 (Uni Mitsubishi Pencil) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB81.

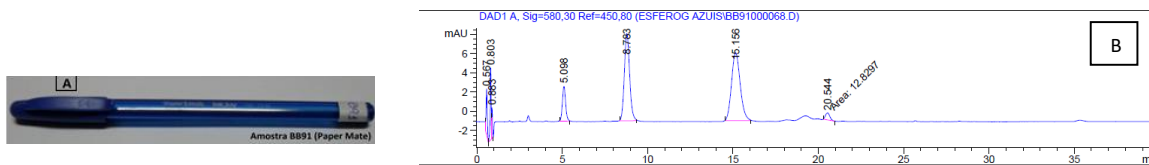


Fig. A37 – Esferográfica BB91 (Paper Mate) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB91.

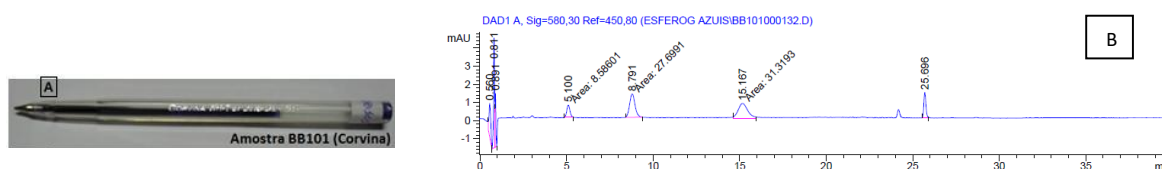


Fig. A38 – Esferográfica BB101 (Corvina) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB101.

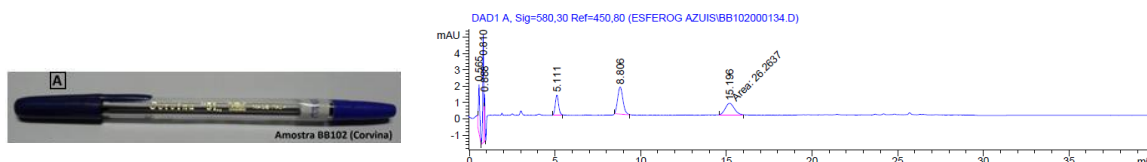


Fig. A39 – Esferográfica BB102 (Corvina) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB102.

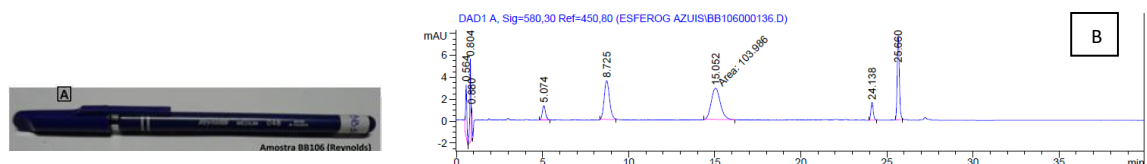


Fig. A40 – Esferográfica BB106 (Reynolds) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB106.

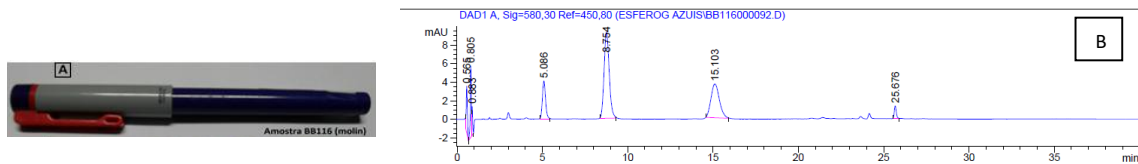


Fig. A41 – Esferográfica BB116 (Molin) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB116.

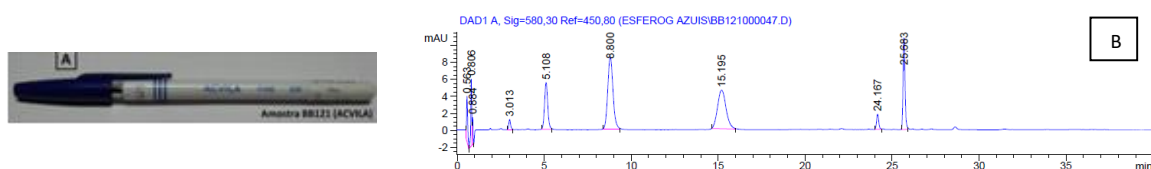


Fig. A42 – Esferográfica BB121 (ACVILA) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB121.

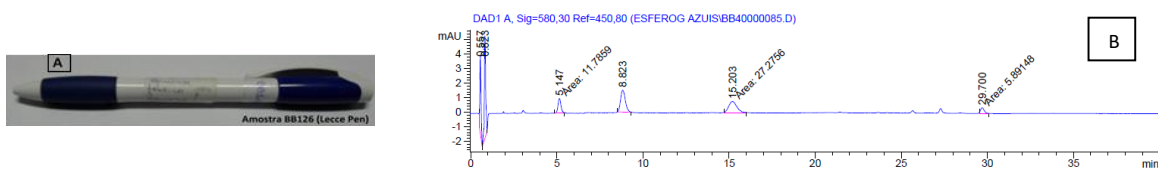


Fig. A43 – Esferográfica BB126 (Lecce Pen) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB126.

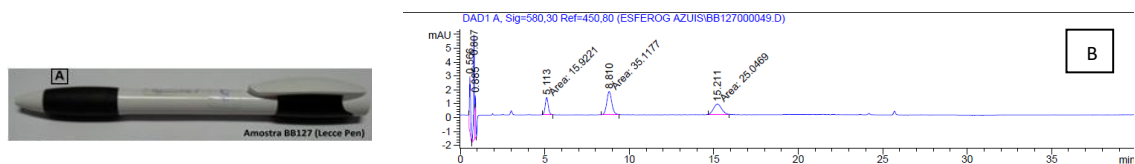


Fig. A44 – Esferográfica BB127 (Lecce Pen) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB127.

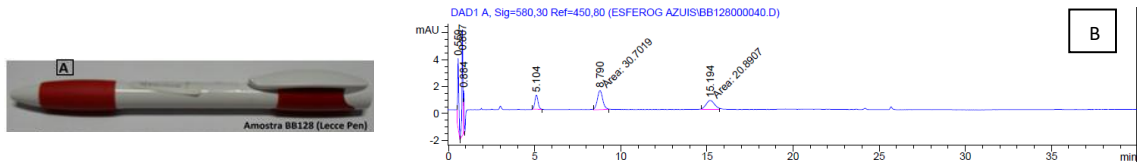


Fig. A45 – Esferográfica BB128 (Lecce Pen) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB128.

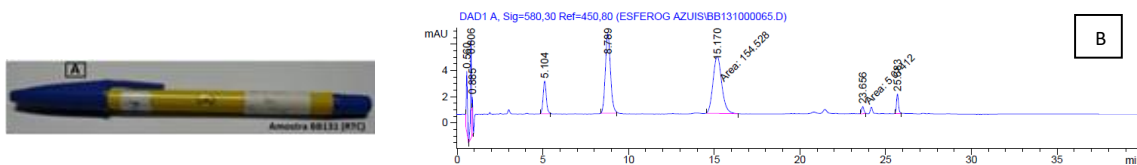


Fig. A46 – Esferográfica BB131 (RTC) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB131.

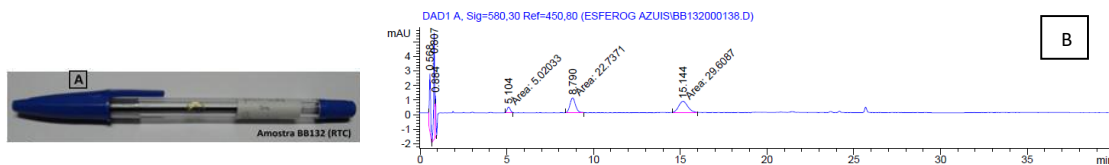


Fig. A47 – Esferográfica BB132 (RTC) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB132.

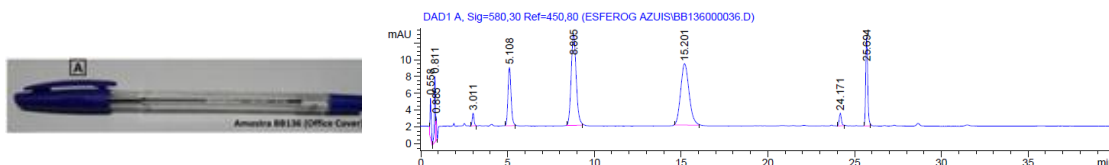


Fig. A48 – Esferográfica BB136 (Office Cover) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB136.

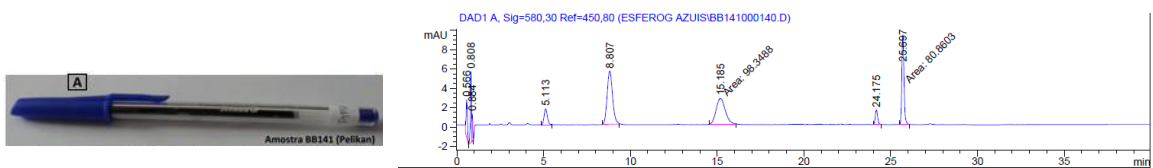


Fig. A49 – Esferográfica BB141 (Pelikan) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB141.

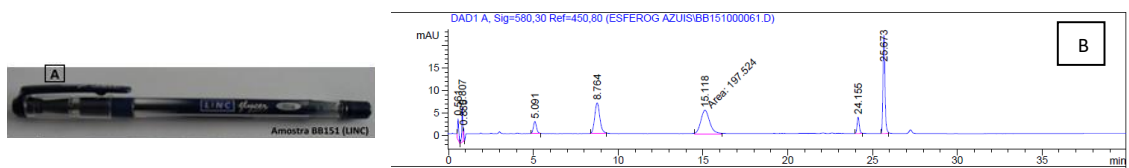


Fig. A50 – Esferográfica BB151 (LINC) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB151.

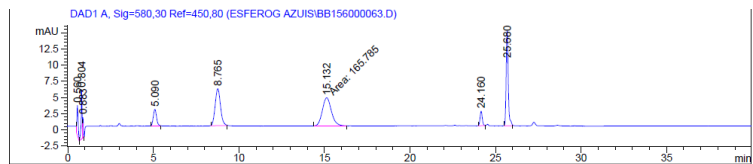


Fig. A51 – Esferográfica BB156 (Stabilo) - cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB156.

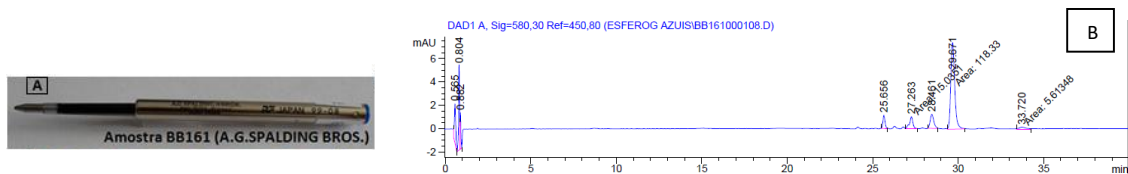


Fig. A52 – Esferográfica BB161 (A. G. Spalding Bros.) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB161.

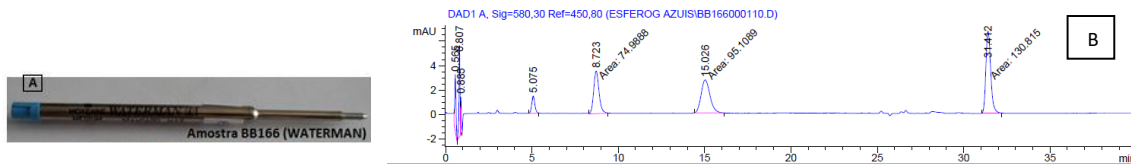


Fig. A53 – Esferográfica BB166 (Waterman) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB166.

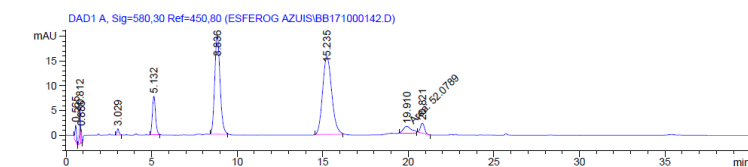


Fig. A54 – Esferográfica BB171 (Waterman) – cromatograma obtido por HPLC-DAD da tinta da esferográfica BB171.

Anexo B - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das esferográficas azuis (método DQ-Coimbra)

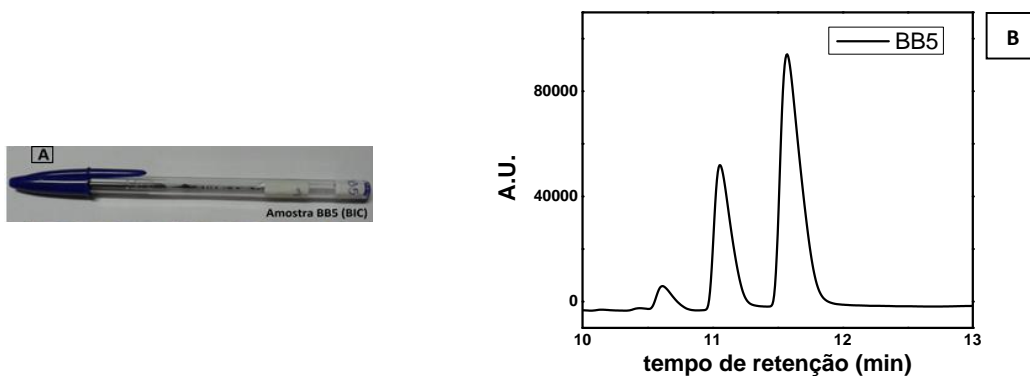


Fig.B1 – Esferográfica BB5 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB5.

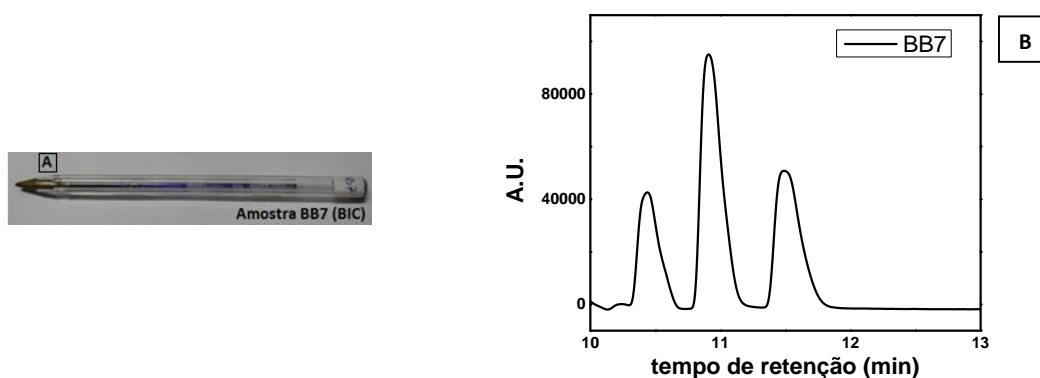


Fig.B2 – Esferográfica BB7 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB7.

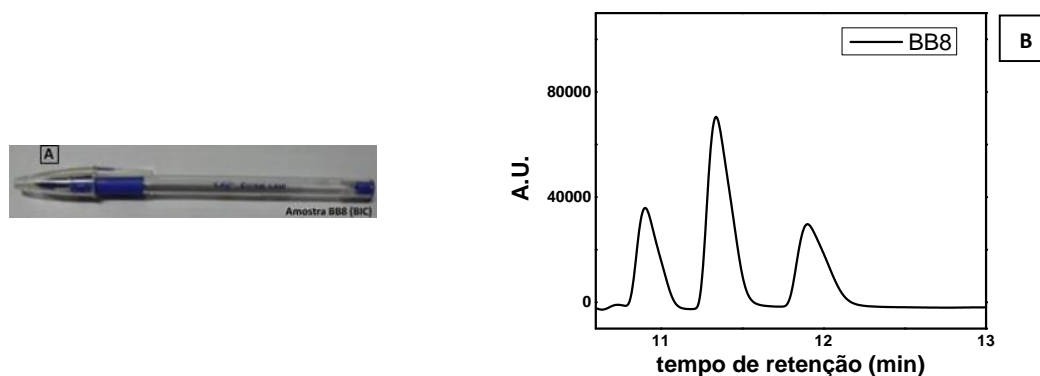


Fig.B3 – Esferográfica BB8 (Bic) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB8.

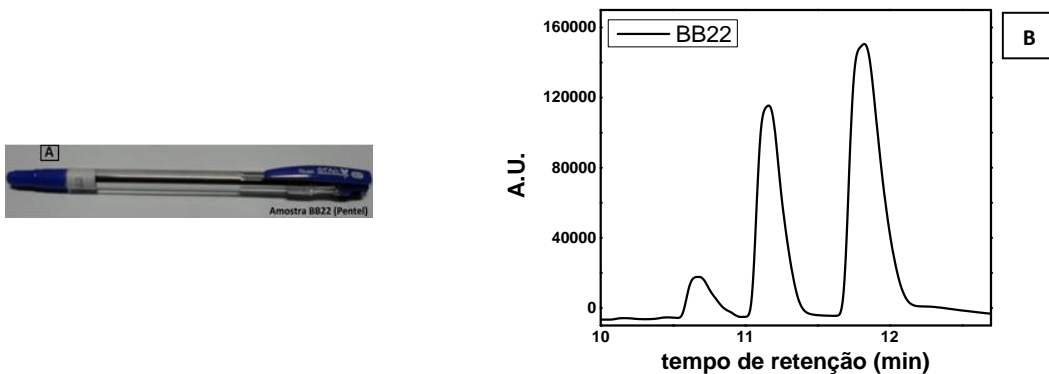


Fig.B4 – Esferográfica BB22 (Pentel) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB22.

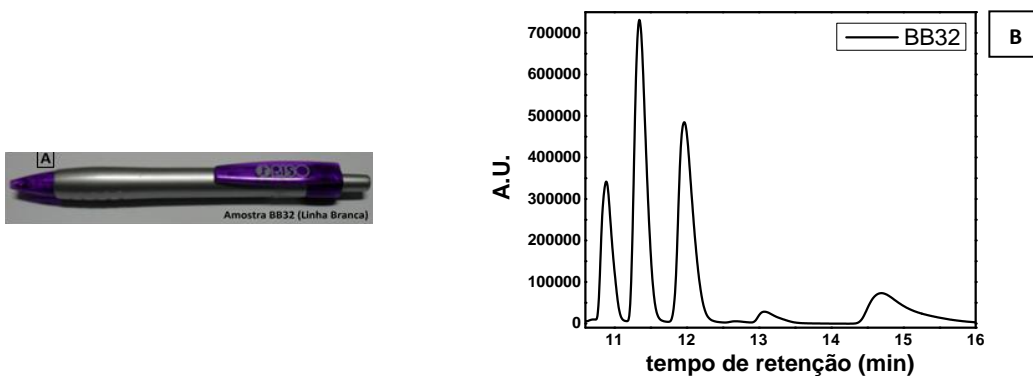


Fig.B5 – Esferográfica BB32 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB32.

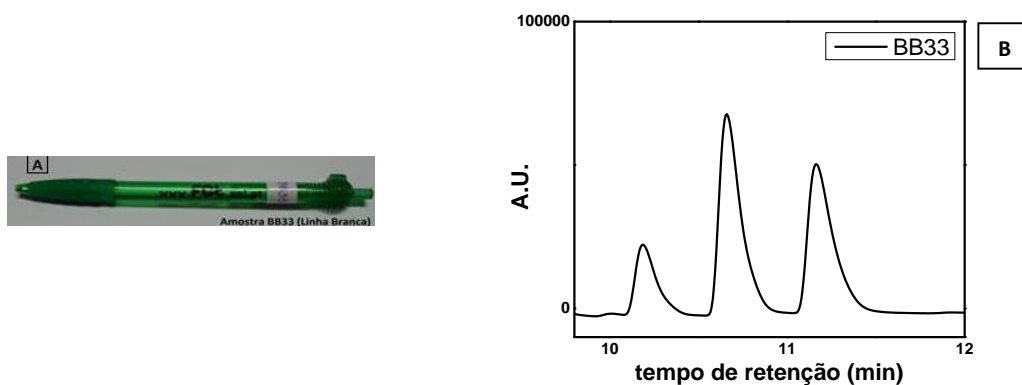


Fig.B6 – Esferográfica BB33 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB33.

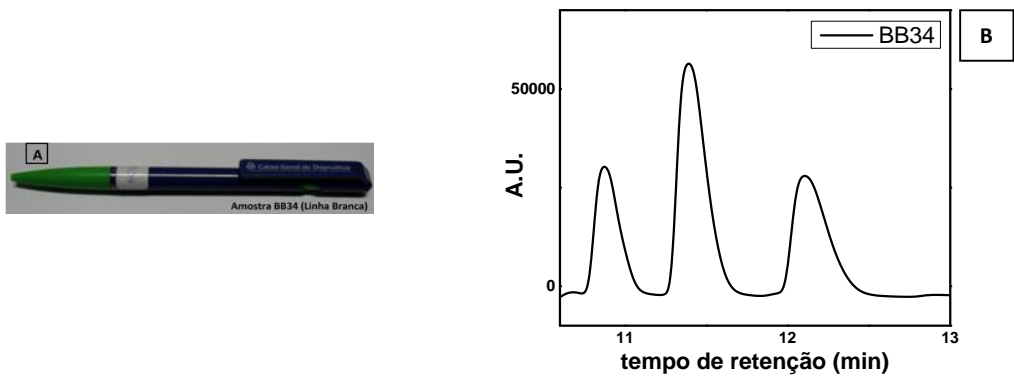


Fig.B7 – Esferográfica BB34 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB34.

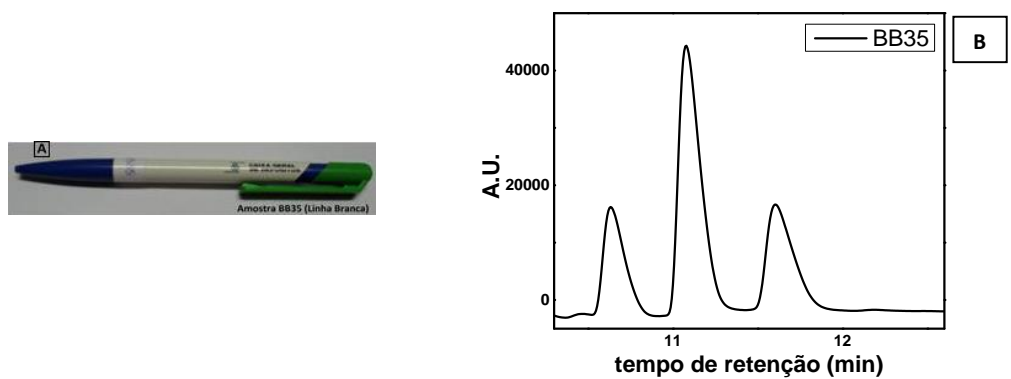


Fig.B8 – Esferográfica BB35 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB35.

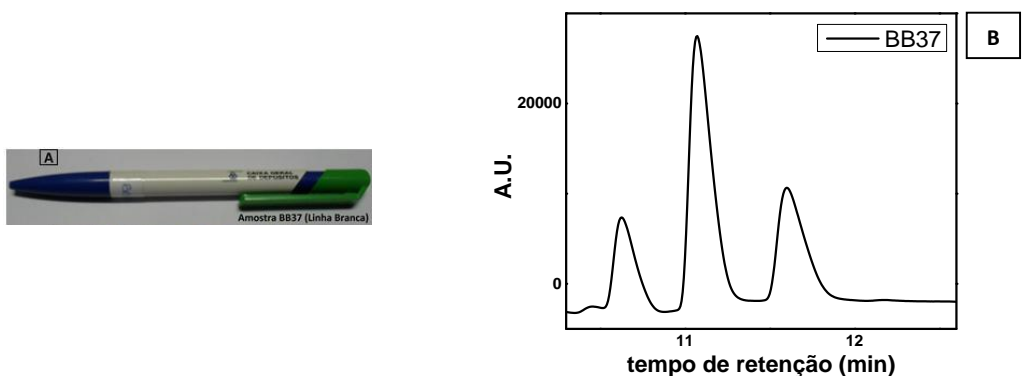


Fig.B9 – Esferográfica BB37 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB37.

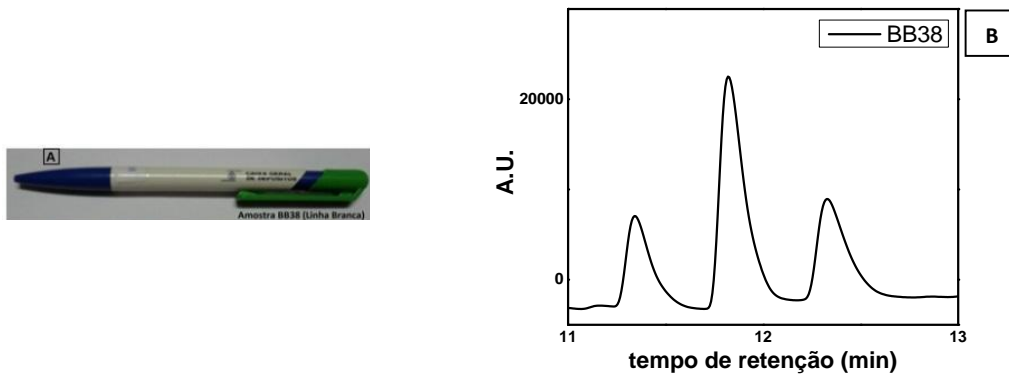


Fig.B10 – Esferográfica BB38 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB38.

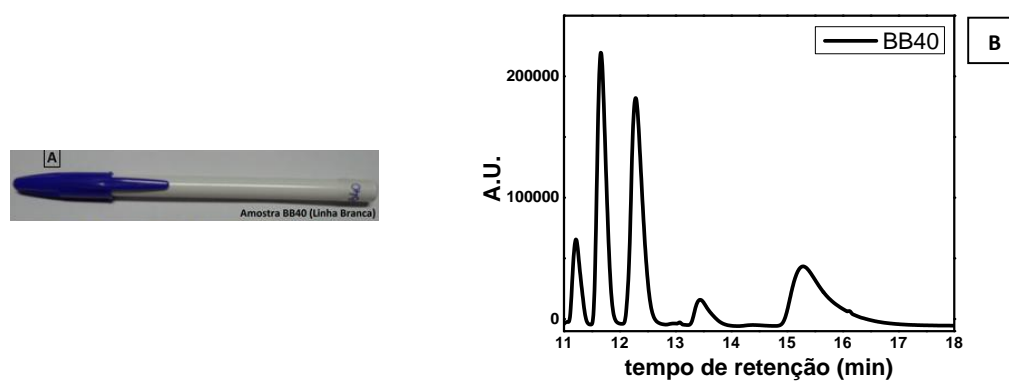


Fig.B11 – Esferográfica BB40 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB40.

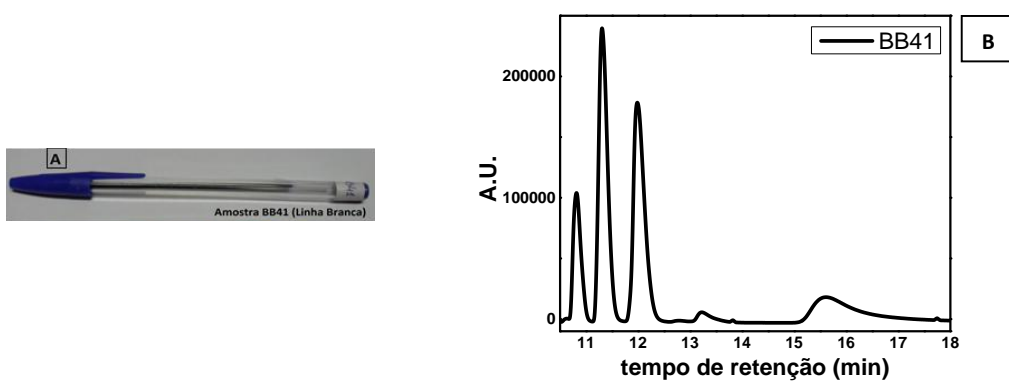


Fig.B12 – Esferográfica BB41 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB41.

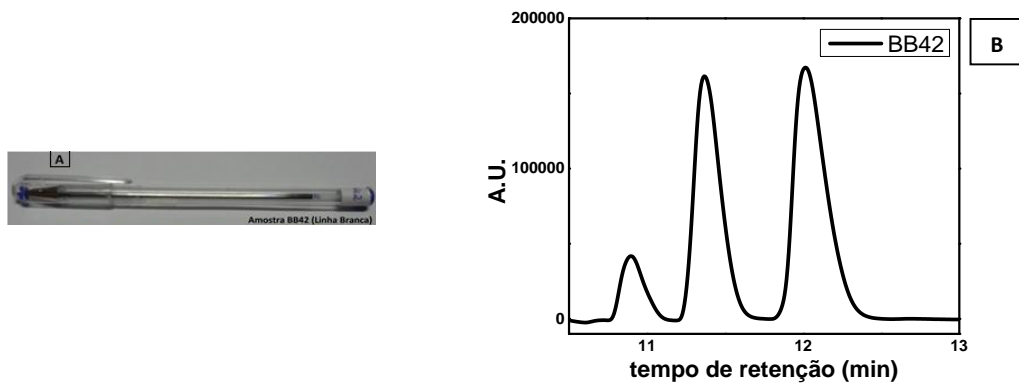


Fig.B13 – Esferográfica BB42 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB42.

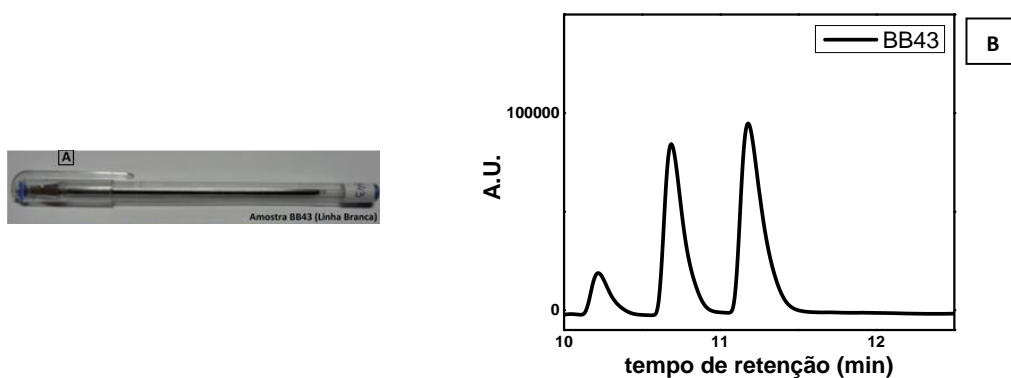


Fig.B14 – Esferográfica BB43 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB43.

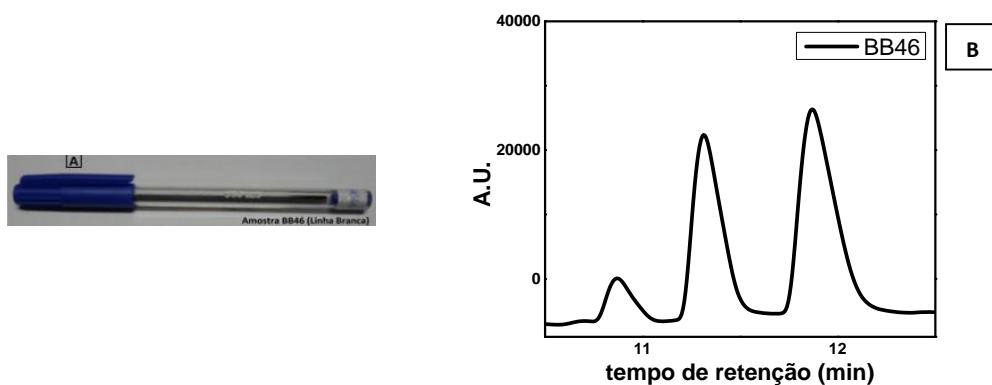


Fig.B15 – Esferográfica BB46 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB46.

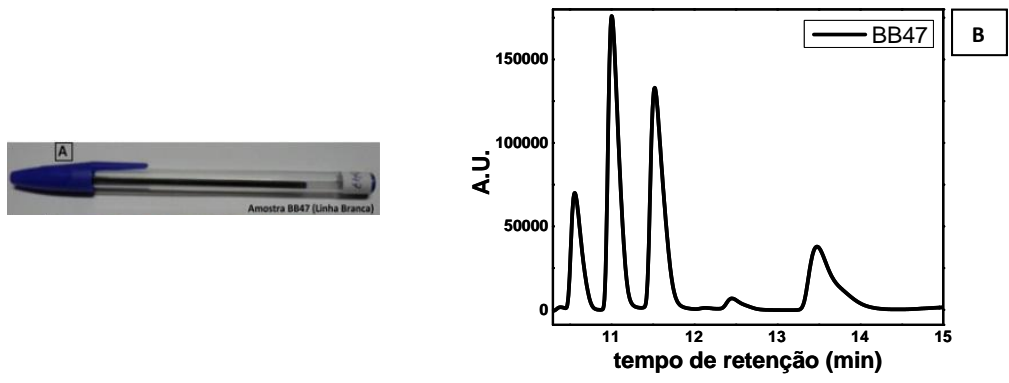


Fig.B16 – Esferográfica BB47 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB47.

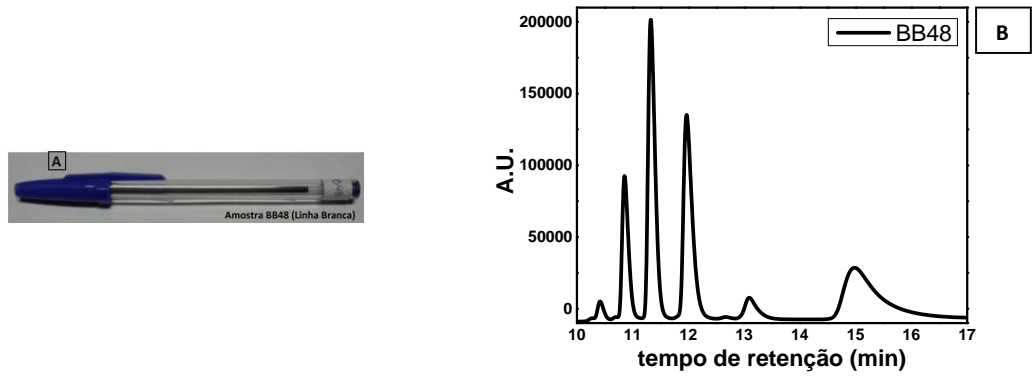


Fig.B17 – Esferográfica BB48 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB48.

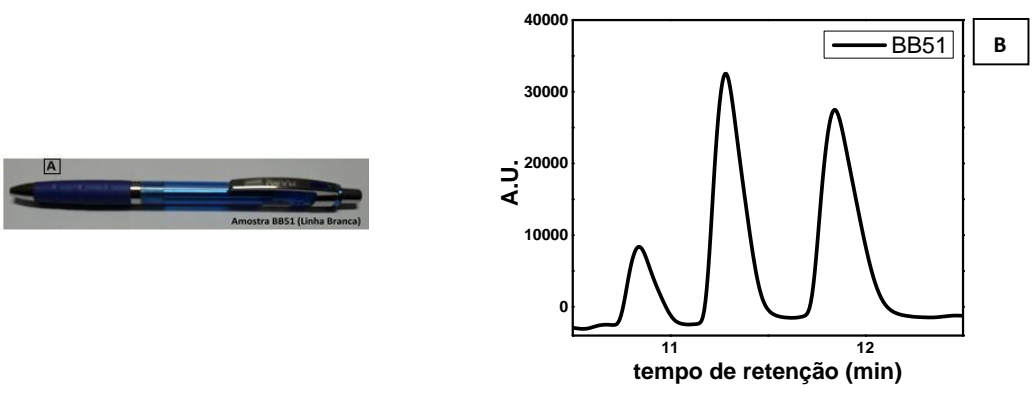


Fig.B18 – Esferográfica BB51 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB51.

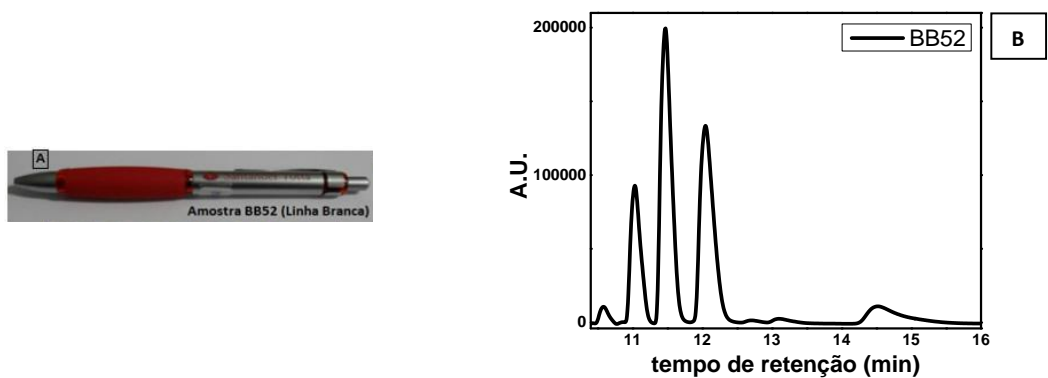


Fig.B19 – Esferográfica BB52 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB52.

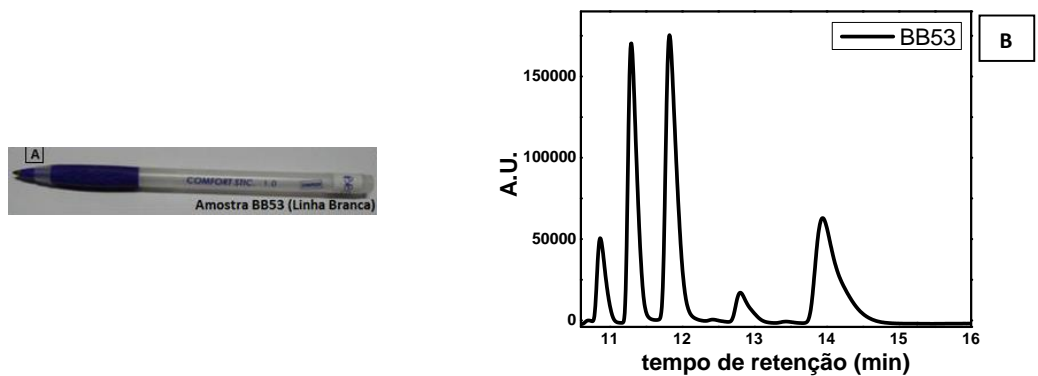


Fig.B20 – Esferográfica BB53 (linha branca) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB53.

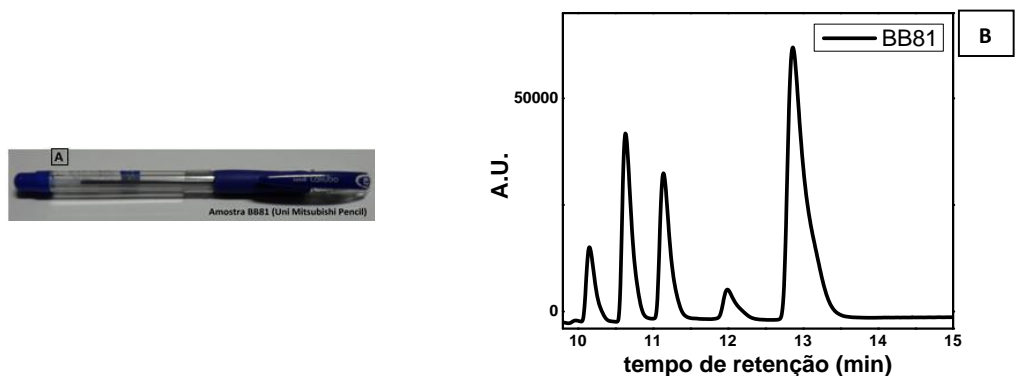


Fig.B21 – Esferográfica BB81 (Uni Mitsubishi Pencil) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB81.

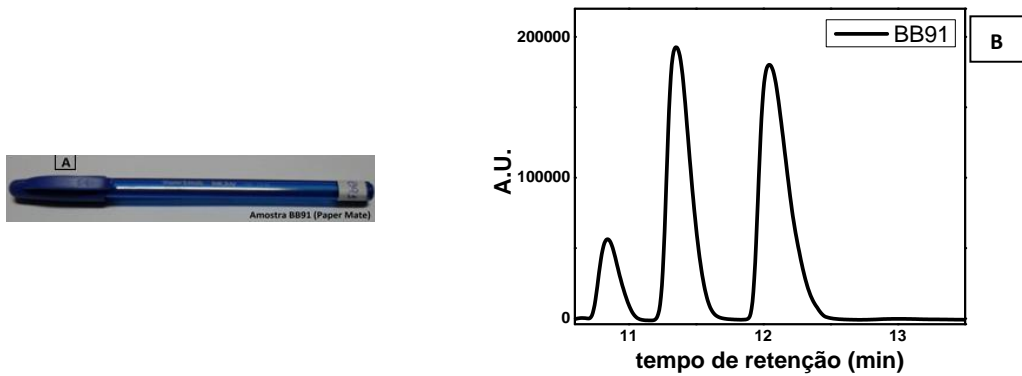


Fig.B22 – Esferográfica BB91 (Paper Mate) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB91.

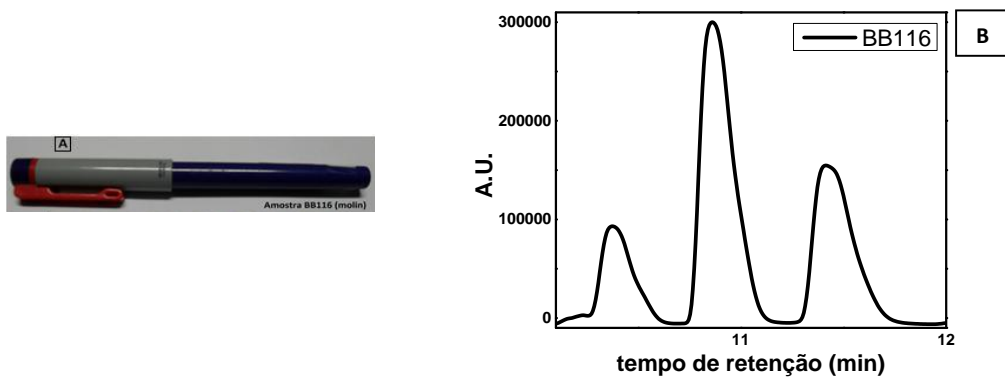


Fig.B23 – Esferográfica BB116 (Molin) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB116.

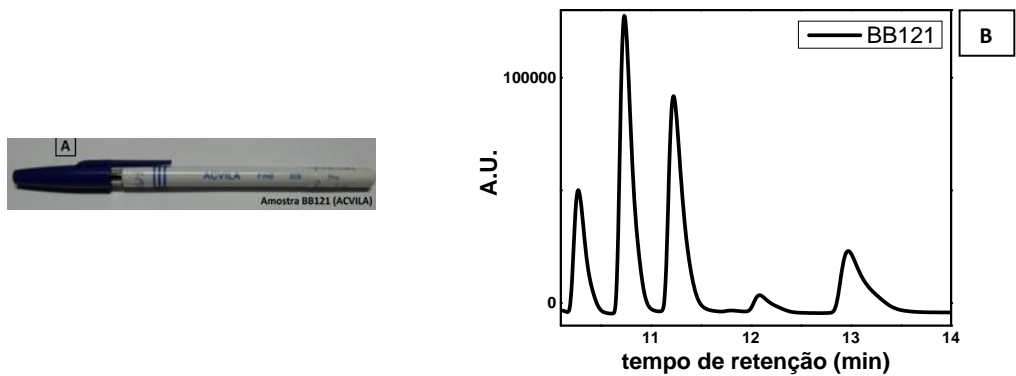


Fig.B24 – Esferográfica BB121 (ACVILA) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB121.

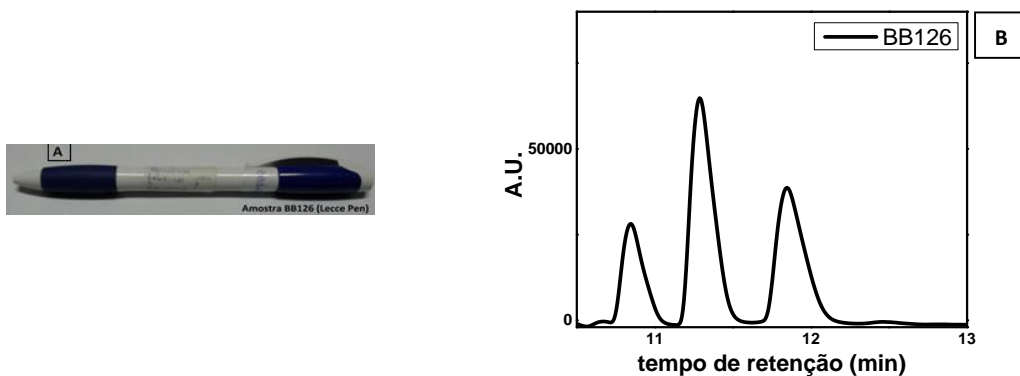


Fig.B25 – Esferográfica BB126 (Lecce Pen) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB126.

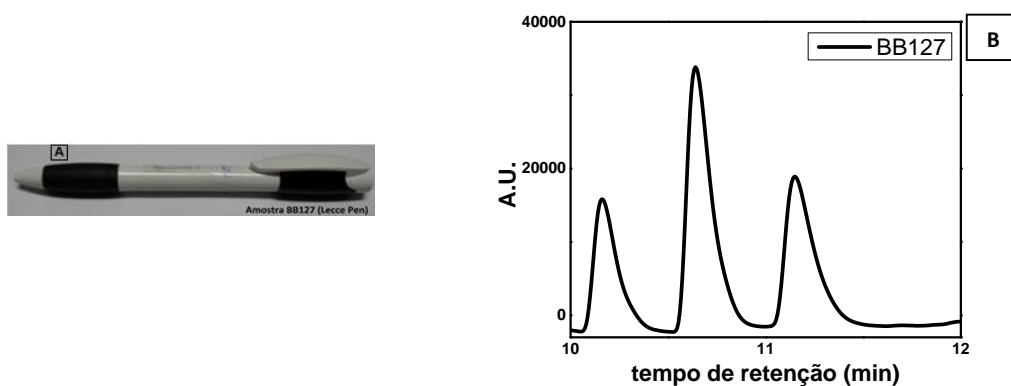


Fig.B26 – Esferográfica BB127 (Lecce Pen) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB127.

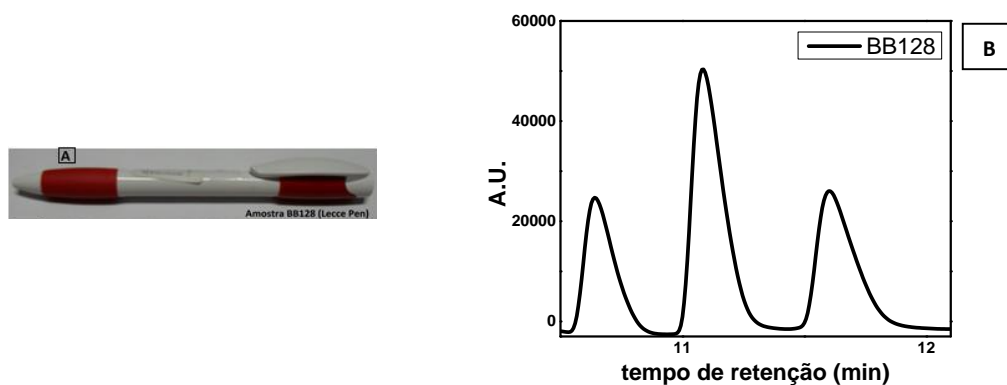


Fig.B27 – Esferográfica BB128 (Lecce Pen) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB128.

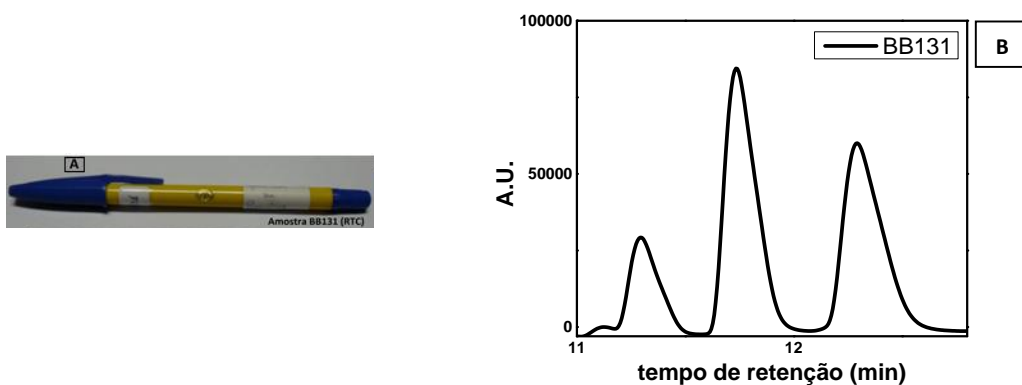


Fig.B28 – Esferográfica BB131 (RTC) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB131.

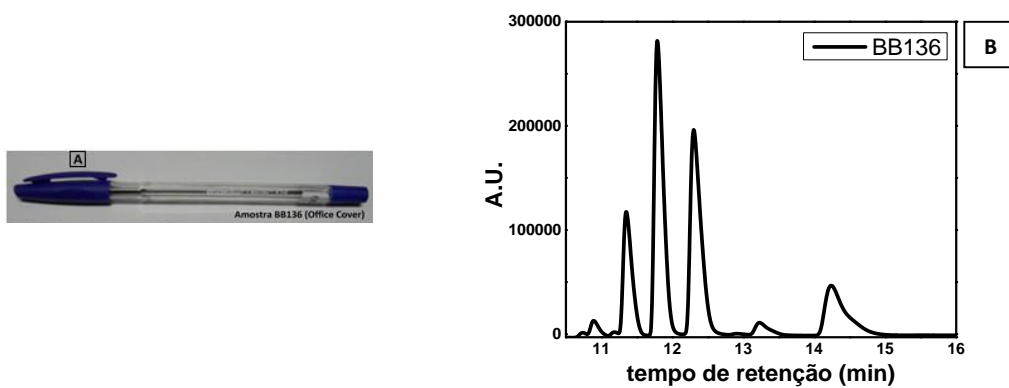


Fig.B29 – Esferográfica BB136 (Office Cover) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB136.

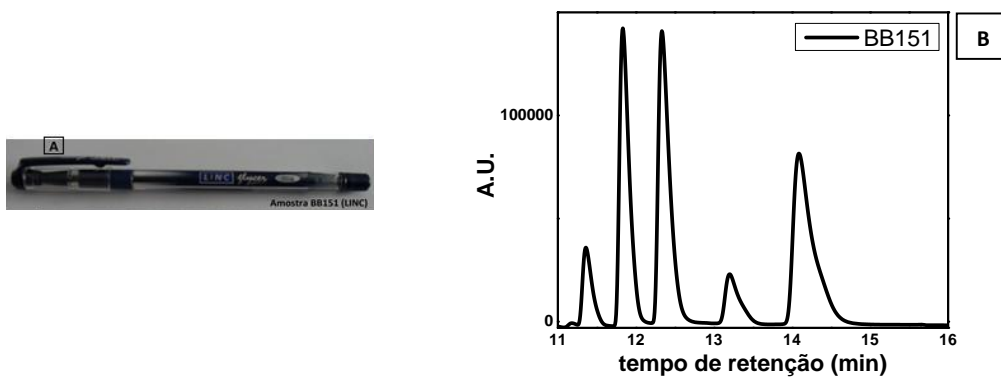


Fig.B30 – Esferográfica BB151 (LINC) em que A – fotografia da esferográfica à qual foi extraída a tinta para análise, B – cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB151.

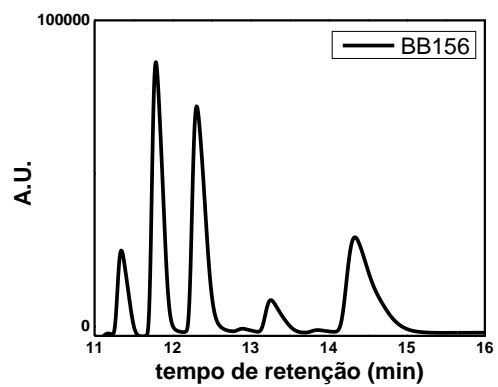


Fig. B31 – Cromatograma obtido por HPLC da tinta da esferográfica BB156 (Stabilo)

Anexo C - Espectros de Absorção

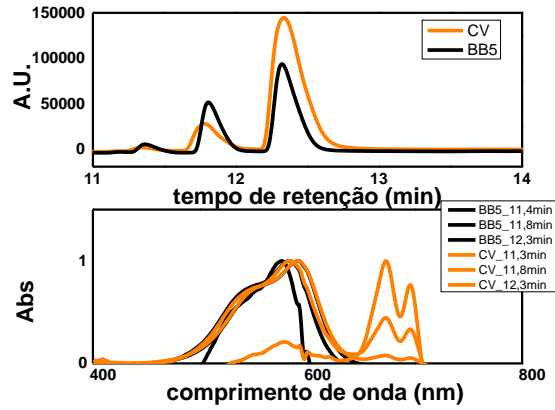


Fig. C1 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB5 com o padrão (CV);
Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB5 e do CV.

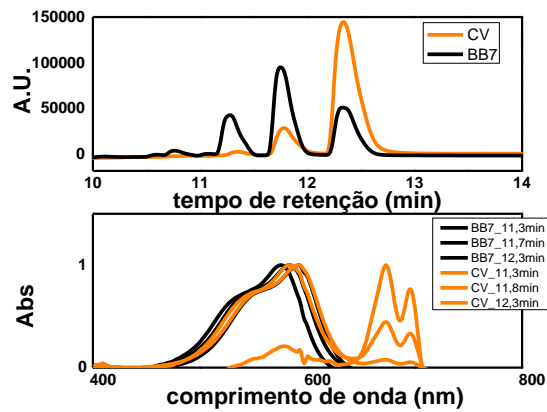


Fig. C2 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB7 com o padrão (CV);
Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB7 e do CV.

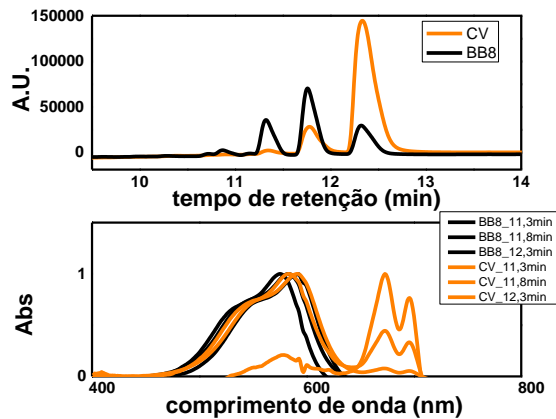


Fig. C3 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB8 com o padrão (CV);
Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB8 e do CV.

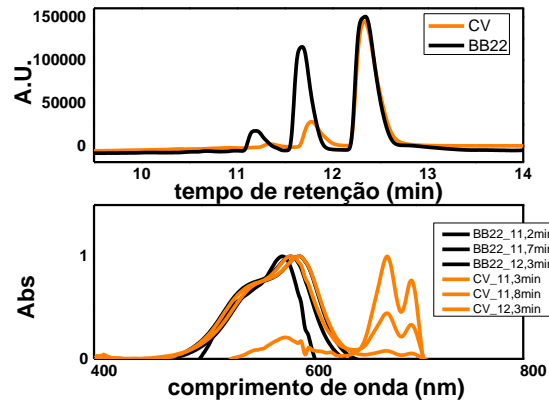


Fig. C4 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB22 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB22 e do CV.

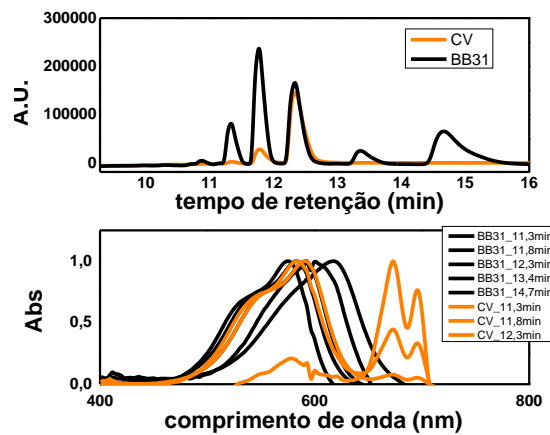


Fig. C5 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB31 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB31 e do CV.

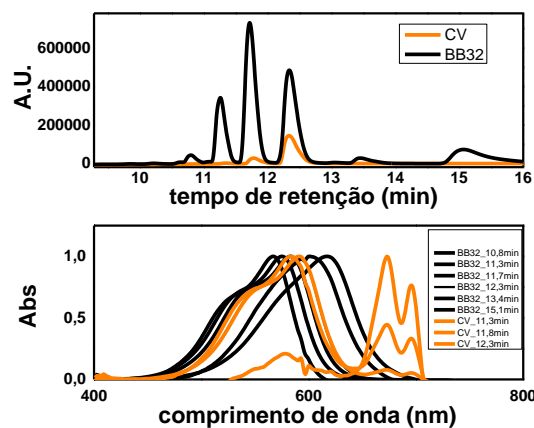


Fig. C6 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB32 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB32 e do CV.

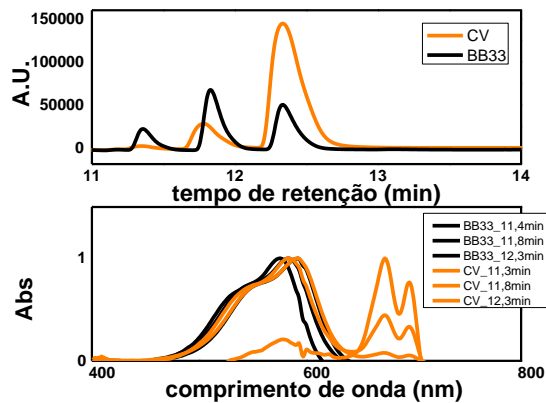


Fig. C7 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB33 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB33 e do CV.

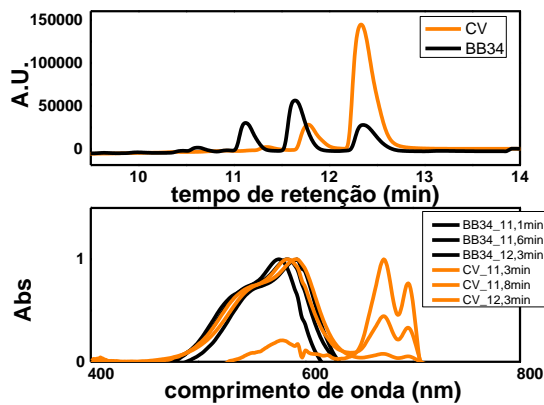


Fig. C8 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB34 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB34 e do CV.

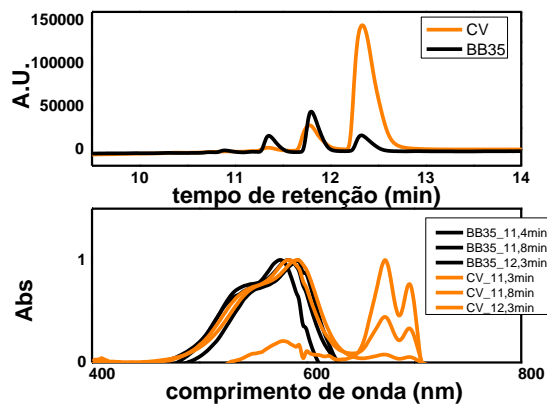


Fig. C9 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB35 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB35 e do CV.

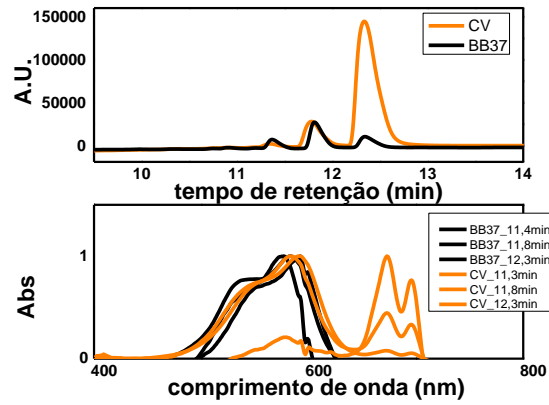


Fig. C10 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB37 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB37 e do CV.

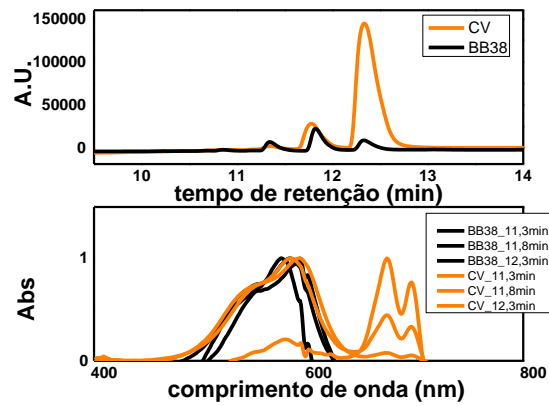


Fig. C11 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB38 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB38 e do CV.

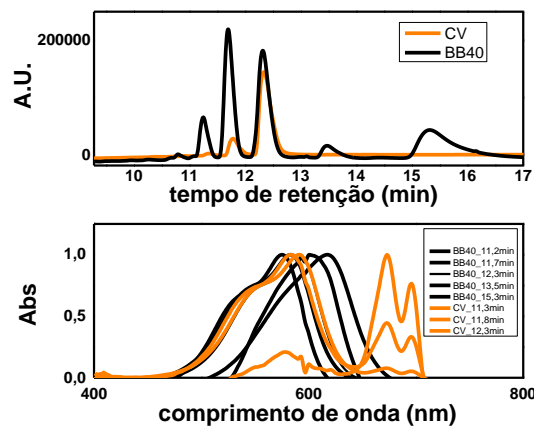


Fig. C12 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB40 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB40 e do CV.

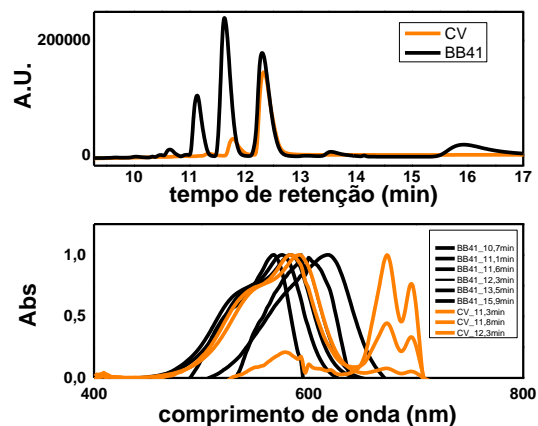


Fig. C13 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB41 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB41 e do CV.

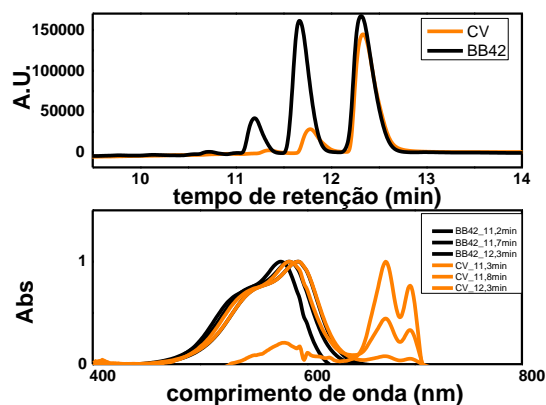


Fig. C14 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB42 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB42 e do CV.

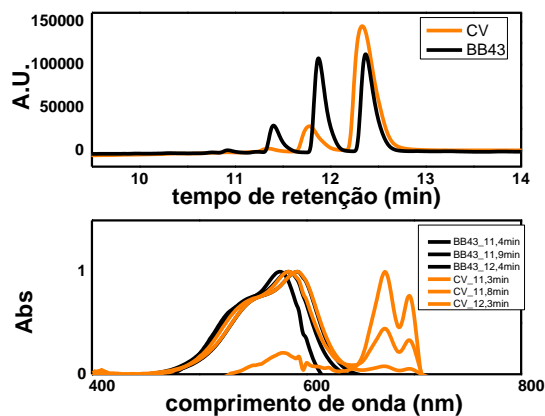


Fig. C15 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB43 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB43 e do CV.

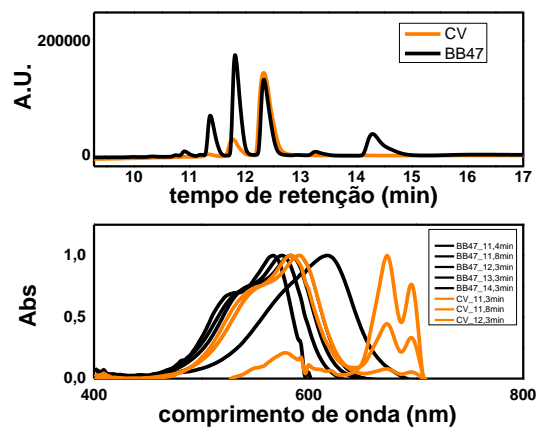


Fig. C16 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB47 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB47 e do CV.

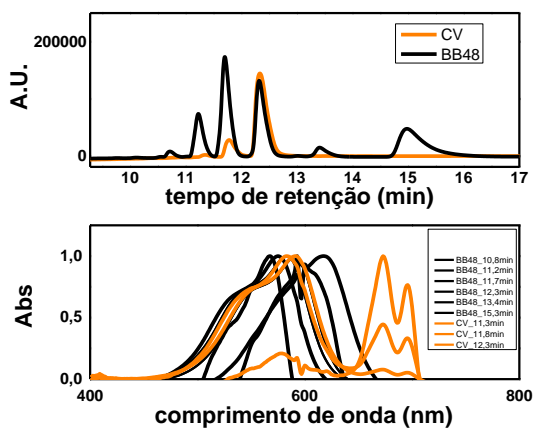


Fig. C17 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB48 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB48 e do CV.

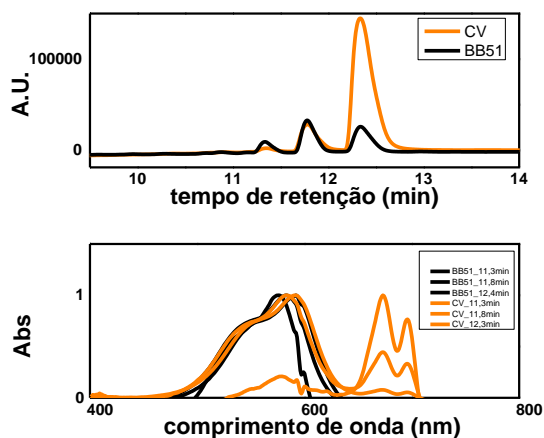


Fig. C18 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB51 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB51 e do CV.

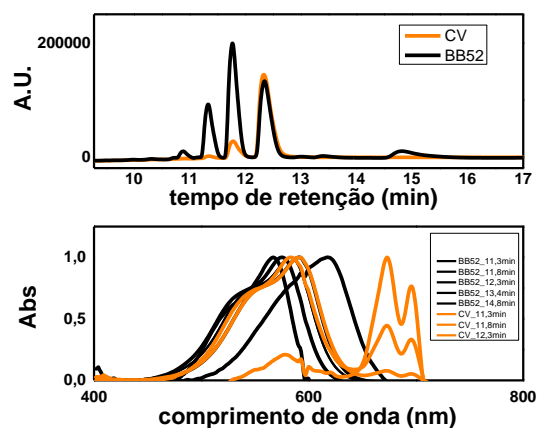


Fig. C19 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB52 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB52 e do CV.

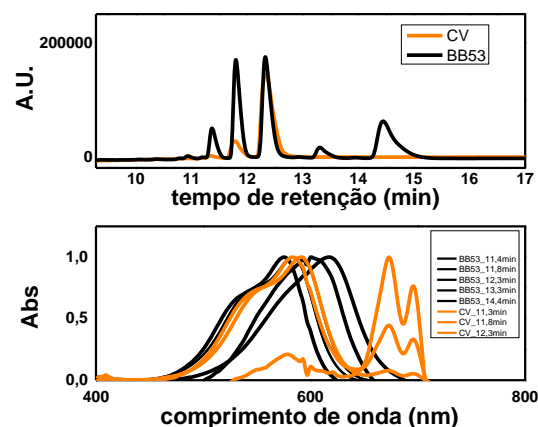


Fig. C20 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB53 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB53 e do CV.

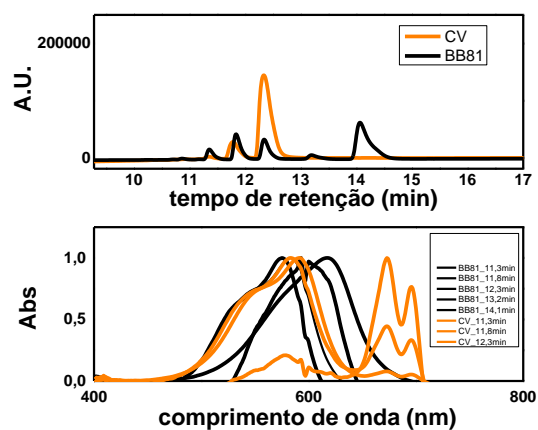


Fig. C21 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB81 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB81 e do CV.

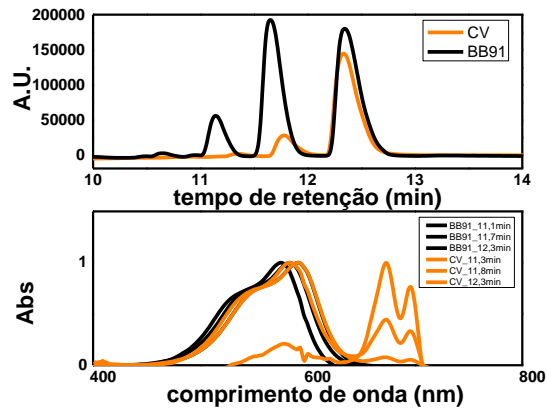


Fig. C22 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB91 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB91 e do CV.

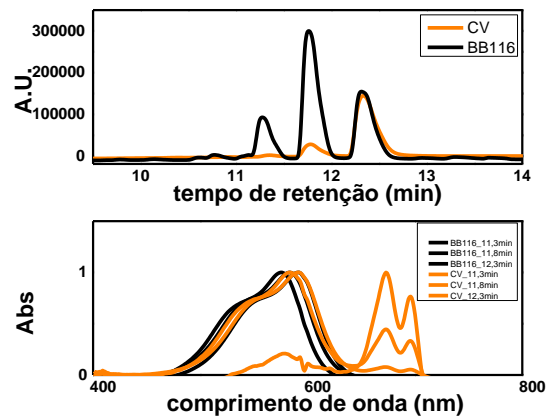


Fig. C23 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB116 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB116 e do CV.

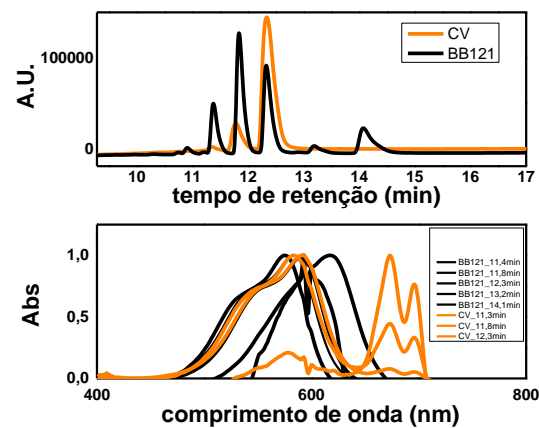


Fig. C24 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB121 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB121 e do CV.

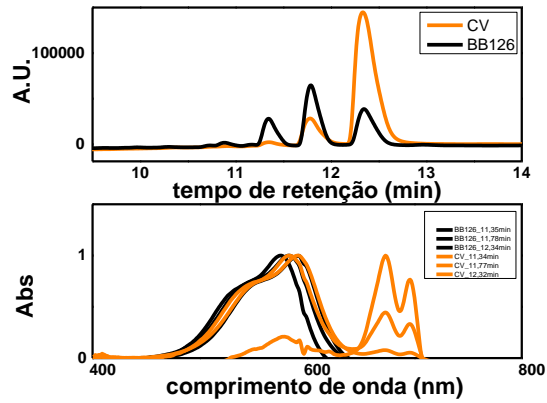


Fig. C25 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB126 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB126 e do CV.

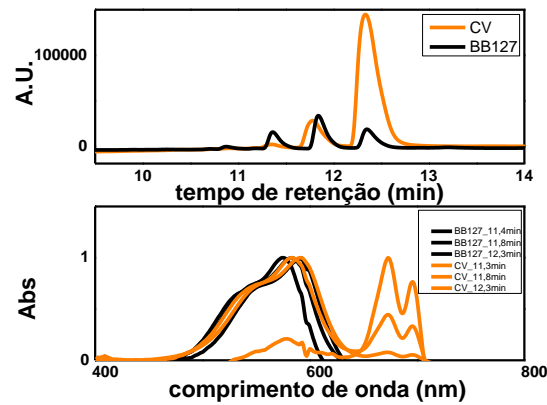


Fig. C26 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB127 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB127 e do CV.

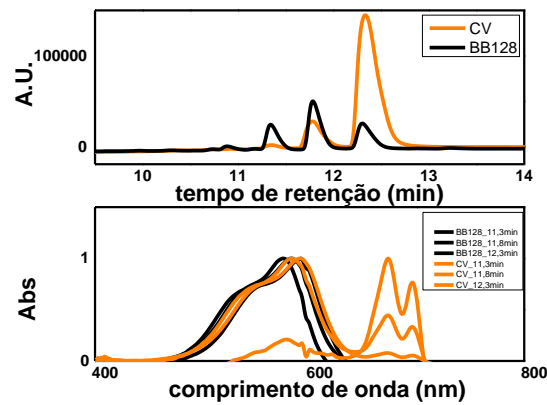


Fig. C27 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB128 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB128 e do CV.

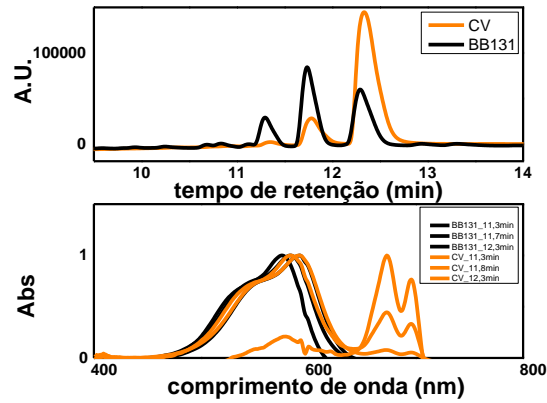


Fig. C28 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB131 com o padrão (CV);
 Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB131 e do CV.

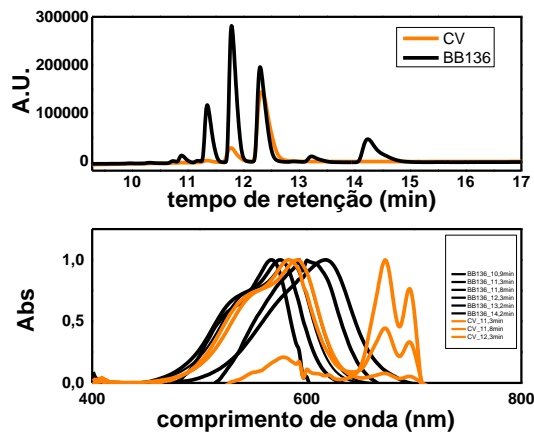


Fig. C29 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB136 com o padrão (CV);
 Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB136 e do CV.

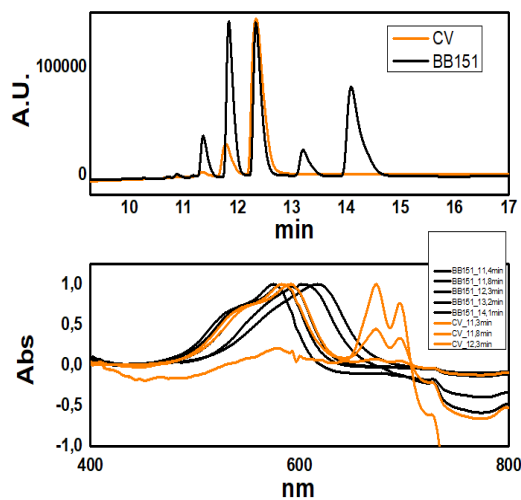


Fig. C30 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB151 com o padrão (CV);
 Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB151 e do CV.

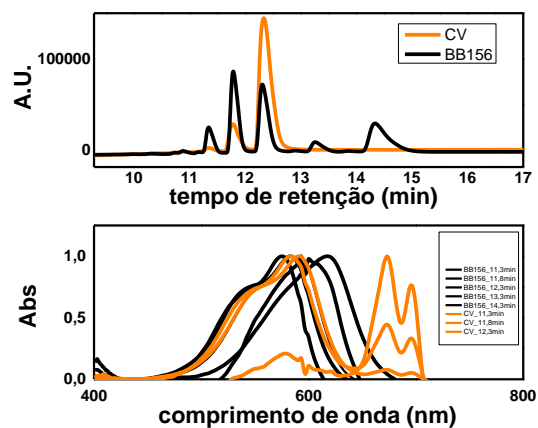


Fig. C31 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB156 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB156 e do CV.

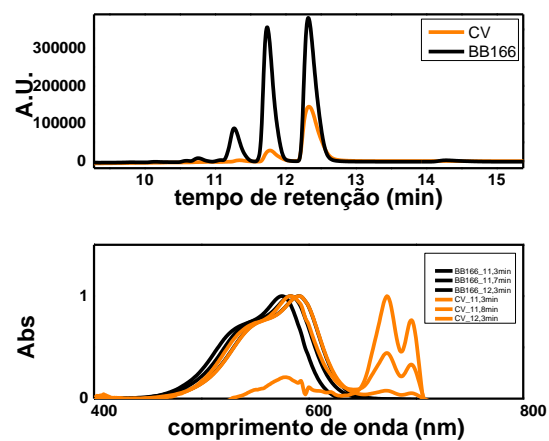


Fig. C32 – de cima para baixo: comparação dos cromatogramas da esferográfica BB166 com o padrão (CV); Comparação dos espectros de absorção, normalizados, da esferográfica BB166 e do CV.

Anexo D – Tabelas com tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) das esferográficas analisadas

Tabela D1 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) da tinta da esferográfica BB5

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	$\lambda_{m\acute{a}x}$
BB5	11,4	768	21,8	576
	11,8	7634	2,2	583
	12,3	16708		592
	11,4	958	19,2	575
	11,8	8576	2,1	583
	12,3	18417		592

Tabela D2 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) da tinta da esferográfica BB7

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	$\lambda_{m\acute{a}x}$
BB7	11,3	8186	2,2	575
	11,7	17885		583
	12,3	11773	1,5	592
	11,3	14335	2,4	575
	11,8	33853		583
	12,3	22684	1,5	592

Tabela D3 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB8

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB8	11,3	5582	2,1	575
	11,8	11619		583
	12,3	6210	1,9	592
	11,3	9998	2,0	575
	11,8	19984		583
	11,3	10839	1,8	592

Tabela D4 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB22

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB22	11,2	4765	8,1	575
	11,7	23838	1,6	583
	12,3	38751		591
	11,1	9052	9,3	575
	11,5	51439	1,6	583
	12,3	84418		591

Tabela D5 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB32

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB32	10,8	8202	16,9	567
	11,3	60107	2,3	575
	11,7	138426		583
	12,3	112517	1,2	591
	13,4	9166	15,1	601
	15,1	44685	3,1	617
	10,8	7371	17,3	567
	11,2	54906	2,3	575
	11,7	127520		583
	12,3	104599	1,2	591
	13,4	9732	13,1	600
	15,1	40855	3,1	617

Tabela D6 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB33

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB33	11,4	2937	3,2	575
	11,8	9321		583
	12,3	8127	1,1	592
	11,4	1007	6,9	575
	11,8	6987		583
	12,3	5886	1,2	592

Tabela D7 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB34

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB34	11,1	5718	2,1	575
	11,6	11834		583
	12,3	7493	1,6	592
	11,1	6502	2,1	576
	11,6	13674		583
	12,3	8843	1,5	592

Tabela D8 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB35

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB35	11,4	2242	2,9	575
	11,8	6516		583
	12,3	3042	2,1	592
	11,4	1827	3,0	575
	11,8	5487		532/583
	12,3	2694	2,0	592

Tabela D9 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB37

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB37	11,4	330	10,0	577
	11,8	3298		583
	12,3	1047	3,1	592
	11,4	403	9,9	576
	11,8	3983		530/583
	12,3	1131	3,5	592

Tabela D10 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB38

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB38	11,3	269	9,8	575
	11,8	2635		583
	12,3	864	3,1	592
	11,3	3385	2,8	575
	11,8	9614		583
	12,3	4789	2,0	592

Tabela D11 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB40

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB40	11,2	11815	3,8	575
	11,7	41670	1,1	583
	12,3	44496		591
	13,5	6312	7,0	601
	15,3	25802	1,7	617
	11,3	10299	4,0	575
	11,7	37073	1,1	583
	12,3	40771		592
	13,3	6162	6,6	601
	14,8	32149	1,3	617

Tabela D12 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB41

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB41	10,7	1986	24,3	567
	11,1	18875	2,6	575
	11,6	48187		583
	12,3	44499	1,1	591
	13,5	2394	20,1	600
	15,9	14951	3,2	619
	10,6	865	38,6	567
	11,1	12543	2,7	575
	11,6	33419		583
	12,3	29910	1,1	592
	13,5	4229	7,9	600
	15,9	21878	1,5	618

Tabela D13 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB42

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB42	11,2	7353	5,5	575
	11,7	31859	1,3	583
	12,3	40417		591
	11,2	6414	5,4	575
	11,7	27352	1,3	583
	12,3	34373		592

Tabela D14 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB43

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB43	11,4	2548	5,9	575
	11,9	11708	1,3	583
	12,4	15060		592
	11,4	3883	4,6	575
	11,9	14911	1,2	583
	12,4	17863		592

Tabela D15 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB46

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB46	11,4	506	12,3	576
	11,8	4284	1,4	531/583
	12,4	6206		592
	13,4	808	7,7	600
	14,6	5169	1,2	619
	11,3	557	10,9	574
	11,8	4318	1,4	583
	12,3	6044		592
	13,4	928	6,5	600
	14,6	5230	1,2	619

Tabela D16 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB47

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB47	11,4	10033	2,6	575
	11,8	25942		583
	12,3	23381	1,1	591
	13,3	1252	20,7	600
	14,3	11877	2,2	617
	11,4	7814	2,6	575
	11,8	20561		583
	12,3	18623	1,1	592
	13,2	982	20,9	600
	14,2	9203	2,2	617

Tabela D17 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB48

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB48	10,8	1418	21,2	568
	11,2	12985	2,3	575
	11,7	30116		583
	12,3	25301	1,2	592
	13,4	3584	8,4	593/600
	15,3	23237	1,3	617
	10,8	1232	24,9	567
	11,2	13021	2,4	575
	11,7	30659		583
	12,3	26058	1,2	592
	13,4	3796	8,1	593/600
	15,1	24401	1,3	617

Tabela D18 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB51

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB51	11,3	1176	4,8	575
	11,8	5378	1,0	583
	12,4	5635		592
	11,3	1407	4,0	576
	11,8	5547	1,0	583
	12,3	5693		592

Tabela D19 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB52

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB52	11,3	1634	22,1	567
	11,8	15768	2,3	575
	12,3	36171		583
	13,4	30168	1,2	592
	14,8	6014	6,0	618
	11,3	1391	23,3	567
	11,8	13943	2,3	575
	12,3	32489		583
	13,4	27458	1,2	592
	14,8	5476	5,9	619

Tabela D20 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB53

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB53	11,4	7235	4,3	575
	11,8	24314	1,3	583
	12,3	30870		592
	13,3	4208	7,3	600
	14,4	22212	1,4	617
	11,4	5953	4,0	576
	11,8	19309	1,2	583
	12,3	23719		592
	13,3	3584	6,6	600
	14,3	17330	1,4	617

Tabela D21 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB81

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB81	11,3	1906	8,4	575
	11,8	5800	2,8	583
	12,3	4910	3,3	592
	13,2	976	16,5	600
	14,1	16101		617
	11,4	1881	8,4	575
	11,8	5714	2,8	583
	12,3	5004	3,1	592
	13,2	974	16,2	600
	14,1	15748		617

Tabela D22 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB91

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	$\lambda_{máx}$
BB91	11,1	9802	4,5	575
	11,7	38291	1,2	583
	12,3	44154		591
	11,1	12493	4,3	575
	11,7	47594	1,1	583
	12,3	54273		591

Tabela D23 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB116

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB116	11,3	18828	3,1	575
	11,8	57759		583
	12,3	36323	1,6	592
	11,3	15013	3,3	575
	11,8	49453		583
	12,3	31627	1,6	592

Tabela D24 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB121

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB121	11,4	7129	2,5	575
	11,8	17972		583
	12,3	15137	1,2	591
	13,2	1439	12,5	593/600
	14,1	7117	2,5	616
	11,4	7129	2,5	575
	11,8	17972		583
	12,3	15137	1,2	591
	13,2	1439	12,5	593/600
	14,1	7117	2,5	616

Tabela D25 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB126

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB126	11,3	4545	2,4	575
	11,8	11022		583
	12,3	8100	1,4	592
	11,4	4036	2,6	576
	11,8	10559		583
	12,4	7684	1,4	592

Tabela D26 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB127

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB127	11,4	2068	2,3	575
	11,8	4728		583
	12,3	3145	1,5	592
	11,4	1067	2,8	575
	11,8	2982		583
	12,4	1819	1,6	592

Tabela D27 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB128

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB128	11,3	3452	2,1	575
	11,8	7348		583
	12,3	4711	1,6	592
	11,4	2679	2,4	575
	11,8	6403		583
	12,3	3892	1,6	592

Tabela D28 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB131

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB131	11,3	4911	2,9	575
	11,7	14307		583
	12,3	12286	1,2	592
	11,3	4515	3,1	576
	11,8	14023		583
	12,3	12320	1,1	592

Tabela D29 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB136

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB136	10,9	1696	23,9	567
	11,3	16765	2,4	575
	11,8	40527		583
	12,3	33682	1,2	591
	13,2	2434	16,7	600
	14,2	14483	2,8	618
	10,9	1578	24,3	567
	11,4	15782	2,4	575
	11,8	38293		583
	12,3	31975	1,2	591
	13,2	2523	15,2	600
	14,3	13684	2,8	617

Tabela D30 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB151

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB151	11,4	4635	4,6	576
	11,8	18116	1,2	583
	12,3	21173		592
	13,2	5056	4,2	601
	14,1	21102	1,0	617
	11,4	5283	4,5	575
	11,8	20639	1,1	583
	12,3	23541		592
	13,2	5432	4,3	601
	14,1	23337	1,0	617

Tabela D31 - Tempos de retenção (t_r), área, razão de áreas e máximo de absorção (λ_{max}) da tinta da esferográfica BB156

Esferográfica	t_r	Área	Razão áreas	λ_{max}
BB156	11,3	3966	3,5	575
	11,8	13608	1,0	583
	12,3	13983		592
	13,3	2760	5,1	600
	14,3	12021	1,2	617
	11,4	3953	3,5	576
	11,8	13656	1,0	583
	12,3	13786		592
	13,3	2553	5,4	600
	14,3	11672	1,2	617