

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Aplicação de Técnicas Cromatográficas e Espectrométricas no  
Desenvolvimento de Métodos para Datação e Investigação de Fraudes em  
Documentos Forenses**

Carina Maria Bello de Carvalho

Porto Alegre, 2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Aplicação de Técnicas Cromatográficas e Espectrométricas no  
Desenvolvimento de Métodos para Datação e Investigação de Fraudes em  
Documentos Forenses**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof. Dr. Renata Pereira Limberger.

Co-orientador: Dr. Rafael Scorsatto Ortiz

Porto Alegre, 2018

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.08.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Carlos Alberto Yasin Wayhs  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof. Dr. Diogo dos Santos Miron  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Michel José Anzanello  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP – Catalogação na Publicação

de Carvalho, Carina Maria Bello  
Aplicação de Técnicas Cromatográficas e  
Espectrométricas no Desenvolvimento de Métodos para  
Datação e Investigação de Fraudes em Documentos  
Forenses / Carina Maria Bello de Carvalho. -- 2018.  
205 f.  
Orientadora: Renata Pereira Limberger.

Coorientador: Rafael Scorsatto Ortiz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BRRS,  
2018.

1. Datação de Documentos. 2. Canetas  
Esferográficas. 3. Fenoxietanol. 4. Orbitrap. 5.  
Cromatografia Gasosa. I. Limberger, Renata Pereira,  
orient. II. Ortiz, Rafael Scorsatto, coorient. III.  
Título.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, por me proporcionar ânimo e saúde para enfrentar todas as dificuldades que apareceram pelo caminho, até a finalização deste estudo.

A segunda pessoa que mais merece o meu agradecimento neste momento é o meu esposo Frederico, que tem estado ao meu lado há mais de 15 anos, sempre apoiando incondicionalmente todos os meus sonhos e desafios, e fazendo parte deles, seja cuidando das nossas filhas na minha ausência, seja cuidando de mim nos meus momentos de ansiedade e desânimo.

Quero agradecer às minhas filhas Gabriela e Valentina, que mesmo sendo crianças, souberam compreender a importância que trilhar este caminho teve para mim, sendo pacientes quando nem sempre pude dar a elas toda a atenção devida.

Quero agradecer a minha família, meus pais e sogra, por estarem sempre me apoiando, nos momentos em que mais precisei.

Gostaria de agradecer aos meus orientadores Renata Limberger e Rafael Ortiz, pelo conselho sempre oportuno. Gostaria de fazer um agradecimento especial ao Professor Marco Flores Ferrão, por todos os minutos que cedeu de seu tempo para me auxiliar e me ensinar muito nas análises quimiométricas, sem as quais este trabalho não teria sido tão proveitoso. Não posso deixar de agradecer às estagiárias do LABTOXICO que muito me auxiliaram nas análises experimentais.

Um agradecimento especial para o Professor Boniek Vaz, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, que proporcionou o acesso ao equipamento Orbitrap. Gostaria de agradecer a todos os meus colegas do Setec/SR/PF/RS, pela paciência e compreensão durante as análises experimentais no laboratório; especialmente ao Perito Criminal Marcelo Fortes, por ter me dado o empurrão inicial que me fez decidir voltar a estudar; e aos Peritos Criminais Daniele Zago Souza e Bruno Todeschini, que sempre me auxiliaram com ideias e conselhos técnicos imprescindíveis para a realização da parte experimental; e também aos colegas do Grupo de Documentoscopia, por me inspirarem com ideias importantes para a realização deste trabalho.

Não posso deixar de agradecer a empresa Agilent, na pessoa dos especialistas de produtos Sr. Romão Beserra e Sr. Celso Blatt, pela oportunidade de realizar diversos experimentos no Centro de Treinamento, em Barueri, São Paulo.

Da mesma forma não posso deixar de agradecer a empresa Thermo Fisher, na pessoa da especialista, Sra. Luciana Pataro, pela oportunidade de realizar diversos experimentos no Customer Experience Centre, na cidade de São Paulo, SP.

Um importante agradecimento também deve ser dado à Superintendência Regional da Polícia Federal no Estado do Rio Grande do Sul, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense, à CAPES, pelo Projeto Pró-Forenses, e ao Laboratório de Toxicologia (LABTOXICO) da Faculdade de Farmácia - UFRGS.

E por fim um agradecimento a todas as pessoas que de um jeito ou de outro, embora não nominadas aqui, me auxiliaram na conclusão de mais esta etapa.

## RESUMO

No Brasil, peritos criminais e cientistas forenses frequentemente são solicitados a resolver diversos casos que requerem análise de tintas de canetas esferográficas, visando aos processos de envelhecimento das substâncias contidas nas tintas, como resinas, corantes e solventes, e na análise do papel, envelhecido com extratos vegetais. A datação dos lançamentos com canetas esferográficas em documentos pode ser realizada através da análise do teor de solventes e/ou da degradação dos corantes da tinta da caneta e diversos métodos são apresentados na literatura. O objetivo desta Tese foi estabelecer e validar metodologia de análise de tintas de canetas, especificamente dos corantes e solventes (em especial o 2-fenoxietanol (2-FE)), e a presença de extratos vegetais no papel (em especial a presença de cafeína), utilizando métodos de alta resolução como ESI-ORBITRAP (Ionização por Spray Eletrônico - Espectrometria de Captura de Íons de alta resolução) e CG/EM (Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Detector de Massas), para acompanhar o comportamento de envelhecimento de traços de diversos tipos de canetas e estabelecer um padrão no Brasil, pela evaporação do 2-FE. Além dos métodos acima descritos, realizou-se análise de diversas canetas esferográficas em diversos tipos de papéis, utilizando IV-ATR (Espectroscopia no Infravermelho com Acessório de Refletância Total Atenuada) para estabelecer método de datação de manuscritos, usando Análise Estatística Multivariada. Em relação à detecção de cafeína em papéis embebidos em chá e café preto, o método de CG/EM foi eficiente e a otimização do método utilizando planejamento fatorial resultou na constatação de que o tipo e a gramatura do papel influenciam na absorção de cafeína, bem como o tipo de bebida cafeinada e a forma de aplicação da mesma no papel. O perfil de substâncias com massa exata de componentes da formulação das diversas canetas analisadas pelo Orbitrap, processados a partir de Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Grupamento Hierárquicos (HCA) foi capaz de diferenciar com um grande poder de discriminação mesmo amostras de mesma marca de caneta, mas de modelos diferentes, ao mesmo tempo em que aproximou em grupos canetas de formulação semelhante. Na análise dos traços tintas de canetas aplicados em diversos tipos de papel, com IV-ATR, verificou-se que o método foi capaz de adquirir espectros principalmente das tintas, sem influência do papel, além disto, a análise estatística multivariada conseguiu agrupar diversas canetas por semelhança na formulação e diferenciar canetas de marcas diferentes. Nas análises realizadas com traços da

mesma caneta com idades diferentes, a estatística multivariada (PCA e HCA) foi capaz de diferenciar traços com idades diferentes, e o destaque nesta conclusão foi que nos *loadings* das PCs para diversas canetas, observou-se o peso das absorções relativas ao 2-FE em canetas mais recentes (algumas até 1 ano de aplicadas). Baseando-se nos agrupamentos formados pela HCA dos espectros de infravermelho das canetas recentemente aplicadas, escolheram-se algumas canetas representativas dos grupos, as quais foram analisadas em diversas idades, por CG/EM, com o objetivo de quantificar o 2-FE, até 3 anos de envelhecimento. O que se pode observar foi que o tipo de papel (branco ou reciclado) influenciou na concentração de solvente extraída para os traços de canetas envelhecidos 27 meses, embora não tenha influenciado no caso de traços recém aplicados, na maioria das canetas. As condições de armazenamento do papel com os traços de caneta também foram decisivas, uma vez que as amostras mantidas na luz e em temperaturas mais elevadas, após 27 meses apresentaram um teor de solventes muito menor que as amostras armazenadas no escuro com temperatura controlada. Observou-se que as canetas com quantidades iniciais maiores de 2-FE apresentaram a tendência a evaporar este solvente mais rapidamente. Embora as canetas após 3 anos possuam quantidades muito menores de 2-FE, muitas vezes sem diferença estatística das quantidades entre 27 e 18 meses, entre as diferentes marcas de canetas, as quantidades ainda apresentaram diferença estatística, portanto podem ocorrer concentrações diferentes de solventes entre canetas diferentes com a mesma idade. Todos os experimentos conduzidos durante a presente Tese proporcionaram um *screening* efetivo do comportamento das canetas, tanto em formulação de corantes, como de solventes, proporcionando uma bagagem de conhecimento acumulado sobre as canetas utilizadas no Brasil, para que estudos futuros possam padronizar estas técnicas objetivando resultados conclusivos e confiáveis para a determinação da cronologia de documentos questionados criminalmente, com aplicação imediata na prática real dos laboratórios forenses.

**Palavras-Chave:** Datação de Documentos; Canetas Esferográficas; Orbitrap; 2-fenoxietanol; cafeína; análise estatística multivariada; Infravermelho-ATR; Cromatografia Gasosa; Espectrometria de Massas; corantes; papel reciclado.



## ABSTRACT

Brazilian Forensic Scientists are frequently asked about ballpoint strokes chronology, and in the recent years, many methods have been developed on this subject, aiming to determine ink-aging processes. Ballpoint ink dating could be done through analysis of solvent content and degradation of inks. To increase the reliability of the results, the presence of plant extracts on papers can also be evaluated. Considering that, the aim of this thesis was to establish and validate a methodology for the analysis of pen inks, specifically dyes and solvents (in particular 2-phenoxyethanol), and the presence of plant extracts on paper (in particular the presence of caffeine) using high resolution methods such as ESI-ORBITRAP (Electrospray Ionization-High-resolution Ion Capture Spectrometry) and GC / MS (Gas-phase Chromatography coupled to Mass Detector) with the purpose of accompanying the aging behavior of traces of various types of pens and establish a pattern relative to Brazil, accompanying mainly the evaporation of 2-PE. In addition to the methods described above, a number of ballpoint pens were also analyzed in different types of papers, using IV-ATR (Infrared Spectroscopy with Total Attenuated Reflectance Accessory), also attempting to establish a method of dating a manuscript using Multivariate Statistical Analysis. Regarding the detection of caffeine in papers soaked in tea and black coffee, the GC / MS method was efficient and the optimization of the method using factorial design resulted in the finding that the type and weight of paper influence the absorption of caffeine as well as the type of caffeinated beverage and the form of application of the same on paper are also decisive for the identification of caffeine. The profile of substances with exact mass of formulation components of the various pens, analyzed by Orbitrap, processed from Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Grouping Analysis (HCA), was able to differentiate with a great power of discrimination even samples of same brand of pen, but of different models, while at the same time approached in groups pens of similar formulation. Orbitrap was able to identify acid and basic dyes, in addition to other components of the formulation, which facilitated the differentiation between the pens. In the analysis of the ink traces of pens applied to various types of paper, with IV-ATR, it was verified that the method was able to acquire spectra mainly of the inks, without influence of the paper, besides, the multivariate statistical analysis managed to group several pens by similarity in the formulation and differentiate pens from different brands. In the analyzes performed with strokes of the same pen of different ages, the multivariate statistic (PCA and HCA) was able to differentiate samples with different

ages, and the highlight in this conclusion was that in the loadings of the PCs for several pens, the weight of absorptions of 2-PE counted in newer pens (some up to 1 year of use); however in older pens (more than 2 years), 2-PE absorptions were no longer observed. Based on the groups formed by the HCA of the infrared spectra of the newly applied pens, some pens representative of the groups were chosen, which were analyzed at different ages by GC / MS, with the aim of quantifying 2-PE, until 3 years of aging. The determination of the evaporation profile of 2-PE with the time of these pens allowed an understanding of how the aging of the formulations commercialized in Brazil behaves. It can be observed that the type of paper (white or recycled) influenced the concentration of solvent extracted for pen strokes aged 27 months, although it did not influence the case of newly applied ones in most pens. The storage conditions of the strokes in paper were also decisive, since the samples kept in the light and at higher temperatures, after 27 months presented a much lower solvent content than the samples stored in the dark with controlled temperature. It was found that pens with initial amounts greater than 2-PE showed a tendency to evaporate this solvent more rapidly. A very important conclusion was that, although the pens after 3 years had much smaller amounts of 2-PE, often without statistical difference of the amounts present with 27 months or 18 months, among the different brands of pens, the quantities still presented difference statistic, so the identification of different pen formulations remains important even after 3 years, as different concentrations of solvents may occur between different pens at the same age. All experiments conducted during the present thesis have provided an effective screening of the behavior of the pens, both in dye formulation and solvents, providing an accumulated knowledge of the pens used in Brazil; so that future studies can standardize these techniques for conclusive and reliable results for the determination of the chronology of documents questioned criminally, with immediate application in the real practice of forensic laboratories.

Keywords: Document Dates; Ballpoint pens; Orbitrap; 2-phenoxyethanol; caffeine; multivariate statistical analysis; Infrared-ATR; Gas Chromatography; Mass Spectrometry; dyes; recycled paper.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1. Resultados de HCA para canetas azuis	83
Figura 2-2. Resultados de HCA para canetas pretas	83
Figura 2-3. Resultados da PCA para canetas azuis	84
Figura 2-4. Resultados da PCA para canetas pretas	86
Figura 3-1. Curva de Calibração do 2-fenoxietanol	105
Figura 3-2. Gráfico dos Efeitos Principais dos Fatores	108
Figura 3-3. Gráfico dos Efeitos de Interação entre os Fatores	109
Figura 4-1. Influência do papel nos experimentos	124
Figura 4-2. Resultados para canetas azuis recém aplicadas	125
Figura 4-3. Resultados para canetas pretas recém aplicadas	126
Figura 4-4. Resultados para tintas de canetas azuis e pretas extraídas diretamente do cartucho	127
Figura 4-5. Resultados de PCA para a caneta A32	129
Figura 4-6a. Resultados HCA para canetas azuis após 14 dias	131
Figura 4-6b. Resultados HCA para canetas azuis após 7 meses	131
Figura 4-6c. Resultados HCA para canetas azuis após 2 anos	131
Figura 4-7a. Resultados HCA para a caneta preta P10	133
Figura 4-7b. Resultados PC1 para a caneta preta P10	134
Figura 4-8a. Resultados PC1xPC2 para a caneta BIC Crystal	134
Figura 4-8b. Resultados PC1 para a caneta BIC Crystal	134
Figura 5-1. Perfil de envelhecimento das canetas azuis	170
Figura 5-2. Perfil de envelhecimento das canetas pretas	170



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo cronológico das publicações sobre o tema	30
Tabela 2-1. Canetas azuis analisadas	80
Tabela 2-2. Canetas pretas analisadas	81
Tabela 2-3. Loadings PC1 e PC2 positivos para canetas azuis	85
Tabela 2-4. Loadings PC1 positivo e negativo para canetas pretas	87
Tabela 3-1. Teste de Youden para avaliação de robustez	103
Tabela 3-2. Fatores versus níveis do design fatorial	104
Tabela 3-3. Resultados para exatidão das medidas de 2-PE	106
Tabela 3-4. Resultados para Repetibilidade das medidas de 2-PE	107
Tabela 4-1. Canetas azuis analisadas	122
Tabela 4-2. Canetas pretas analisadas	123
Tabela 4-3. Tipos de papel analisados	123
Tabela 4-4. Canetas azuis analisadas por idade	130
Tabela 4-5. Canetas pretas analisadas por idade	133
Tabela 5-1. Canetas azuis analisadas	147
Tabela 5-2. Canetas pretas analisadas	147
Tabela 5-3. Tipos de papel analisados	147
Tabela 5-4. Resultados da ANOVA para canetas azuis	150
Tabela 5-5. Resultados da ANOVA para canetas pretas	151
Tabela 5-6. ANOVA agrupada para canetas azuis e pretas	152
Tabela 5-7. Resultados da ANOVA para concentração de 2-PE em canetas azuis e pretas aplicadas em papel branco e reciclado	154
Tabela 5-8. Concentração de 2-PE em canetas azuis e pretas após 4 meses de envelhecimento	156
Tabela 5-9. Resultados da ANOVA da concentração de 2-PE em canetas azuis e pretas após 18 meses de envelhecimento	157
Tabela 5-10. Resultados da ANOVA da concentração de 2-PE em canetas azuis e pretas após 27 meses de envelhecimento	159
Tabela 5-11. Resultados da ANOVA da concentração de 2-PE em canetas azuis e pretas armazenadas em condições controladas e em condições de escritório após 27 meses	160

Tabela 5-12. Resultados da ANOVA da concentração de 2-PE em canetas azuis e pretas armazenadas em condições de escritório, após 27 meses,comparando papel branco e papel reciclado	162
Tabela 5-13. Resultados da ANOVA da concentração de 2-PE em canetas azuis e pretas armazenadas em condições controladas, após 27 meses,comparando papel branco e papel reciclado	163
Tabela 5-14. Resultados para a concentração de 2-PE para traços de caneta com 3 anos de idade	165
Tabela 5-15.Equação de regressão para as curvas construídas de 0 a 3 anos de idade para traços de canetas azuis e pretas em papel branco	167

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	23
2.1. OBJETIVOS GERAIS	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. REVISÃO DO TEMA	27
4. CAPÍTULO 1	57
4.1 ARTIGO 1	59
5. CAPÍTULO 2	73
5.1 ARTIGO 2	75
6. CAPÍTULO 3	93
6.1 MANUSCRITO 3	95
7. CAPÍTULO 4	115
7.1 MANUSCRITO 4	117
8. CAPÍTULO 5	137
8.1 MANUSCRITO 5	139
9. DISCUSSÃO GERAL	175
10. CONCLUSÃO GERAL	189
11. PERSPECTIVAS FUTURAS	193
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	197





---

## 1. INTRODUÇÃO



As ciências forenses constituem na aplicação das ciências naturais na solução de questões judiciais. Entretanto, existem questionamentos básicos dentro das ciências forenses que ainda não conseguiram ser elucidados e estão na fase inicial da pesquisa tecnológica. A determinação da idade de um lançamento à tinta em um documento é muito importante para a identificação de fraudes em documentos submetidos à perícia criminal, sendo um dos questionamentos cuja solução ainda é muito incipiente e as conclusões até agora obtidas geram controvérsia no âmbito da ciência forense, levando-se em consideração o universo de variáveis que podem afetar as análises de amostras manuais de canetas em documentos reais (BÜGLER *et al.*, 2008; WEYERMANN *et al.* 2007a; KOENIG e WEYERMANN, 2018) .

Recentemente, grupos de cientistas forenses europeus uniram-se no objetivo de testar métodos e validá-los em vários laboratórios, formando uma rede que foi batizada de *International Collaboration on Ink Dating (InCID)* (Colaboração Internacional em Datação de Tintas), que é um subgrupo do *European Document Experts Working Group (EDEWEG)*, da *ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes)*. Esta rede busca aumentar a informação no uso de métodos de datação de tintas na Europa e no resto do mundo (KOENIG *et al.*, 2015b).

No Brasil, peritos criminais e cientistas forenses frequentemente são solicitados a resolver diversos casos que requerem análise de tintas de canetas esferográficas. Entretanto, as respostas a estes questionamentos acabam sendo prejudicadas pela ausência de técnicas efetivas para a determinação da idade da tinta aposta no documento (EZCURRA *et al.*, 2010). Por isso métodos têm sido desenvolvidos, através dos anos, visando aos processos de envelhecimento das substâncias contidas nas tintas, como resinas, corantes e solventes (WEYERMANN *et al.*, 2007a), porém com pouca efetividade ou possibilidade de aplicação com resultados inequívocos. A determinação da autenticidade ou falsidade, com relevância na identificação de substâncias presentes em extratos vegetais, comumente utilizados para o envelhecimento artificial de documentos forenses, também pode ser um adjuvante neste tipo de estudos (CARVALHO e SOUZA, 2015). Entretanto, não se verificou, na literatura, a utilização de métodos multianalíticos efetivos.

Algumas fraudes também são realizadas tentando simular documentos envelhecidos, utilizando-se café ou chá para forçar um efeito amarelado no papel, de modo que este pareça mais antigo. Até o momento não foram publicados estudos de

casos abordando a identificação de envelhecimento artificial por chá ou café, com a utilização de métodos instrumentais cromatográficos e espectrométricos, entretanto, Carvalho e Souza (2014) concluíram em Laudo Pericial Criminal que recibos com aparência de envelhecidos apresentavam a substância cafeína, detectada por CG (Cromatografia em fase Gasosa) associada a EM (Espectrometria de Massas). Uma grande casuística nas investigações criminais é a fraude de atestados e prescrições médicas, falsificando-se a data de emissão, assinatura do médico e até mesmo o próprio formulário de receita médica. Muitas vezes estas fraudes são cometidas na tentativa de simular doenças que permitam a obtenção de aposentadoria por invalidez ou indenizações trabalhistas ou na tentativa de burlar o controle da vigilância sanitária. A obtenção de provas materiais que comprovem as fraudes passa muitas vezes pela análise do papel e das tintas de caneta esferográfica utilizadas nos manuscritos (CARVALHO e SOUZA, 2014).

A datação de um documento pode ser absoluta ou relativa. Datação absoluta é a determinação da idade exata de um documento, avaliada através das características do suporte, da tinta utilizada nos escritos, da tecnologia de impressão utilizada, que são características composicionais ou estáticas de um documento. Se a data alegada do documento for anterior à data da criação, fabricação ou disponibilidade de qualquer material usado na sua confecção, então um anacronismo está presente, ou seja, a data do documento não é compatível com a data da confecção do mesmo (BRAZEAU e GAUDREAU, 2007; WEYERMANN *et al.*, 2011). Segundo Weyermann (2011), outra abordagem é a “dinâmica absoluta”, onde se assume que uma tinta não envelhece no cartucho da caneta, mas após a aposição da tinta no papel se inicia a degradação dos corantes, evaporação dos solventes e polimerização das resinas, que podem ser retardados ou acelerados devido a vários fatores: composição inicial das tintas, propriedades químicas e físicas do substrato e condições ambientais de estocagem de armazenamento. Existe também a abordagem “dinâmica relativa”, que compara tintas comprovadamente iguais em formulação, em lançamentos diferentes dentro de um mesmo documento, partindo do princípio de que se estão no mesmo documento, as variações ambientais ficam anuladas, sendo o único fator de mudança o próprio envelhecimento da tinta. Outra forma de datação “relativa” de um documento é a determinação da idade de um documento em relação a um padrão de idade conhecida com a mesma composição do questionado e mantido

sob condições similares. Na prática, dificilmente se terá conhecimento e controle de todos estes fatores que influenciam o envelhecimento da tinta (BRUNELLE e CRAWFORD, 2003).

A literatura (LOCICIRO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006; WEYERMANN *et al.*, 2007a; BERGER-KARIN *et al.*, 2008; WEYERMANN & SPENGLER, 2008; ANDRASKO, 2009) apresenta diversas abordagens para efetuar a datação relativa de um documento, mas, na maioria das vezes, parte de uma curva padrão com documentos de diversas idades conhecidas e geralmente pressupõe que o documento questionado e o padrão foram submetidos às mesmas condições ambientais. Sabe-se, na prática, que essas situações são muito difíceis de acontecer e muitas vezes o analista não tem como avaliar em que condições o documento foi mantido. A datação relativa de uma tinta não consegue definir uma data precisa para o ato da escrita. Entretanto, se uma tinta comprovadamente foi fabricada após certa data, qualquer escrito confeccionado com esta tinta não pode ter sido feito antes desta data (ELLEN, 2006). Aginsky (1998) já afirmava que a datação relativa de uma tinta de caneta era falível, pois as tintas em comparação precisariam ter sido submetidas as mesmas condições ambientais de calor e umidade, e o papel de suporte deveria ser da mesma composição de fibras. Por estes motivos, o desenvolvimento de métodos para a datação de documentos, que sejam dinâmicos, porém relativos entre lançamentos manuscritos dentro de um mesmo documento, tem sido o foco da literatura, com trabalhos recentemente publicados abordando esta metodologia (KOENIG *et al.*, 2015a e 2015b; SAN ROMÁN *et al.*, 2015; DÍAZ-SANTANA *et al.*, 2017).

Muito recentemente, Koenig e Weyermann (2018) concluíram, testando sete parâmetros de envelhecimento para fins de datação de tinta: a quantidade de 2-fenoxietanol (2-FE), áreas de pico relativas (RPA), três razões de perda de solvente (R%, R% \*, NR%) e dois parâmetros de perda de solventes (RNORM, NRNORM), que os parâmetros de envelhecimento natural (NR% e NRNORM) não eram parâmetros de envelhecimento adequados para lançamentos de tinta com mais de algumas semanas. A quantidade de 2-FE, R% e RNORM permitiram seguir o envelhecimento das tintas selecionadas durante todo o período de tempo e foram identificadas como as mais promissoras.

A utilização de métodos cromatográficos e espectrométricos nas ciências farmacêuticas já é prática rotineira do nosso grupo de pesquisa, e esta expertise está

sendo agora aplicada na análise de documentos e tintas de interesse pericial criminal, um assunto de fundamental importância, que, entretanto, ainda necessita de desenvolvimento científico.

A casuística real de análise de documentos e tintas pode ser aproveitada para nortear o desenvolvimento científico dos métodos, e este processo é viável através do já existente intercâmbio técnico-científico entre a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através da Faculdade de Farmácia, e a Superintendência de Polícia Federal no Rio Grande do Sul, conforme Convênio de Cooperação Técnico-Científica vigente entre a UFRGS, através do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia, e o DPF/RS com a finalidade de estabelecer e regular os programas de Cooperação Técnico-Científica e de Formação e Capacitação de Recursos Humanos (Processo nº 230780335780758), e mais recentemente através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense, que é um Instituto financiado pelo CNPq, CAPES e FAPERGS para ensino e pesquisa em Ciências Forenses

Muitos autores têm se dedicado a estudar compostos voláteis das tintas de canetas através de técnicas de CG/EM (KOENIG *et al.*, 2015a e 2015b) e utilizando, associada a esta técnica, a injeção da amostra por Dessorção Térmica (BÜGLER *et al.*, 2008; SAN ROMÁN *et al.*, 2015). Outros autores buscam efetuar a datação das tintas através do acompanhamento da degradação dos corantes, com estudos utilizando as mais diversas técnicas de Espectrometria de Massas, como Dessorção a Laser assistida por Matriz-Espectrometria de Massas por Tempo de Vôo (MALDI-TOF), que parece ser uma alternativa possível ao Espectrômetro de Massa Triplo Quadrupolo, em análises de rotina e quantitativas, pois fornece uma visão muito mais completa do conteúdo de uma amostra (GRUND *et al.*, 2016). A mais recente técnica aplicada para a análise de corantes de canetas esferográficas, com alta resolução de massa, é um equipamento chamado Orbitrap, que é um Espectrômetro de Massas de Captura de Íons, que, na forma como é construído, provê uma resolução de massa na faixa de partes por bilhão.

Similarmente ao Orbitrap, porém com menor resolução de massa, uma técnica que possui a vantagem de não destruir a amostra é o *Paper Spray Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas com Spray no Papel). A amostra de papel com o traço de caneta questionado é posicionada em suporte em frente à entrada do equipamento, em temperatura e pressão ambientes, e um spray carreador é lançado sobre a

amostra, conduzindo para dentro do equipamento, geralmente um Espectrômetro de Massas de Captura de Ions (ION-TRAP-MS) (FERREIRA *et al.*, 2015).

Outras técnicas também recentemente aplicadas para diferenciação e datação de tintas de canetas esferográficas têm sido baseadas em Espectrometria no Infravermelho, sendo que algumas técnicas permitem que a amostra seja analisada sem destruição (ZIEBA-PALUS *et al.*, 2006; KHER *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; NAM *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2017).

Considerando o exposto, e buscando implementar soluções para problemas reais e rotineiros dentro das ciências forenses, o presente trabalho busca propor, testar e aprimorar métodos cromatográficos e espectrométricos que possam ser aplicados na rotina forense de datação de documentos, executando ação efetiva visando o desenvolvimento da Ciência Forense no âmbito das Ciências Farmacêuticas, conforme projeto aprovado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), junto ao Edital Ciências Forenses nº 25/2014 - "PRÓ-FORENSES 3357/2014", Processo nº 23038.006845/2014-9, intitulado "Intercâmbio Científico e de Formação de Recursos Humanos entre as Universidades Federais do Espírito Santo (UFES), Goiás (UFG) e do Rio Grande do Sul (UFRGS) com a Polícia Federal do Rio Grande do Sul", o qual possui a coordenação geral da Profa. Dra. Renata Pereira Limberger.





---

## **2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**



### 2.1. *Objetivos gerais:*

Desenvolver ferramentas analíticas cromatográficas e espectrométricas para aplicação em análise forense de datação de documentos bem como para a identificação de substâncias que comprovem o envelhecimento artificial de documentos.

### 2.2. *Objetivos específicos:*

2.2.1 Estabelecer e validar metodologia de análise utilizando Cromatografia em fase Gasosa com Detector de Massas (GC/MS) para a detecção e quantificação de solventes em traços de canetas esferográficas.

2.2.2 Estabelecer a cinética de envelhecimento de tintas de diversas marcas e modelos de canetas esferográficas azuis e pretas, aplicadas em traços efetuados em diversos tipos de papéis utilizados comumente em escritórios, com especial atenção a evaporação dos solventes, utilizando a técnica descrita no item 2.2.1, de forma comparativa, pelo período aproximado de 3 anos, buscando traçar um perfil de envelhecimento relacionado às condições climáticas do Brasil, marcas de canetas usadas no país e características do papel de suporte.

2.2.3 Estabelecer metodologia de análise de corantes de tintas de diversas marcas e modelos de canetas esferográficas, como BIC, Compactor, Paper Mate, Staedler, Uni, Stabilo, Pilot, entre outras, aplicadas em diversos tipos de papéis comerciais, utilizados comumente em documentos, utilizando técnicas de alta resolução, como Espectrometria de Captura de Íons de alta resolução (ESI-ORBITRAP).

2.2.4 Otimizar metodologia de detecção de substâncias presentes em extratos vegetais como chá-preto ou café, especialmente cafeína, utilizados para envelhecimento artificial de papéis, utilizando GC/MS.

2.2.5 Realizar análise em Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier com Acessório de Refletância Atenuada (ATR-FTIR), de traços de canetas azuis e pretas de diversas marcas e modelos, bem como de diferentes períodos de envelhecimento, buscando identificar diferenças ou semelhanças entre as diversas formulações buscando desenvolver metodologia de diferenciação por idade de aposição dos lançamentos de caneta em diferentes tipos de papéis.

2.2.6 Aplicação de Análise Estatística Multivariada para diferenciação de diversas formulações de canetas a partir do perfil de corantes e pigmentos identificados pelas massas exatas obtidas na Espectrometria Captura de Íons de alta resolução (ESI-ORBITRAP), bem como para diferenciar as canetas por data e formulação através dos espectros de Infravermelho obtidos, conforme citado no item 2.2.5.

---

### **3. REVISÃO DO TEMA**



A composição química quali e quantitativa de qualquer tinta depende de sua função. Como os instrumentos escritores podem ser de vários tipos, tais como canetas esferográficas, *rollerballs*, canetas gel, canetas tinteiro, dentre outras, o mecanismo de aposição e distribuição da tinta no papel demandam propriedades específicas da massa de tinta. Como exemplo, a tinta das canetas esferográficas é viscosa, de modo a conter altas concentrações de corantes orgânicos, enquanto a tinta das canetas *rollerballs* ou ponta porosa são fluidas. Os componentes líquidos são coletivamente denominados de veículos e podem incluir óleos (minerais, vegetais ou ambos), solventes (qualquer solvente orgânico ou água) e resinas (naturais ou sintéticas) (ZLOTNICK e SMITH, 1999). Os solventes são líquidos (ou mistura de líquidos) usados para solubilizar ou dissolver a resina e manter todos os componentes da tinta sob a forma de uma mistura homogênea, com viscosidade adequada (FAZENDA, 2005).

De acordo com a literatura, uma das substâncias voláteis encontrada na maioria das canetas esferográficas utilizadas no mundo todo, é o 2-FE (2-fenoxietanol) (LA PORTE *et al.*, 2004; WEYERMANN *et al.*, 2007a; BÜGLER *et al.*, 2008; WEYERMANN *et al.*, 2011), sendo este solvente um dos mais utilizados pelas suas propriedades químicas, que favorecem boa diluição e miscibilidade dos corantes, resinas e pigmentos inseridos na formulação das canetas, ao mesmo tempo em que apresenta evaporação rápida e evita o “sangramento” da tinta durante a aplicação no papel. Os principais solventes utilizados em canetas esferográficas são propilenoglicol, 2-FE, etoxietanol, fenoxietoxietanol, álcool benzílico, etilenoglicol, hexilenoglicol, etoxietoxietanol, anidrido ftálico, entre outros (BRUNELLE e CRAWFORD, 2003; BRAZEAU e GADREAU, 2007; FURLAN, 2008).

A avaliação de certos componentes do documento que se modificam com o tempo é uma abordagem dinâmica e existem diversos métodos na literatura que medem a dinâmica do processo de envelhecimento (BRAZEAU e GAUDREAU, 2007). Os mais comuns são os que avaliam a degradação dos corantes e a evaporação de solventes. A tabela 01 apresenta um resumo cronológico dos principais artigos relacionados com os métodos até o momento desenvolvidos para a determinação da idade e a diferenciação de tintas de canetas visando a datação de documentos.

Tabela 1. Resumo cronológico das publicações sobre o tema.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Caneta Esferográfica	Extração com metanol	2-Fenóxi-etanol	CG	Comparar uma parte da tinta envelhecida artificialmente com outra parte da mesma tinta não submetida ao envelhecimento, com determinação da quantidade de 2-FE presente nos dois casos.	Muitos dos componentes voláteis da tinta irão evaporar nos primeiros minutos de sua aplicação no papel, sendo esta perda em torno de 90%.	Stewart, 1985.
Tinta de Caneta Esferográfica	Clorofórmio e Carbono tetrachloride	Solventes e Corantes	CG/EM e CCD	Comparar dois métodos de datação de tintas: o primeiro por meio do estudo de evaporação dos solventes das tintas e o segundo por meio da degradação dos corantes da tinta, ambos medidos por um coeficiente de extração de substâncias, em função da idade da tinta.	A variação que se observa entre traços antigos e recentes é a redução do solvente extraído da resina do traço antigo, comparada à maior quantidade de solvente extraída da resina do traço recente. Os corantes, entretanto, são facilmente extraíveis das lâminas superficiais das linhas de tinta, não importando a idade.	Aginsky, 1998.
Tinta de Caneta Esferográfica	Exposição à luz	Corantes	HPLC	Monitorar as mudanças na composição da tinta de canetas esferográficas em documentos armazenados no escuro e comparar com os resultados de outro estudo publicado.		Andrasko <i>et al.</i> , 2001.



<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Caneta Esferográfica Azul	Sem preparo	Tinta Total	Espectroscopia por FTIR	Analisar a tinta de 108 canetas por espectroscopia de FTIR, para avaliar a eficácia do método na datação de tintas.	O método se provou eficaz na análise de tintas de canetas azuis.	Wang <i>et al.</i> , 2001.
Tinta de Caneta Esferográfica Azul e Preta	Sem preparo	Corantes	LDI-MS	Calcular o peso molecular médio dos corantes, em função da idade da tinta. Quanto mais antigo o corante, menor o peso molecular dele.	Observou-se influência do tipo de papel e da formulação da tinta nas análises.	Grim <i>et al.</i> , 2002a.
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis, Pretas e vermelhas	Extração com álcool benzílico	Tinta Total	ESI-MS	Analisar o perfil de corantes nas formulações das tintas das diferentes canetas	ESI-MS mostrou ser um método simples e rápido para comparar amostras de tintas de canetas	Ng, Lay Keog <i>et al.</i> , 2002.
Tinta de Caneta Esferográfica	Extração com Metanol	Corantes	HPLC	Verificar a idade das tintas com a quantificação de corantes e sua degradação.	É possível determinar a idade relativa da tinta, desde que o armazenamento e o material de suporte sejam os mesmos para diferentes amostras.	Hofer, 2004.
Tinta de Caneta Esferográfica Bic e Staedtler	Extração com clorofórmio/piridina/MSTFA	Solventes	CG/EM	Verificar a possibilidade de determinar a datação de tinta através de curvas de evaporação dos solventes.	Não foram obtidos resultados conclusivos.	Lociciro <i>et al.</i> , 2004.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis e Pretas		2-Fenóxietanol	CG/EM	Determinar a quantidade de 2-Fenóxietanol nas composições de tintas de canetas.	O 2-Fenóxietanol foi identificado em 85% (273/289) e 83% (293/354) das canetas pretas e azuis, respectivamente.	Laporte <i>et al.</i> , 2004.
Tinta de Caneta Esferográfica	-	Corantes	LDI-MS	Elucidar a estrutura dos corantes de tintas e relacionar com a sua idade.	A técnica se mostrou efetiva para a caracterização de corantes de tintas.	Siegel <i>et al.</i> , 2005.
Tinta de Caneta Esferográfica	Extração com metanol	Solventes e Corantes	HPLC	Estudar a diferença na composição das tintas das canetas, comparando a tinta dentro do cartucho e após a escrita no papel.	Não houve envelhecimento dos corantes das tintas, comparando-se uma amostra de dentro do cartucho da caneta com uma amostra de um traço escrito no papel com mais de 6 anos de idade. A proporção de solvente diminui em relação à proporção do corante, que se mantém a mesma.	Andrasko e Kunicki, 2005.
Tintas e outros compostos de interesse forense	Sem preparo	Tinta Total	UV-Vis e IR	Investigar o perfil químico de compostos de interesse forense.	As técnicas estudadas apresentam um grande poder de discriminação das amostras e apresentam expectativa de uso no futuro da ciência forense.	Payne <i>et al.</i> , 2005.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Caneta Esferográfica	Calor	Resinas e solventes.	Dessorção Térmica seguida de CG/EM	Propor novo método de análise química de solventes e resinas de tintas de caneta.	Boa discriminação das canetas por essa técnica. Perspectiva de montar um banco de dados desses componentes das canetas.	Bugler <i>et al.</i> , 2005.
Tinta de Canetas Esferográficas Vermelhas	Aplicação direta em placas de CCD	Corante rodamina	CCD com ESI-Ion Trap triplo quadrupolo	Testar o método de ESI-Ion Trap aplicado para identificar corantes das tintas de canetas separados por CCD	A análise de extratos de tinta vermelha cromatograficamente separados demonstrou o potencial deste sistema de espectrometria de massa de eletropulverização de amostragem de superfície para análise de compostos direcionados com amostras reais	Ford <i>et al.</i> , 2005.
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis	Extração com etanol, TFE, fenóxietanol e ethoxyethoxyetanol:dipropylene glycol, 1:2.	Corantes metil-violeta e etil-violeta	LDI/MS e MALDI/MS	Caracterização da degradação dos corantes.	As condições de armazenamento do documento e as concentrações iniciais dos corantes nas tintas precisam ser conhecidas para a correta interpretação dos resultados.	Weyerman <i>et al.</i> , 2006.
Tinta de Canetas	SMPE, Temperatura Alta (200°C)	Solventes	Dessorção Térmica/CG	Desenvolver um método simples e barato para realizar a dessorção térmica de lançamentos em manuscritos.	Método validado com algumas limitações (como o tamanho da amostra).	Andrasko <i>et al.</i> , 2006.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tintas de Canetas azuis e pretas, esferográficas e gel	Sem preparo	Tinta Total	Espectrometria por Micro-FTIR, Espectrometria Raman; Difração de Raio-X	Avaliar a eficácia da diferenciação de tintas de canetas por métodos espectrométricos.	90% das canetas de mesmo tipo e cor puderam ser diferenciadas.	Zieba-Palus & Kunicki, 2006.
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis	Extração com acetonitrila e uso direto do traço no papel	Tinta total	HPLC-PDA Infravermelho com ATR	Classificar e diferenciar canetas azuis através de HPLC e Infravermelho com ATR, usando técnicas de Estatística Multivariada como PCA e LDA	HPLC associado a quimiometria mostrou grande poder de discriminação, melhor que o Infravermelho. PCA e LDA mostraram ser complementares uma a outra e que auxiliam o Infravermelho a uma melhor diferenciação	Kher <i>et al.</i> , 2006.
Tinta de canetas pretas de gel	Acetonitrila:tampão tetrabutilamônio 40 mmol/L (1:1)	Tinta Total	Ion Pairing – HPLC de fase reversa	Classificar e datar canetas pretas de gel com formulação a base de corantes e de pigmentos através de Ion Pairing - HPLC	O método foi capaz de diferenciar a maioria das canetas e identificou decomposições de alguns corantes com a exposição a luz que pode ser usado para datação	Liu, Yi-Zi <i>et al.</i> , 2006.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Canetas Esferográficas, Gel e Fluidas	Sem preparo	Corantes	DART-MS	Diferenciação de tintas usadas em canetas.	A análise direta dos manuscritos é vantajosa por não necessitar preparação ou extração da amostra, entretanto, as técnicas ambientais possuem uma limitação que gera uma grande dificuldade nas análises, que é a variação entre as repetições de uma mesma amostra.	Jones & McClelland, 2006.
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis	DCM	2-Fenóxi-etanol (FE)	CG/EM	Quantificação de 2-FE basal em lançamentos manuscritos de canetas esferográficas	As quantidades basais de solventes presentes na formulação das canetas divergem significativamente.	Weyerman <i>et al.</i> , 2007a.
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis	Extração com metanol.	Corantes	TLC e LDI-MS	Comparar as técnicas de TLC e LDI-MS com HPTLC, para diferenciação de tintas azuis.	Somente corantes básicos e pigmentos foram identificados por LDI-MS. HPTLC acrescenta maiores informações sobre corantes ácidos.	Weyerman <i>et al.</i> , 2007b.
Tinta de Canetas Esferográficas	Extração com solução de 9-aminoaridina em metanol	Corantes	MALDI-TOF	Avaliar a utilidade da técnica de MALDI-TOF para a identificação de corantes e pigmentos de tintas de caneta.	MALDI-TOF é uma técnica rápida, versátil e confiável para a identificação de corantes.	Soltzberg <i>et al.</i> , 2007.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Canetas Esferográficas Pretas	SPME	2-Fenóxietanol (FE)	CG-EM	Avaliar a técnica de microextração dos solventes para monitorar a evaporação dos componentes voláteis das tintas de canetas aplicadas em papel.	Os componentes voláteis das tintas de canetas do papel podem ser quantificados pela técnica de SPME.	Brazeau & Gaudreau, 2007.
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis	Sem preparo	Corantes	DESI-MS	Realizar a análise química direta de tintas de canetas através da técnica de DESI-MS.	Foram demonstradas aplicações da técnica de DESI-MS na análise de tintas de canetas.	Ifa <i>et al.</i> , 2007.
Tinta de Canetas Esferográficas	Extração com acetonitrila	2-Fenóxietanol (FE)	CG/EM	Desenvolvimento de uma metodologia para a datação de tintas.	Conclui que a quantificação do 2-fenóxietanol é útil para a datação de tintas.	Furlan <i>et al.</i> , 2008.
Tinta de Canetas Esferográficas	Dessorção Térmica	2-Fenóxietanol (FE)	CG/EM	Descrever a aplicação da dessorção térmica na datação de tintas de canetas.	Foi provado que a quantidade de solvente que evapora da tinta aplicada no papel, em uma certa temperatura, é dependente da idade.	Bugler <i>et al.</i> , 2008.
Tinta de Canetas Esferográficas	Dessorção Térmica	2-Fenóxietanol (FE)	CG/EM	Descrever uma variação do método de dessorção térmica estudado por Bugler <i>et al.</i> , 2008.	Resultados satisfatórios.	Berger-Karin, 2008.
Tinta de Canetas Esferográficas de diversas cores	Extração com etilacetato, etanol e água	Corantes	LD-MS	Caracterizar diversos pigmentos e corantes de tintas de caneta através da técnica de LD-MS.	LD-MS se mostrou uma técnica eficaz na identificação de corantes.	Papson <i>et al.</i> , 2008.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis e padrão de corante Azul Cristal Violeta	Preparo apropriado para a técnica MALDI Traços mantidos no escuro e na luz	Corantes	MALDI –TOF-MS LDI-TOF-MS	Avaliar a degradação de padrões de corantes e de tintas de canetas esferográficas com envelhecimento natural, no escuro e induzido	Com a ajuda dos métodos espectrométricos e espectroscópicos foi possível ganhar um melhor entendimento da degradação do corante crista violeta	Weyermann <i>et al.</i> , 2009.
Tinta de Canetas pretas Esferográficas De gel e rollerballs	Teste de Extração com metanol, etanol e álcool benzílico	Corantes	ESI-MS	Comparar os diferentes tipos de canetas com relação a composição de corantes utilizando três métodos de ionização	Foi possível diferenciar bem as canetas com pouca destruição da amostra e identificar inclusive os íons dos corantes e veículos	Williams <i>et al.</i> , 2009.
Tinta de Canetas Esferográficas	Sem preparo	Corantes	TOF-MS	Determinar do perfil de degradação de corantes em traços de canetas.	A técnica de TOF-MS se mostrou capaz de analisar tintas contendo misturas de corantes, inicialmente separados por cromatografia.	Coumaros <i>et al.</i> , 2009.
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis	Sem preparo	Corantes	TOF-SIMS	Avaliar a técnica de TOF-SIMS para a diferenciação de tintas de canetas.	O método se mostrou eficaz na diferenciação de tintas de canetas, sendo um método rápido e eficaz.	Denman <i>et al.</i> , 2010.
Tinta de Canetas Esferográficas	Sem preparo	Corante Violeta Básico-3	EASI-MS	Estudaram a habilidade da técnica de EASI-MS para estabelecer perfil químico de tintas e também o envelhecimento das tintas.	Os autores estabeleceram um perfil de corantes característico para diferentes tintas.	Lalli <i>et al.</i> , 2010.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Corante Cristal Violeta	Solução aquosa	Corante	HPLC-PDA LC-MS	Estudar o processo de degradação do corante sob irradiação ultravioleta	HPLC-PDA associado a LC-MS permitiu detectar os produtos de degradação do Cristal Violeta	Confortin <i>et al.</i> , 2010
Tintas utilizadas na impressão de documentos veiculares brasileiros	Sem preparo	bis(2-ethylhexyl)phthalate plasticizer	EASI-MS	Estudos do perfil das tintas utilizadas na impressão de documentos veiculares brasileiros verdadeiros e falsificados, visando a diferenciação dos mesmos	Foi detectada uma rápida e clara distinção entre os documentos.	Romão <i>et al.</i> , 2011.
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis	Sem preparo	Tinta Total	UV-Vis, IR, HPTLC	Avaliar o potencial do uso de PCA na análise forense de tintas azuis, usando as técnicas de UV-Vis, IR e HPTLC.	Os resultados mostram que o espectro de UV-Vis é efetivo e uma boa ferramenta para diferenciar tintas de canetas azuis, melhor do que IR e HPTLC.	Senior <i>et al.</i> , 2012.
Tinta de canetas esferográficas azul, preta e violeta	Extração com o eluente cromatográfico	Corantes	HPLC com detector de DAD e MS	Verificar a degradação de corantes por HPLC para datação de traços de canetas	O método de HPLC auxiliou a caracterização das canetas pela composição das tintas e a indicação de um processo de envelhecimento das tintas	Freidenfelds <i>et al.</i> , 2012
Tintas de Canetas Esferográficas e de Impressoras	Sem preparo	Tinta Total	Espectroscopia de Raman	Demonstrar o potencial da técnica de espectroscopia de Raman através de uma revisão de sua aplicação na análise de tintas de canetas e impressoras.	A técnica de Espectroscopia de Raman tem um grande potencial na análise de documentos questionados.	Braz <i>et al.</i> , 2013.



<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Canetas Esferográficas e Gel Azuis	Sem preparo	Tinta Total	IR	Propor um método analítico baseado na espectroscopia do infravermelho, para classificar diferentes tintas de canetas diferentes (gel, esferográfica), bem como de diferentes marcas.	A espectroscopia de infravermelho, associada com análise linear discriminante, usando os algoritmos SPA, GA e SW, foi aplicada com sucesso para a classificação de canetas pelo tipo (gel, esferográfica) e também por marca.	Silva <i>et al.</i> , 2013.
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis e Pretas	Extração com metanol	2-Fenóxi-etanol (FE)	CG (Detecção por Ionização de Chama)	Verificar se as canetas mais comumente utilizadas no Brasil possuem ou não semelhantes concentrações basais de 2-fenoxietanol na sua formulação.	As canetas analisadas apresentaram diferença nas concentrações iniciais de 2-fenoxietanol e canetas pretas apresentam teores mais homogêneos entre si do que as canetas azuis.	Carvalho, 2014.
Tinta de Canetas Esferográficas Diversas cores	Sem extração análise direto no papel	Tinta total	Micro-ATR-FT-IR	Utilizar os dados espectrais de 63 canetas esferográficas para montar um banco de dados	Análises realizadas para testar o banco de dados formado apresentaram alto índice de identificação positiva.	Nam <i>et al.</i> , 2014.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Canetas Esferográficas Pretas	Sem preparo	Tinta Total	HSI-NIR com análise multivariada	Usar a técnica de HSI-NIR e análise multivariada para identificar 3 diferentes tipos de adulterações em documentos suspeitos.	A técnica apresenta um excelente potencial para detecção de fraudes em documentos.	Silva <i>et al.</i> , 2014.
Tinta de Caneta Esferográfica	Clorofórmio com PE-D2	2-Fenóxietanol (FE)	CG/EM	Comparar quatro parâmetros de envelhecimento de tintas (quantidade de FE na linha, RPA, R% e R%*), para estudar a diminuição dos solventes na tinta, bem como testar três fatores de influência (composição da tinta, armazenamento e pressão da escrita) no processo.	O cálculo de RPA se mostrou o parâmetro mais promissor para a datação de tintas. Os três fatores testados mostraram influência na datação de tintas.	Koenig <i>et al.</i> , 2015a.

Amostra	Preparo de Amostra	Composto	Técnica/Detector	Objetivo	Conclusão	Autor/Ano (Referência)
Tinta de Caneta Esferográfica	Extração por Clorofórmio com PE-D2	2-Fenóxietanol (FE)	Dessorção Térmica (TD)+ CG/EM	Avaliar a implementação de TD-CG/EM Bugler <i>et al.</i> (2008), bem como critérios de validação, curvas de envelhecimento e interpretação de resultados.	Resultados comparáveis aos de Bugler <i>et al.</i> (2008). Estudaram também a mesma tinta em dois papéis brancos diferentes com gramaturas baixas (80 g.m <sup>2</sup> ), Xerox Business e Xerox Performer. Mesmo sendo o mesmo peso e cor de papel, os valores relacionados ao Xerox Business foram ligeiramente superiores aos do Xerox Performer.	Koenig <i>et al.</i> , 2015b.
Tinta de Caneta Esferográfica Bic	Extração múltipla <i>headspace</i> – microextração em fase sólida (MHS-SPME)	Solventes	CG/EM	utiliza a extração <i>headspace-SPME</i> de forma fracionada sequencial de uma mesma amostra, calculando a quantidade total de analito de uma extração completa. Cada analito vai apresentar um fator calculado, chamado de $\beta$ , que depende da matriz da amostra e das condições de extração estabelecidas.	Verificaram que com essa técnica é possível determinar a idade de inscrições com mais de cinco anos.	San Román <i>et al.</i> , 2015

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
Tinta de Caneta Esferográfica Azul	Extração com metanol	Corantes	Orbitrap	Identificação de corantes e tintas de canetas esferográficas azuis.	Os resultados mostraram que o método estabelecido pode detectar e identificar corantes de tintas de canetas azuis.	Sun <i>et al.</i> , 2016
Tinta de Canetas Esferográficas Vermelhas	Sem extração, análise direto no papel	Tinta total	ATR-FT-IR TOF-SIMS	Diferenciar as canetas pelos espectros de Infravermelho e determinar a sequência de impressão (toner x canetas)	Os métodos foram efetivos porque permitiram a identificação das canetas e a sequência de impressão	Lee <i>et al.</i> , 2016.
Tinta de Caneta Esferográfica	Extração com metanol	Solventes e Corantes	CG/EM e cromatografia líquida de alta pressão com detecção photodiode (HPLC-DAD)	Quantificação de 17 solventes e 13 corantes em tintas de duas canetas de uma única marca (azul e preta), monitoradas mensalmente por 45 meses, para determinar a variação na concentração dos compostos ao longo do tempo	Com os dados das concentrações desses compostos obtidos, foi desenvolvido um método estatístico de regressão multivariada que permite estimar o tempo que a tinta se encontra no papel.	Diaz-Santana <i>et al.</i> , 2017
Tinta de Canetas Esferográficas Azuis	Sem extração Análise direto no papel	Tinta Total	FT-IR com ATR HPTLC Estatística Multivariada	Diferenciar e caracterizar tintas de canetas utilizando os espectros e separação por HPTLC tratados por estatística multivariada	A estatística multivariada aplicada aos espectros e o Poder de Discriminação aplicado a HPTLC foram uteis para a caracterização das canetas	Sharma e Kumar, 2017.

<b>Amostra</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Técnica/Detector</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Autor/Ano (Referência)</b>
25 tipos diferentes de tintas de caneta esferográfica	Extração com clorofórmio	2-fenóxietanol	CG/EM	Avaliação de sete parâmetros de envelhecimento: a quantidade de fenoxietanol, áreas de pico relativas (RPA), três razões de perda de solvente (R%, R% *, NR%) e dois parâmetros de perda de solventes (RNORM, NRNORM).	Resultados de envelhecimento das amostras analisadas Discussão do uso destes parâmetros na prática legal.	Koenig e Weyermann, 2018.
Seis diferentes canetas esferográficas azuis e pretas	Extração com metanol	Solventes (entre eles 2-fenoxietanol) e corantes	CG/EM HPLC/DAD Envelhecimento artificial	Comparação dos resultados fornecidos pelos principais métodos de datação de canetas	Os resultados mais aplicáveis e confiáveis foram obtidos com métodos combinados de análise de razão de solventes por corantes componentes da formulação	Diaz-Santana <i>et al.</i> , 2018

O primeiro pesquisador a publicar um método relacionando o conteúdo de solventes com a idade do lançamento a caneta foi Stewart (1985). Utilizando uma técnica de envelhecimento acelerado, se compara uma parte da tinta envelhecida artificialmente com outra parte da mesma tinta não submetida ao envelhecimento, com determinação da quantidade de 2-FE presente nos dois casos. Esta técnica elimina a necessidade de se conhecer a formulação específica de cada caneta, uma vez que compara a caneta com ela mesma. Muitos dos componentes voláteis da tinta irão evaporar nos primeiros minutos de sua aplicação no papel, sendo esta perda em torno de 90%. Após um período de tempo, que costuma ser de um a dois anos, a quantidade de solventes, notadamente o 2-FE, se estabiliza (EZCURRA e GRÁVALOS, 2012).

Um problema envolvendo medidas do conteúdo de solventes de uma tinta no papel é justamente a quantidade de tinta que é aposta, que é desconhecida (CANTU, 1996). Bügler (2008), citando Stewart e Fortunato (1996), afirma que para resolver este problema, deve-se fazer a razão entre o conteúdo de solvente com ponto de ebulição baixo e o conteúdo de solvente com ponto de ebulição relativamente mais alto, na mesma amostra. Lociciro e colaboradores (2004) em estudo semelhante, utilizaram um composto desconhecido que foi verificado ser estável com o tempo e estava presente na mesma amostra, concluindo que era impossível determinar o conteúdo de 2-FE por esta técnica, pois após algumas horas, a diminuição do solvente foi inferior ao erro experimental (BÜGLER *et al.*, 2008; LOCICIRO *et al.*, 2004).

De acordo com Cantu (1996), após a aposição de um lançamento gráfico manuscrito com caneta esferográfica, compostos voláteis utilizados como solventes na formulação iniciam o processo de evaporação (que é insignificante no interior do invólucro da caneta, por esta ser um sistema fechado), o qual faz com que a tinta se fixe no papel onde foi colocada. Isto representa o início do envelhecimento da tinta da caneta e a dinâmica deste processo é proporcional ao tempo em que esta tinta permanece no papel, até o momento em que absolutamente todos os compostos voláteis deixam de estar presentes na composição química da tinta aposta no papel, restando somente os demais compostos menos voláteis. Muitas vezes canetas que já estão sem uso durante algum tempo apresentam dificuldade em reiniciar a descarga de tinta pela esfera, e necessitam de fricção da ponta para que isto ocorra. Isto é devido a uma pequena evaporação na ponta aberta da caneta, formando um filme de resina sobre a esfera, que é o que veda a evaporação dos solventes (CANTU, 1996).

Andrasko e Kunicki (2005) verificaram que mesmo ocorrendo esta vedação, a secagem do solvente na extremidade do cartucho reservatório (próximo a ponta da caneta) faz com que o teor de solvente liberado seja menor para canetas reutilizadas após muito tempo sem uso, do que para canetas que possuem um uso contínuo. Degradação dos corantes neste caso também foi observada (ANDRASKO e KUNICKI, 2005).

Como a formulação das tintas é muito importante no processo de evaporação dos solventes, conhecer também a quantidade inicial de solvente é fundamental para a análise, sendo que alguns tipos de resinas (acetofenona-formaldeído) mantêm mais tempo a concentração de 2-FE (tintas de envelhecimento lento). Isto demonstra que o tipo de resina (e também a formulação da tinta) é um dos principais parâmetros que afetam a dinâmica de envelhecimento das esferográficas (BÜGLER *et al.*, 2008).

A quantidade inicial do solvente aposta no traço é dependente da pressão da escrita e do tamanho da esfera da caneta, pois isto influencia na profundidade e largura do traço, liberando mais ou menos 2-FE, além do que existem diferenças no conteúdo relativo de 2-FE entre diferentes tipos de tintas de esferográficas. Alguns autores tentaram minimizar este problema trabalhando com a razão entre as concentrações de dois compostos diferentes no mesmo lançamento a caneta. Na prática, é impossível garantir a homogeneidade da tinta aplicada no papel, assim a datação só será possível se os erros provocados pelas diferenças de quantidades de 2-FE devido aos fatores acima comentados forem menores do que as reais diferenças de quantidade de 2-FE devido ao envelhecimento (WEYERMANN *et al.*, 2011).

Em 2014, Carvalho analisou a concentração inicial (primeira aplicação no papel) de 2-FE em traços de canetas esferográficas azuis e pretas, verificando que existem diferenças nas concentrações iniciais de 2-FE entre algumas marcas de canetas. Isso já seria esperado, uma vez que as características tecnológicas, desejadas pelo fabricante para cada modelo de caneta, exigem diferentes formulações de corantes, resinas e outros adjuvantes, o que modificaria a quantidade utilizada de solvente, para promover a viscosidade ideal da tinta (CARVALHO, 2014).

Duas publicações versando sobre a quantificação de 2-FE em lançamentos manuscritos de canetas esferográficas também verificaram que as quantidades basais de solventes presentes na formulação das canetas divergiam significativamente. Ambos estudos identificaram 2-FE em mais de 80% das canetas estudadas (LA

PORTE et al., 2004; WEYERMANN et al., 2007a). Já em um estudo mais recente, Koenig e Weyermann não identificaram diferença estatística nas concentrações iniciais de 2-FE entre as canetas estudadas (KOENIG e WEYERMANN, 2018). Bügler e colaboradores (2008) também afirmam que existe uma variação significativa no conteúdo de solventes em tintas da mesma idade, mas de fabricantes diferentes. Uma proposta que estes autores fazem para resolver este problema é a determinação da formulação possível da tinta em questão para obter dados sobre sua composição e comportamento de envelhecimento. Estes mesmos autores também concluem que mesmo assim, não parece ser efetivo derivar conclusões sobre datação de tintas baseada na quantidade absoluta de 2-FE. A determinação relativa dos solventes pode ser uma boa resposta para estes questionamentos (BÜGLER *et al*, 2008).

Um dos fatores geralmente negligenciado, mas que é de grande importância na determinação da quantidade de 2-FE, é o papel de suporte de um documento. Apesar disto, os autores ainda não estão de acordo com a influência do tipo de papel na datação de uma tinta: Weyermann e colaboradores (2011) afirmam que Aginsky (1998) relatou que a influência do papel seria insignificante na análise de tinta de caneta, enquanto Bügler e colaboradores (2008) teriam declarado a existência de uma importante dependência do tipo de papel. San-Román *et al.* (2015) também menciona o efeito da porosidade e densidade do papel, bem como das fibras e da química da polpa do papel, no comportamento dos solventes das tintas. De acordo com Aginsky (1998), papéis de diferentes composições absorvem quantidades significativamente diferentes de um corante, e a razão para isso é que a capacidade do papel para absorver corantes de tinta depende fortemente de sua composição de fibras: quanto maior o conteúdo de polpa de madeira no papel, maior a sorção de corante. No entanto, Aginsky está se referindo aos corantes, e não aos solventes. Portanto, a verificação da existência de influência do papel tanto na extração e detecção dos solventes, quanto no próprio processo de evaporação e, deste modo, de envelhecimento da caneta, deve ser realizada, para se evitar erros de conclusão na datação de documentos. Recentemente, Koenig e colaboradores (2015b) também se preocuparam com a influência do papel no envelhecimento das canetas esferográficas, visando a evaporação do solvente. Eles estudaram a mesma tinta em dois papéis brancos diferentes com gramaturas baixas (80 g.m<sup>2</sup>), Xerox Business® e Xerox Performer®. Mesmo sendo o mesmo peso e cor de papel, esses autores



encontraram um pequeno efeito sobre os valores, já que os relacionados ao Xerox Business® foram ligeiramente superiores aos do Xerox Performer®.

A degradação dos corantes também tem sido estudada como um indicador da idade de um lançamento com caneta esferográfica. A observação de que os corantes, após algum tempo de aplicação da tinta da caneta no papel, sofriam degradação, levou à tentativa de associar a dinâmica de degradação ao envelhecimento dos manuscritos (CHEN *et al.*, 2002).

Andrasko (2001) foi um dos primeiros cientistas forenses que monitorou as mudanças na composição da tinta de canetas esferográficas em documentos armazenados no escuro e comparou com os resultados de outro estudo publicado, onde o mesmo autor observou o comportamento sob iluminação. Grim e colaboradores (2002), também foram pioneiros, avaliando a degradação dos corantes no interior dos cartuchos, através do exame da tinta presente em canetas com mais de 20 anos. Em muitos casos, a tinta foi suficientemente estável para se considerar que não há envelhecimento dentro do cartucho, entretanto algumas canetas demonstraram envelhecimento maior do que se a tinta tivesse sido aposta em um documento (ANDRASKO, 2001; GRIM *et al.*, 2002b).

Alguns autores mencionam que a análise da degradação dos corantes das tintas de canetas esferográficas pode ser mais efetiva que a análise dos solventes pelo fato de que os corantes oferecem uma degradação mais lenta, enquanto que os solventes evaporam muito rápido e em pouco tempo estabilizam a evaporação. Outros afirmam que no caso dos corantes, estes seriam estáveis, não sofreriam oxidação no interior do cartucho da caneta por não ter contato com o ar (HOFER, 2004). Os principais corantes componentes da formulação das canetas são cristal violeta (*basic violet 3*), metil violeta (*basic violet 1*), etil violeta (*basic violet 4*), Victoria Blue B (*basic blue 26*), Victoria Blue BO (*basic blue 7*), Rodamina B (*basic violet 10*), diversas aril guanidinas, ftalocianinas de cobre e derivados (WEYERMANN *et al.*, 2007b; LALLI *et al.*, 2010; IFA *et al.*, 2007).

Já é sabido que os métodos cromatográficos e espectrométricos têm extenso uso nas ciências farmacêuticas, especialmente na toxicologia forense. A seguir serão abordados alguns métodos descritos na literatura utilizando a técnica de detecção por Espectrometria de Massas (EM) para a determinação da idade de uma tinta. Esta

técnica é capaz de analisar misturas complexas, separando e analisando compostos orgânicos da tinta (FURLAN, 2008).

A EM vem sendo cada vez mais utilizada na análise de solventes de canetas, embora a detecção utilizando Detector de Ionização de Chama (DIC), utilizada juntamente com a Cromatografia Gasosa, é a que apresenta uma melhor repetitividade e reprodutibilidade em termos de quantificação de substâncias quando comparado à detecção por EM (WEYERMANN *et al.*, 2011). Em 2005, Bügler, Buchner e Dallmayer descreveram a aplicação da técnica de dessorção térmica seguida de CG/EM para datar tintas de canetas esferográficas. A proporção da quantidade de compostos voláteis dessorvidos à baixa temperatura (70 °C por 20 min) pela proporção de compostos voláteis dessorvidos em alta temperatura (200 °C por 5 min) foi estabelecida como a determinação da idade do lançamento à caneta estudado. Andrasko (2006, 2007) desenvolveu um método barato e simples para realizar a dessorção térmica dos solventes em lançamentos manuscritos, utilizando uma seringa própria para análise por SPME (Micro-extração em fase sólida), entretanto sem a fibra de absorção, expondo o papel com o manuscrito diretamente no injetor do CG.

Brazeau e Gaudreau (2007) fizeram uso da técnica de SPME para a análise de tintas de canetas esferográficas, entretanto, a seringa foi utilizada com a fibra de absorção e criou-se um aparato que não destruía o documento, e realizava a dessorção térmica dentro de um frasco de vidro especial para injeção em CG/EM e os compostos voláteis eram concentrados na fibra de absorção e dessorvidos no interior do injetor do cromatógrafo, com posterior separação em coluna cromatográfica. Berger-Karin e colaboradores (2008) realizaram uma dessorção térmica fracionada em três etapas, utilizando temperaturas de 100 °C por 15 min, 140 °C por 15 min e 200 °C por 10 min, em amostras submetidas ao envelhecimento artificial acelerado ou envelhecimento normal, obtendo resultados bastante satisfatórios (EZCURRA *et al.*, 2010).

Weyermann e colaboradores (2007a), baseando-se nos trabalhos de Aginsky (1996, 1998), bem como Furlan (2008) também efetuaram a determinação de 2-FE, fenoxietoxietanol e dipropilenoglicol utilizando a técnica de CG/EM, entretanto a forma de obtenção do conteúdo volátil da tinta das canetas foi por extração com solvente, utilizando um padrão interno de concentração determinada para validação da quantificação. Lociciro e colaboradores (2004) também realizaram a extração com

solvente, com subsequente derivatização dos compostos voláteis com MSTFA (metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) (WEYERMANN *et al*, 2007a; AGINSKY, 1996, 1998; FURLAN, 2008).

Weyermann e colaboradores (2011), descrevem dois métodos de análise de envelhecimento de tintas, sendo um deles baseado na taxa de evaporação/diminuição da concentração de solventes e outro na taxa de diminuição da extratibilidade de solventes. De acordo com Cantu (1996), Aginsky utilizou CG/EM para caracterizar a tinta, identificar os componentes voláteis e assegurar que as tintas em comparação possuíam os mesmos componentes (WEYERMANN *et al*, 2011; CANTU, 1996).

Koenig e colaboradores (2015a) realizaram um trabalho envolvendo datação de tintas de canetas com dessorção térmica e CG/EM. Este método, segundo estes autores, tem sido usado rotineiramente no Laboratório Criminal da Polícia Alemã (*Landeskriminalamt*), em Munique, desde 2004. Neste mesmo ano, Koenig e colaboradores (2015b) fizeram um estudo comparativo de parâmetros de envelhecimento para três tipos de tintas de canetas, acompanhando por um ano o teor de solventes através de CG/EM (KOENIG *et al.*, 2015a; 2015b).

Em 2014, Carvalho analisou, por GC/EM o teor basal de solventes presentes em canetas esferográficas comumente utilizadas no Brasil, com objetivo de verificar se a concentração inicial presente no traço era semelhante para as diversas marcas e modelos de canetas comumente utilizadas no Brasil. A conclusão a que se chegou é que as concentrações iniciais não são iguais mesmo para modelos iguais de canetas, porém de cores diferentes (azuis e pretas). Assim, na determinação de idade comparando-se dois lançamentos com canetas esferográficas de cores visualmente iguais, não é possível afirmar somente pela constatação visual que os traços provêm da mesma caneta, e sendo assim, podem ter quantidades de solventes diferentes e uma dinâmica de envelhecimento diversa. Comparar duas assinaturas nestas condições, por exemplo, poderia levar a conclusão de que foram feitas na mesma época, o que poderia não ser verdadeiro. A composição química da formulação de uma caneta é única, mesmo para canetas de modelos semelhantes, e mesmo que a degradação dos corantes não seja muito eficiente na determinação da idade da caneta, a confirmação de que um lançamento provém de caneta de mesma formulação pode ser de grande valia na determinação da idade por quantificação dos solventes (CARVALHO, 2014).

O trabalho de San Román e colaboradores (2015) utilizou a técnica de “múltipla *headspace* – microextração em fase sólida (MHS-SPME)”, que utiliza a extração *headspace*-SPME de forma fracionada sequencial de uma mesma amostra, calculando a quantidade total de analito de uma extração completa. Cada analito vai apresentar um fator calculado, chamado de  $\beta$ , que depende da matriz da amostra e das condições de extração estabelecidas. Neste trabalho, os autores partem do pressuposto que como o envelhecimento das tintas promove alterações na matriz, o fator  $\beta$  vai ser diferente de acordo com a idade de cada lançamento feito com caneta, sendo assim, efetuaram medições empíricas deste fator, verificando que é possível determinar a idade de inscrições com mais de cinco anos (SAN RÓMAN *et al*, 2015).

A análise de parâmetros de envelhecimento por evaporação de solventes da tinta da caneta, buscando-se eliminar diferenças na quantidade de tinta presente no traço, fatores ambientais e do papel, tem sido também o foco dos pesquisadores. Koenig e Weyermann (2018), testaram 25 tintas de canetas, envelhecendo durante um ano, para avaliar o potencial de uso, para fins de datação de tinta, considerando sete parâmetros de envelhecimento: a quantidade de fenoxietanol, áreas de pico relativas (RPA), três razões de perda de solvente (R%, R% \*, NR%) e dois parâmetros de perda de solventes (RNORM, NRNORM) (KOENIG e WEYERMANN, 2018).

A diminuição da quantidade de 2-FE média neste recente trabalho de Koenig e Weyermann (2018) foi modelada com um decaimento duplo exponencial, bem como a variância da quantidade que também decaiu em função do tempo. Essa abordagem estatística utilizando a regressão com duplo exponencial é baseado no modelo inicialmente proposto Locicero *et al.*(2004) e revisitado por Cantu (2012), no qual a função duplo exponencial permite que seja identificado um ponto de “inflexão”, onde a evaporação passa de rápida para lenta e constante.

Outro estudo muito recente visando a comparação dos principais métodos de datação foi realizado por Diaz-Santana e colaboradores (2018). Estes autores utilizaram canetas de marcas internacionalmente reconhecidas, como Inoxcrom®, MontBlanc®, e Sigma®, e realizaram a quantificação dos principais solventes e a identificação dos principais corantes das formulações, durante dois anos, utilizando análise por CG/EM para os solventes e HPLC/DAD para os corantes. Além da análise direta dos solventes, os autores também analisaram as concentrações usando os métodos de envelhecimento artificial, calculando a razão de perda de solvente (%) entre a amostra aquecida e a não aquecida. A conclusão a que chegaram foi que os

métodos combinados de datação onde as razões de concentração entre solventes e corantes é representada foram os mais reprodutíveis por longo período de tempo. Das canetas estudadas, os autores observaram que a evaporação do 2-FE se deu por um período de até 30 dias, e após entrou em estado de repouso mantendo razões estáveis através do tempo.

Embora alguns autores afirmem que a análise da degradação de corantes dos traços de canetas esferográficas não seja útil para a datação de documentos (AGINSKY, 1998; WEYERMANN *et al.*, 2011), inúmeros pesquisadores têm se dedicado a este assunto, com muitas publicações interessantes, com aplicação de diversas técnicas cromatográficas e espectrométricas. Weyermann e colaboradores (2006; 2007b) desenvolveram método com LDI-MS (Espectrometria de Massas por Ionização de Dessorção a Laser e MALDI-MS (Espectrometria de Massas por Ionização de Dessorção a Laser assistida com Matriz), para a análise do perfil de degradação de corantes e diferenciação de formulações diversas de canetas esferográficas (WEYERMANN *et al.*, 2006; 2007b, 2009).

A análise de corantes por Cromatografia em Papel e em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi uma das primeiras técnicas utilizadas na identificação de corantes e diferenciação de canetas, nas décadas de 1950 a 1970. Na década de 80, a técnica de CCD de Alta Performance (HPTLC) também foi utilizada, juntamente com a HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) (CHEN *et al.*, 2002; SHARMA e KUMAR, 2017). Diversos autores buscaram desenvolver métodos de HPLC que conseguissem acompanhar a degradação dos corantes, com o objetivo de datar manuscritos. Confortin e colaboradores (2010) desenvolveram estudaram a fotodegradação de corantes com HPLC-PDA e LC-MS, Liu *et al.* (2006) propuseram um métodos de classificação e datação de canetas de gel pretas por Ion-Pairing HPLC, e mais recentemente Freidenfelds e Mekss (2012) avaliaram as possibilidades de determinação da idade relativa de traços de canetas esferográficas por HPLC. Muitos autores, entretanto, tem utilizado mais para análise de corantes de canetas, a técnica de LDI-MS, com os dois objetivos principais, de diferenciar canetas e determinar a cronologia dos lançamentos gráficos (GRIM *et al.*, 2002a; GRIM *et al.*, 2002b; SIEGEL *et al.*, 2005; PAPSON *et al.*, 2008; IFA *et al.*, 2009). Em um estudo mais recente, realizado no Brasil, Lalli e colaboradores (2010), analisaram empiricamente a degradação de corantes e também aplicaram a técnica de EASI-MS (Espectrometria de Massas com Espriamento Sônico Ambiental) em documentos reais armazenados

no arquivo da Polícia Federal do Brasil, na tentativa de determinar o perfil de degradação dos corantes em documentos de datas conhecidas. Jones e colaboradores (2006) já haviam utilizado uma técnica semelhante, chamada DART (*Direct Analysis in Real Time*) para a diferenciação de tintas usadas em canetas. Ambos os estudos afirmam que a análise direta dos manuscritos é vantajosa por não necessitar preparação ou extração da amostra, entretanto, as técnicas ambientais possuem uma limitação que gera uma grande dificuldade nas análises, que é a variação entre as repetições de uma mesma amostra (JONES *et al.*, 2006). Ainda utilizando a técnica de EASI-MS, Romão e colaboradores (2012) realizaram estudos do perfil das tintas utilizadas na impressão de documentos veiculares brasileiros verdadeiros e falsificados, visando a diferenciação dos mesmos.

Um método mais simples e facilmente disponível, aplicado com sucesso para diferenciar canetas através das massas dos corantes é o ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry), nos modos positivo e negativo (Ng *et al.* 2002; Williams *et al.*, 2009). A análise por TOF-MS (Espectrometria de Massas por Tempo de Vôo) foi menos utilizada para determinação do perfil de degradação de corantes em traços de canetas, embora se trate de uma técnica com alta resolução e especificidade (SOLTZBERG *et al.*, 2007; COUMBAROS *et al.*, 2009). A utilização de análise por ION TRAP (Captura de Íons) é também pouco comum, pioneiramente Ford e colaboradores (2005) utilizaram a técnica para análise do corante rodamina, isolado da tinta de canetas vermelhas por CCD (FORD *et al.*, 2005).

Sun e colaboradores (2016) aplicaram análise por Orbitrap (Espectrometria de Massas por Captura de Íons) à identificação de corantes e tintas de canetas esferográficas azuis, embora utilizaram cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos antes do analisador de massa Orbitrap, e diferenciaram as canetas usando a Equação do Poder de Discriminação fornecida por Gallidabino (2011) e colaboradores (GALLIDABINO *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2016). Sun e colaboradores (2016) foram os primeiros autores a aplicar o Orbitrap para a diferenciação e caracterização da formulação de tintas de canetas.

Orbitrap é um novo membro dos analisadores de espectrometria de massa de alta resolução (HMRS), uma armadilha de íons eletrostática que usa a transformada de Fourier para obter espectros de massa e opera com boa sensibilidade, poder de resolução de massa elevada (até 150000) e precisões de massa na ordem de partes por milhão (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Um cromatograma ou um espectro de massas podem ser visualizados como um padrão no espaço multivariado. As amostras que exibem padrões semelhantes se agrupam e as que exibem padrões diferentes estão localizadas separadas umas das outras em um espaço multivariado. Ao se ter em mente este conceito, a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) de cada espectro de massas das tintas de canetas esferográficas podem ser usadas para diferenciar estas canetas. Kher e colaboradores utilizaram análise multivariada para discriminar os cromatogramas de HPLC de tintas de canetas esferográficas e Denman e colaboradores (2010) fizeram análise de componentes principais de espectros ToF-SIMS (Espectrometria de Massas de Íon Secundário por Tempo de Vôo) de 07 marcas diferentes de canetas esferográficas azuis, mas nenhum estudo tentou-se realizar análises multivariadas usando dados de espectros de massa provenientes de Orbitrap para classificação de canetas azuis e pretas (KHER *et al.* 2006).

A literatura também apresenta métodos de envelhecimento acelerado de documentos, visando a datação de manuscritos. Brunelle & Crawford (2003) afirmam que as tintas apostas no papel apresentam evaporação de solventes e endurecimento das resinas até mais ou menos um ano. Após este período, o endurecimento das resinas é o principal fenômeno de envelhecimento da tinta. Pelo método de extração da tinta por solventes, após a tinta estar totalmente seca (no que diz respeito às resinas) não é possível mais solubilizá-la no solvente. Para canetas com este comportamento, a idade seria em torno de cinco anos, e no que diz respeito aos solventes, que ficam aprisionados no interior da resina, após este período somente é possível detectar o resíduo de 2-FE presente na tinta utilizando altas temperaturas para sua evaporação. Desta forma, a comparação da quantidade de 2-FE evaporado de uma parte da tinta não submetida ao envelhecimento com uma parte da mesma tinta submetida ao envelhecimento com altas temperaturas, pode levar à determinação se este lançamento manuscrito é, ou não, recente. O envelhecimento acelerado, no caso deste método proposto por Brunelle e Crawford (2003), nada mais é do que simular a idade da tinta como sendo maior do que cinco anos, e comparar com outra parte da mesma caneta. Se a parte não envelhecida artificialmente não contiver mais 2-FE, certamente ela terá mais do que cinco anos de aposta. Se a parte envelhecida artificialmente ainda apresentar 2-FE, certamente a caneta questionada terá menos que cinco anos de aposição no papel (BRUNELLE e CRAWFORD, 2003).

Grim e colaboradores (2002) já tinham utilizado a técnica de LDI-MS para monitorar o envelhecimento artificial acelerado de tintas de canetas em papel, como forma de estabelecer uma ferramenta de análise forense, utilizando radiação ultravioleta para simular o envelhecimento dos documentos. Neste estudo, uma das observações foi que a radiação ultravioleta degradava os corantes sem evaporar os solventes, enquanto que o envelhecimento simulado com efeito de calor evaporava os solventes, mas não degradava os corantes (GRIM *et al.*, 2002). Berger-Karin e colaboradores (2008) analisaram amostras de tintas de caneta submetidas ao envelhecimento artificial acelerado ou envelhecimento normal, extraídas do papel utilizando dessorção térmica fracionada em três etapas, com temperaturas de 100 °C por 15 min, 140 °C por 15 min e 200 °C por 10 min, expressando a perda de fenoxietanol em cada temperatura como um valor relativo ao total dessorvido (BERGER-KARIN, *et al.*, 2008).

Weyermann e Spengler iniciaram estudos com envelhecimento acelerado em 2008, verificando algo muito importante, que os corantes, na ausência de luz ou calor degradam tão vagarosamente ao longo dos anos que seu uso é limitado para a datação de documentos. Continuando os estudos em 2011, Weyermann e colaboradores, citando Aginsky (1996) e Brazeau e Gaudreau (2002), descrevem um método de análise de envelhecimento de tintas baseado na taxa de evaporação/diminuição da concentração de solventes (método 01) e na taxa de diminuição da extractibilidade de solventes (método 02). De acordo com Cantu (1996), Aginsky utilizou CG/EM para caracterizar a tinta, identificar os componentes voláteis e assegurar que as tintas em comparação possuíam os mesmos componentes (AGINSKY, 1996; CANTU, 1996; BRAZEAU e GADREAU, 2002; WEYERMANN e SPENGLER, 2008; WEYERMANN *et al.*, 2011).

De acordo com Weyermann e colaboradores (2011), o método 01 consiste em realizar a extração da tinta de microdiscos de papel e quantificação do 2-FE utilizando o método do padrão interno, por CG/EM em modo SIM (Selected Ion Monitoring), cuja concentração é denominada "P". Após, utilizando outro pedaço do mesmo lançamento a tinta, realizar o aquecimento desta fração a 70 °C por 60 min, para só depois realizar os outros passos (denominada P<sub>t</sub>). A taxa de diminuição de componentes voláteis é calculada através de uma equação e se o valor de R é 20% ou maior, o envelhecimento natural da tinta analisada ainda está ocorrendo (lançamento é



recente). O método 02 consiste na determinação de diminuição da extractibilidade dos solventes. O processo envolve a extração do fragmento de tinta de caneta com um solvente fraco de extração lenta, e depois da secagem uma nova extração com um solvente forte. Ambos extratos são então analisados por CG/EM. Um outro fragmento da mesma tinta é então submetido ao envelhecimento acelerado e depois é realizada a sequência de extrações. Para cada valor de  $(P)$  e  $(P_t)$  é realizada uma relação percentual entre as duas extrações. O valor da taxa de diminuição da extractibilidade é então medida diminuindo-se  $(P)$  de  $(P_t)$ . Se o valor desta taxa for 15% ou mais, significa que a tinta da caneta é ainda fresca. Se for menor que 10%, significa que a tinta da caneta é mais antiga, ou seja, já evaporou praticamente todos os solventes (WEYERMANN *et al.*, 2011).

Canetas esferográficas têm sido diferenciadas e classificadas também por métodos envolvendo análise por Espectroscopia no Infravermelho. Diversos autores têm se dedicado a aplicar a espectroscopia por FT-IR (Infravermelho com Transformada de Fourier) na caracterização de formulações de tintas de canetas extraídas diretamente do cartucho da caneta (WANG *et al.*, 2001; PAYNE *et al.* 2005), extraídas de traços de canetas realizados em papéis (ZIEBA-PALUS e KUNICKI, 2006), analisando-as em IR com Acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) (SILVA *et al.* 2013; LEE *et al.* 2016; SHARMA e KUMAR, 2017) ou utilizando amostras de traços de canetas diretamente em IR-ATR acoplado a um microscópio, para a obtenção do espectro de infravermelho (KHER *et al.*, 2006; ZIEBA-PALUS e KUNICKI, 2006; NAM *et al.*, 2014). Alguns autores buscaram desenvolver métodos utilizando Espectroscopia Raman (ZIEBA-PALUS e KUNICKI, 2006; BRAZ *et al.*, 2013) e também métodos de imageamento químico na faixa do IR próximo (PAYNE *et al.* 2005; SILVA *et al.*, 2014).

Outros autores buscaram classificar e diferenciar as formulações de canetas utilizando os métodos de IR e correlatos associados a Análise Estatística Multivariada, utilizando tanto Análise por Componentes Principais (PCA) como Análise Discriminante Linear (LDA) para a diferenciação de grupos de formulações (KHER *et al.*, 2006; SENIOR *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013, SHARMA e KUMAR, 2017).

Esta Tese pretende utilizar a base de conhecimento já obtida por todos os autores citados para dar suporte à pesquisa voltada para a análise de canetas, para buscar o desenvolvimento de método que seja aplicável à datação de manuscritos. Para tanto, serão utilizadas diferentes ferramentas analíticas e os resultados serão

avaliados aplicando Análise Estatística Multivariada dos dados, bem como Análise de Variância.

## **4. CAPÍTULO 1**

---

**Using GC/MS to detect caffeine in real case of artificially aged forged documents and method optimization**



#### 4.1 ARTIGO 1

A seguir encontra-se encartada a primeira página do artigo intitulado “**Using GC/MS to detect caffeine in real case of artificially aged forged documents and method optimization**”, o qual foi publicado na revista Current Chromatography, em 2018, e se no volume 5 da revista, páginas 53-64 (DOI: [10.2174/2213240605666180216145033](https://doi.org/10.2174/2213240605666180216145033)). O artigo trata de um estudo de caso real de recibos envelhecidos artificialmente com o uso de bebidas cafeinadas como chá ou café, que promovem uma aparência amarelada no papel. No estudo de caso detectou-se a presença de cafeína no papel. De forma a estabelecer uma metodologia rotineira de análise deste tipo de fraude, os autores buscaram otimizar o processo de extração para garantir a ausência de falsos negativos por falhas metodológicas.

A seguir se encontra encartada o resumo em inglês do artigo publicado e comentários sobre os exames e resultados obtidos. No texto completo da Tese defendida, o artigo ocupa o espaço das páginas 61 a 72.



## Using GC/MS to detect caffeine in real case of artificially aged forged documents and method optimization

Carina Maria Bello Carvalho<sup>ab\*</sup>, Daniele Zago Souza<sup>a</sup>, Rafael Scorsatto Ortiz<sup>a</sup>, Monique dos Reis<sup>b</sup> and Renata Pereira Limberger<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police – 1365 Ipiranga Avenue, 8<sup>o</sup> floor, 90160-093, Porto Alegre, RS, Brazil ; <sup>b</sup> Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Abstract: Background:** In the criminal expertise exams routine, documents with aged appearance are quite common. A frequent type of fraud is the use of tea or coffee to produce yellowish color on paper, making the paper look older. One way to identify this kind of fraud is caffeine detection on paper. **Objectives:** This paper introduce a case study from Brazilian Federal Police that involved office receipts with aged appearance, in which it was detected the presence of caffeine, using Gas Chromatography/Mass Spectrometry in SIM mode. The criminal experts suspected, embased by other evidences, that those documents were not as old as they looked like. Based on those findings, a subsequent study tried to optimize the conditions for extraction and detection of caffeine in documents whose aging has been simulated with the use of caffeinated beverages. **Methods:** To achieve this we used a factorial design 2<sup>-k</sup> fractionated ½, with five factors at two levels, with one repetition and Gas Chromatography/Mass Spectrometry in SIM mode to detect de presence of caffeine. **Results:** The conditions that resulted in the best concentration of caffeine extracted from the paper were recycled paper, paper with high grammage, 15 minutes extraction in ultrasonic bath, using black tea and immersing the paper in the caffeinated solution. **Conclusions:** this method proved to be feasible to detect caffeine in artificially aged documents with the use of coffee or tea.

**Keywords:** Artificial aging; caffeine; fractional factorial design; forensic science; document forgery; Gas Chromatography; Mass spectrometry.

A cafeína é uma substância que pertence ao grupo dos alcaloides da metilxantina, e está presente em muitas plantas, mais comumente no café (*Coffea spp.*) E no chá preto (*Camellia sinensis*). Mas outras plantas também têm cafeína em sua composição, como o guaraná, a cola, o cacau, entre outros. A cafeína, por sua estrutura química, é solubilizada em água quente e em solventes de média polaridade, como solventes clorados. A análise da concentração de cafeína em soluções de café e chá preto, bem como em fluidos biológicos, como extratos de urina, foi realizada com várias finalidades [3, 4]. No entanto, a sua detecção em papel envelhecido artificialmente, com o objetivo de identificar falsificações, carece de estudos de caso na literatura científica.

No estudo realizado por Camargo e Toledo [3] as diferentes marcas brasileiras de café analisadas por cromatografia líquida mostraram uma grande variação em seus níveis de cafeína, com valores variando entre 25,80 e 50,40 mg / 60 mL, o que estaria de acordo com os valores encontrados por outros pesquisadores. Outros autores [5] encontraram concentrações de cafeína variando de 3,99 g. 100-1 g de café solúvel a 2,99 g. 100-1 g de folhas de chá. A cromatografia líquida é o método geralmente usado para detectar cafeína em amostras líquidas [3, 6, 7].

No entanto, em uma análise recente, detectamos a presença de cafeína em recibos de escritório com aparência envelhecida, concluindo que eles foram forjados usando chá preto ou café para promover a aparência amarelada do papel. Esta análise foi feita usando uma ferramenta útil, Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (GC / MS) para detectar cafeína nesses documentos [8].

O objetivo deste trabalho publicado na revista *Current Chromatography* foi descrever o estudo de caso da cafeína detectada em documentos reais forjados artificialmente e foi realizado estudo experimental realizado para avaliar as melhores condições metodológicas que poderiam fornecer detecção e extração mais eficaz de cafeína em documentos fraudulentos. Esta avaliação foi feita com o uso de delineamento experimental levando em consideração as variáveis mais comuns envolvidas no processo de falsificação, o tipo e gramatura do papel, o tipo de bebida cafeinada



utilizada no envelhecimento artificial (chá preto ou café), forma de papel. exposição ao líquido de modo a obter o efeito do envelhecimento, bem como fatores envolvidos no processo de detecção da cafeína em papel.

No Estudo de Caso, foram analisados sessenta (60) formulários de recibos, apresentados como material questionável no Serviço Forense da Polícia Federal brasileira. Esses documentos referiam-se ao pagamento de um salário referente ao período de 30/06/1962 a 30/05/1967 e tinham todos os campos de escrita preenchidos com impressões de papel carbono. O papel era aparentemente envelhecido e tinha aparência amarelada.

Além dos documentos questionados, também foi testada uma solução padrão de cafeína, obtendo-se a detecção dessa substância por meio do monitoramento de íons específicos (Single Ion Monitoring - SIM) no Espectrômetro de Massa.

Para o estudo de otimização dos parâmetros de detecção da cafeína, foi utilizado um planejamento fatorial 2<sup>k</sup> fracionado 1/2, com cinco fatores em dois níveis, para a análise do método de extração, a fim de detectar cafeína em papéis de diferentes tipos e gramaturas, submetidos a simulação de envelhecimento utilizando chá preto ou café buscando a condição que apresentava a maior concentração de cafeína.

## **CONCLUSÕES OBTIDAS**

Especialistas forenses encontraram cafeína em documentos reais suspeitos de serem forjados para parecerem antigos, extraíndo amostras do papel e injetando esses extratos em um Cromatógrafo Gasoso acoplado à Espectrometria de Massa. Estes resultados foram interessantes porque não é comum encontrar a cafeína em documentos supostamente originalmente antigos, mas que são falsificados.

Com base nesses achados, os autores decidiram avaliar as condições que proporcionariam a extração mais eficiente de cafeína em papéis com envelhecimento simulado. O delineamento experimental utilizando planejamento fatorial “ $2^{5-1}$  com repetição”, com os fatores controláveis “Tipo Papel”, “Gramatura de papel”, “tempo de extração”, “tipo de bebida” e “método de exposição” foi eficiente na determinação dos resultados.

Vários meios estão sendo usados para forjar a aparência envelhecida de documentos, entre os quais se destaca o uso de chá preto ou café. Um dos desafios para o perito criminal é a identificação dessa fraude, que poderia ser conseguida pela detecção de cafeína no documento questionado.

Durante o envelhecimento do papel, a hidrólise ácida da celulose e / ou outros polímeros constitutivos, como hemiceluloses e ligninas, é considerada a reação predominante. Os papéis naturalmente envelhecidos possuem alguma degradação da lignocelulose de substâncias que são voláteis, como octanal, decanal, furfural, vanilina, fenol e formaldeído, e alguns estudos já procuraram analisar essas evidências por técnicas como Microextração em Fase Sólida (SPME) [09] .

Para uma conclusão mais sólida sobre falsificações de documentos antigos, estudos futuros poderiam incluir a análise de cafeína juntamente com a análise dos produtos de degradação do papel. A identificação de cafeína e alguma degradação de substâncias lignocelulósicas (como furfural, vanilina, 5-metil furfural e guaiacol [5]) poderiam levar à conclusão de que a aparência envelhecida do papel envolveria também o uso de calor no forno ( calor seco ou úmido), além da aplicação de café ou chá preto.

Futuros estudos envolvendo Análise Multivariada (PCA e análise de Cluster Hierárquico) também podem ser realizados comparando documentos, cujo envelhecimento foi simulado ou acelerado, com documentos verdadeiramente antigos.

**REFERÊNCIAS**

- [1] Lattuati-Derieux, A.; Bonnassies-Termes, S.; Lavédrine, B. Characterisation of compounds emitted during natural and artificial ageing of a book. Use of headspace-solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *J Cult Herit*, **2006**, *7*, 123-133.
- [2] Waterhouse, J. F. Monitoring the Aging of paper. IPC Technical Paper Series, The Institute of Paper Chemistry: Wisconsin. **1988**, 297p.
- [3] Camargo, M.C.R., Toledo, M.C.F. Caffeine Content of Commercial Brazilian Coffee. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **1998**, *18*(4).
- [4] Dyke, T.M.; Sams, R.A.; Detection and Determination of Theobromine and Caffeine in Urine after Administration of Chocolate-Coated Peanuts to Horses. *J Anal Toxicol*, 1998, *22*, 112-116.
- [5] Bortolini, K.; Sicka, P.; Foppa, T. Determination of Caffeine Moisture in Stimulating Beverages. *Revista Saúde*, 2010, *4*(2), Universidade do Contestado:Brasil.
- [6] Moura, C.; Nogueira, B. A.; Silva, R.C.O.; Guz, R.; Oldoni, T.L.C. Caffeine Determination in black tea (*Camellia sinensis*) by HPLC. *Syn. Scy.*, 2015, *10*(1), 99-107, UTFPR:Pato Branco-Brasil.
- [7] Naegele, E. Determination of Caffeine in Coffee Products According to DIN 20481. Agilent Application Note, 2013, Publication number 5991 -2851EN, Reference: Available from: URL [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).
- [8] Carvalho, C.M.B.; Souza, D.Z. Report nº 936/2014, Setor Técnico Científico, Superintendência Regional de Polícia Federal no Rio Grande do Sul. Sistema de Criminalística Database. <<https://ditec.dpf.gov.br/sistemas/criminalistica>>. (Accessed June 13, 2016).
- [09] Lattuati-Derieux, A.; Bonnassies-Termes, S.; Lavédrine, B. Identification of volatile organic compounds emitted by a naturally aged book using solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr. A*. 2004, *1026*, 9-18.

















## **5. CAPÍTULO 2**

---

**Characterization and differentiation of ballpoint pen ink strokes on paper using Orbitrap mass spectrometry and multivariate statistic**



### 5.1 ARTIGO 2

A seguir encontra-se encartado o artigo intitulado “**Characterization and differentiation of ballpoint pen ink strokes on paper using Orbitrap mass spectrometry and multivariate statistic**”, o qual foi publicado em Fevereiro de 2018 no formato Open Access, na revista Forensic Science and Addiction Research, volume 2, número 2, o qual pode ser acessado pelo endereço <http://crimsonpublishers.com/fsar/pdf/FSAR.000537.pdf>. O artigo em questão trata sobre análises de tintas de canetas esferográficas pretas e azuis no espectrômetro de massa de alta resolução ESI-Orbitrap para obter o padrão de corantes e aditivos de cada marca de caneta esferográfica testada, com posterior diferenciação e classificação das canetas por estatística multivariada (PCA e HCA). O presente artigo é de acesso livre.



## Characterization and differentiation of ballpoint pen ink strokes on paper using Orbitrap mass spectrometry and multivariate statistic

Bello de Carvalho, Carina Maria<sup>a, b</sup>, dos Reis, Monique<sup>b</sup>, Zamboni, Amanda<sup>b</sup>, Ortiz, Rafael Scorsatto<sup>a</sup>, Ferrão, Marco Flores<sup>c</sup>; Vaz, Boniek Gontijo<sup>d</sup>, Limberger, Renata Pereira<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup>Institute of Chemistry, Mass Spectrometry and Chromatography Laboratory, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Corresponding Author: Carina M. Bello de Carvalho, Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, Av. Ipiranga 1365, 8<sup>o</sup> floor, 90160-030, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone +555132359092 e-mail address carina.cmbc@dpf.gov.br

In criminal expertise routine, the expert is confronted by the challenge of detecting fraud in several important documents. One kind of forgery is the change of a document date of emission by one type of fraud is the adulteration of the date of emission of a document through the erasure and addition of another date with ballpoint pen of color similar to original. The forgery can be detected by characterization of colorant substances of each ink formulation. This could be done by using Orbitrap mass spectrometry. This study performed analysis in ESI-Orbitrap mass spectrometer to obtain the colorants and additives pattern of each brand of blue and black ballpoint pen tested, and after differentiated the pens by multivariate statistic (PCA and HCA). The analysis of ballpoint pen samples in an Q-Exactive® Orbitrap mass analyser was able to differentiate the samples, even for inks of very similar color, and the method proved to be very sensitive. The exact mass spectra was submitted to multivariate statistical analysis and the Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) was able to characterize the variables that were responsible for the variation and similarity of the samples. The HCA and PCA was able to group pens from the same brand and also to approximate pens of different brands but similar formulations. At the same time, multivariate analysis could identify pens that were very dissimilar from the others.

Keywords: Ballpoint pen ink, Mass Spectrometry, Orbitrap, Multivariate Statistic, forensic analysis, documentoscopy.

### Introduction

In criminal expertise routine, the expert is confronted by the challenge of detecting fraud in several important documents. One kind of forgery is the change of a document date of emission by one type of fraud is the adulteration of the date of emission of a document through the erasure and addition of another date with ballpoint pen of color similar to original. It is reported that around 80% of questioned documents requiring analysis contain ballpoint pen ink

[1]. The forgery can be detected by characterization of colorant substances of each ink formulation.

The dyes used in blue and black ballpoint pens are basic dyes based on triarylmethane and acid dyes derived from diazo compounds or phthalocyanine, and both types are ionic in nature, with the basic and acid dyes generally containing iminium and sulfonate groups, respectively [2]. The dyes and pigments (organic and/or inorganic) make up about 25% of the formulation, while the solvent makes up about 50% by weight. The remainder is a variety of additives like resins, viscosity adjusters, antioxidants, surfactants, softeners, and lubricants [3].

Many methods have been nowadays used to analyze the chemical composition of ballpoint pen ink such as high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to Diode Array or Ultraviolet Detection [4,5,6,7,8] or Mass Spectrometry detection [9,10]. Direct insertion methods, without chromatographic separation, are more suitable for forensic samples because the analyst do not need to develop chromatographic methods that involve mobile phase, columns, and other factors of variability. The direct insertion of samples also have less sample preparation, and small quantity of ink is required to achieve good results. New sampling interfaces for mass spectrometers are Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)<sup>2,11</sup>, Desorption Electrospray Ionization (DESI)[12], Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (LDI-MS) [13,14,15], Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry (DART-MS) [16], Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (generally coupled with Time-of-Flight Mass Spectrometry) (MALDI-TOF) [15,17,18] and finally, Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (EASI) [19]. Some studies applied surface analysis by Time of Flight- Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS), to discriminate ballpoint pen inks. The ToF-SIMS can simultaneously collect organic and inorganic information of the samples [3,20]. It is also highly feasible to analyze cationic nitrogen compounds and sulfonated azo dyes by positive and negative ESI/MS (electrospray ionization/Mass Spectrometry) [21, 22].

The simple Ion Trap Mass Spectrometer has low resolution, and when mixture or unknown substances have to be identified on ballpoint pen ink, Ion Trap is insufficient for unambiguous identification. However, a new member of high resolution mass spectrometry (HMRS) analyzers, Orbitrap is an electrostatic ion trap that uses the Fourier transform to obtain mass spectra, and operate with good sensitivity, high mass resolving power (up to 150000), and mass accuracies in the order of parts per million [23,24].

Until now, just Sun et. al.<sup>25</sup> applied Orbitrap to the identification of dyes and blue ballpoint pens inks, although they have used Liquid Chromatography-Diode Array Detection



prior to Orbitrap Mass Analyzer and differentiated the ballpoint pens using Discrimination Power Equation provided by Gallidabino et al.[17] .

A chromatogram of a spectrum may be visualized as a pattern in multivariate space. Samples displaying similar patterns cluster together and those displaying dissimilar patterns are located away from each other in multivariate space. By knowing this concept, the Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of each ink mass spectrum can be used to differentiate the ballpoint pens<sup>2</sup>. Kher et al.<sup>2</sup> used multivariate analysis to discriminate ballpoint pen inks HPLC chromatograms, and Denman et al.[3] did Principal Component Analysis of ToF-SIMS spectra of 07 different brands of blue ballpoint pens, but none study tried to perform multivariate analysis using Orbitrap mass spectra data for classification of blue and black pens.

Many studies subjecting ballpoint pens characterization have been conducted with ballpoint pens from European manufacturers, however the pens in Brazilian market have different manufacturers and because of this, different formulations. In a previous study [26], we concluded that strokes in paper, made with different brands/models of ballpoint pens have different initial concentration of 2-phenoxyethanol, a solvent generally determined to evaluate the age of manuscript strokes in forensic documents. Based on this finding, it is important to characterize the pen ink formulation in a way that the forensic expert can know that he is comparing strokes made with the same pen, to avoid strong conclusions.

This study aim to perform analysis in ESI-Orbitrap mass spectrometer to obtain the colorants and additives pattern of each brand of ballpoint pen tested, in way to differentiate the pens by multivariate statistic (PCA and HCA).

### **Materials and methods**

Thirty-three different brands/models of blue ballpoint pens and twenty-six different brands/models of black ballpoint pens (Bic, Stabilo, Injex, Faber Castell, Pilot, Cis, Uni, BRW, Staedler, Molin, Jocar, Tilibra, Pentel, Ita, Tris, Compactor, Masterprint, Paper Mate, NewPen) were applied as strokes, with a ruler, on white office paper (75 g/m<sup>2</sup>). The strokes were cut in one centimeter fractions, and extracted with 200 µL of methanol. The extracts were then analyzed on positive and negative mode, by direct infusion in an ESI-Q-Exactive® Orbitrap mass analyzer (Thermo Scientific®), located at Mass Spectrometry and Chromatography Laboratory of Federal University of Goiás. The equipment conditions were Spray Voltage of 3,6 kV, Capillary temperature of 275 °C, Sheat Gas flow rate of 10, and S-lens level of 50. In both positive and negative mode, it was scanned from 100 to 1500 amu.

The exact mass substances detected were identified as dyes and other components of pen inks using exact masses reported in the literature.

The brands of pens analyzed were chosen because they are the most sold in Brazilian markets (Tables 01 and 02).

Table 2-1. Blue pens Analyzed

Pen code	Brand/model
A1	Bic eolutions round stic
A2	Bic fine point
A3	Bic cristal pocket
A4	Faber Castell trilux 032 Medium
A5	Faber Castell trilux 035 Fine
A6	Faber Castel EC-07
A7	Faber Castell Medium
A8	Compactor 07 fine
A9.2	Compactor TOP2000
A10	Pilot BPS 0.7 AZ
A11	Injex Pen new
A11.2	Injex Pen used
A12	BRW new
A12.1	BRW used
A13	Pilot Super Grip 1.0
A14	Tris Hit Blue
A15	Tris Exec 1.0
A16	CIS Silver Stick 1.0
A17	Pentel Star V 0.7– India
A19	Uni Laknok 1.4 (Japan)
A21	Stabilo Excel 828M
A22	Stabilo Tropikana (Germany)
A23	Paper Mate Kilometrica 100 1.0
A24	New Pen Clic
A25	Master Print
A26	Bic Cristal
A27	Unknown brand
A28	Compactor Economic
A29	Pilot Super Grip nova 1.6
A30	Bic Atlantis 1.6
A31	Tilibra super BP 1.0
A32	Uni SAS Fine (Japan)
A33	Uni Lakubo 1.0 (Japan)
A35	Stabilo bille 508 (Germany)
A36	Molin CR-45 (France)

Table 2-2. Black pens analysed.

Pen Code	Brand/model
P1	Bic cristal pocket
P2	Bic ECOLUTIONS round stic
P3	Bic Diamond
P4	Bic cristal
P5	Injex pen new
P5.1	Injex Pen used
P6	Faber Castel trilux 032 Medium
P7	Faber Castell fine point
P8	Pilot BPS 0.7 fine point
P9	Stabilo Excel 828 M
P10	BRW new
P10.2	BRW used
P11.1	Molin (France)
P12	Uni Laknok 0.7 fine point
P13	Ita
P14	Cis Neotip 1.0
P15	Pentel Star V 0.7 – India
P16	Paper Mate Kilometrica 1.0
P17	Jocar Office
P18	Faber Castel trilux 035 fine
P19	Bic Atlantis 1.6
P20	Pilot Super Grip 1.6
P21	Tilibra Super BP 1.0
P22	Staedler Ball 432 M
P23	Molin 0.7 trion (France)
P25	Uni SAS Fine – Japan
P26	Stabilo M Bille 508 (Germany)
P27	Cis Speed 1.0

After the Orbitrap analysis, the relative intensities of the peaks of main components presented in the spectra obtained for each sample were selected for the Multivariate Statistic Analysis – Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA). The data were then processed with Chemostat software [27], where the integrated peak values were submitted to PCA analysis without any mathematical treatment.

### Results and Discussion

In relation to BLUE PENS, the first experiment included all samples of pens, but the PCA score plot showed that sample A1(Bic Ecolutions) located in the positive side of PC1, was totally divergent of the other samples (located in the negative side of PC1), because of the dye 1,3-dimethyl-1,3-ditolyguanidine (exact mass 268,1805 [M+H]<sup>+</sup>). Because of this, the experiment was redone without A1, and so the HCA was able to differentiate with a relative well Euclidian Distance, all of the samples analyzed. Along with this, the HCA presented six great hierarchical clusters and two isolated samples (A27 - a pen similar to Faber Castell and A13 - Pilot Super Grip) (Figure 01). The HCA showed that the majority of the clusters were

formed by pens from same brand and/or similar pictorial aspect of the ink (i.e. color, texture), so the method was able to differentiate the individuals but at the same time to group similar pens. In the blue pens group, the pens A11 (Injex Pen) and A12 (BRW) are new pens, never used, and the pens A11-2 and A12-1 are pens that have been used already. The HCA plot showed A11 and A11-2 near to each other, confirming that there are not too many changes in the composition despite the use. But the same didn't occur to the samples A12 and A12-1, which were located far to each other, on the HCA plot.

For the blue pens PCA, the PC1 versus PC2 plot accounted for 24,15% data variance, and with the others PCs until PC7 accumulated 53,75% of the variability (Figure 01). PC1 divided the samples in two great clusters, where the loadings responsible for the samples located onto PC1 positive side were mainly the more common dyes in pen inks (crystal violet, methyl violet, basic violet family, basic blue 2 and Victoria blue family, and guanidine family) (see table 03). The samples located in PC1 negative side showed more influence of additives (surfactants, antioxidants, preservatives) and less common dyes (murexide m/z 265,1480; Victoria blue family dye m/z 429,2398). From PC2 positive side, the samples A27, A31, A35 and A36 (unidentified brand, Tilibra, Stabilo Bille, Molin) showed more difference to the others; and the loadings (m/z) responsible for the variability were cited on the table 03.

About the cited new and used pens A12 and A12-1, the PC2 loadings that are counting for the difference between this samples. The PC3 versus PC4 plot showed a well distribution of the samples, except for the A14 (Tris Hit), that differentiate from the others (more positive score at PC4) and A22 (more negative score at PC3). The loadings influencing this dissimilarity of the A14 and A22 samples from the others were mainly murexide (m/z 265,1480) and a piperazine dye (m/z 397,2265 [M-H]<sup>-</sup>). The PC4xPC5 plot differentiate the sample A13 (Pilot Super Grip), because of the influence of basic blue 7 on negative scores of PC5. The PC5xPC6 plot show the majority of the samples near the center and the samples A16 and A22 apart from the others having high positive scores on PC6; the samples A12, A12-1 and A21 have high positive scores on PC5, being different from the others. The main loadings influencing samples on PC6 positive score are crystal violet; methyl violet; Victoria blue and Basic blue 9, besides unknown substances with exact mass m/z 325,1844; m/z 246,2425 and m/z 219,2450. The samples A27 and A31 were located apart from the others on the PC6xPC7 plot, A27 presenting the more positive score and A31 the more negative score for PC7.

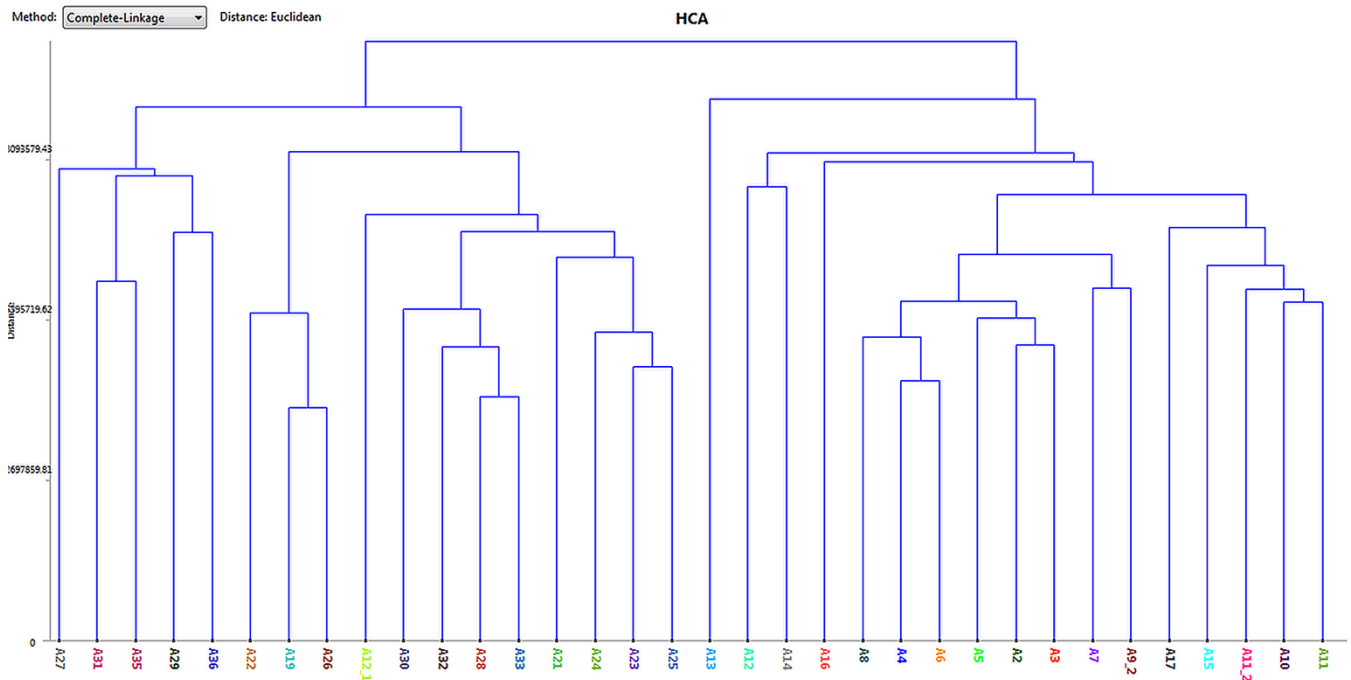


Figure 2-1. HCA results for blue pens

In relation to BLACK PENS, the first analysis including all samples showed two samples with great differences from the others: Paper Mate and Faber Castell trilux 035, in the same way of the blue pens. Because of this, the multivariate statistic was remade without that samples, and so the HCA was able to differentiate with a relative well Euclidian Distance, all of the samples analyzed. The HCA presented five hierarchical clusters and also four samples differed most from the others P13 and P15, P6 and P7 (ITA, Pentel, Faber 032 and Faber Fine

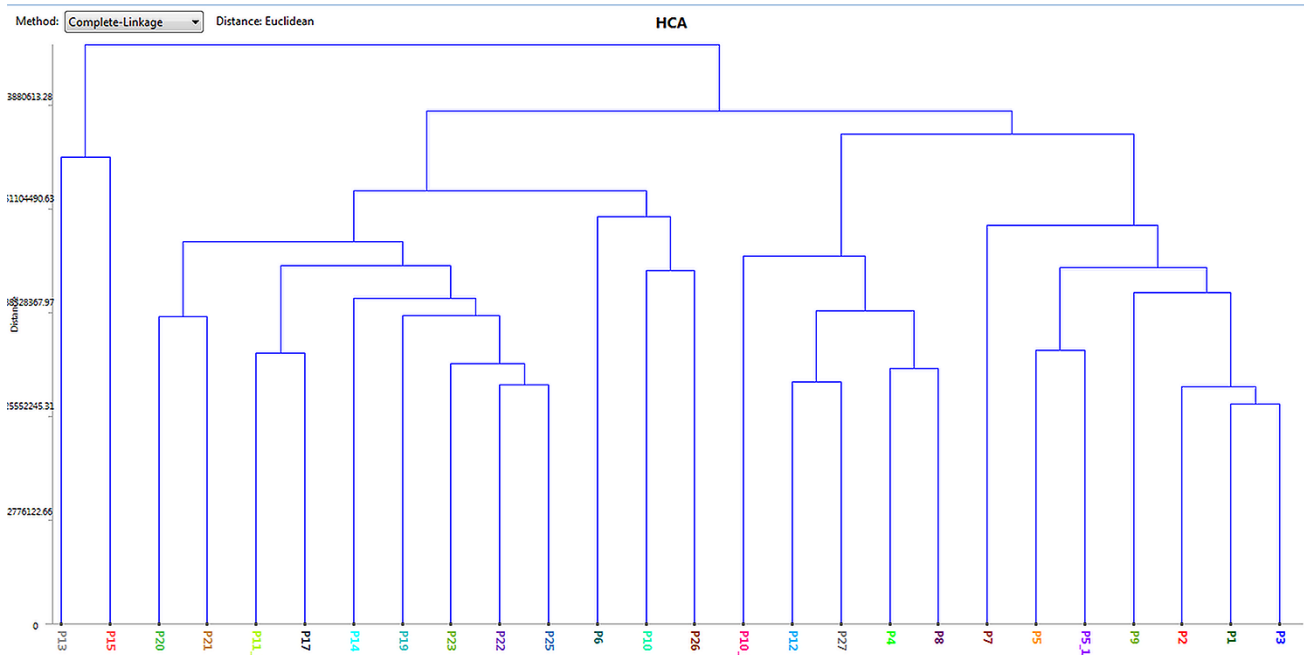


Figure 2-2. HCA results for black pens

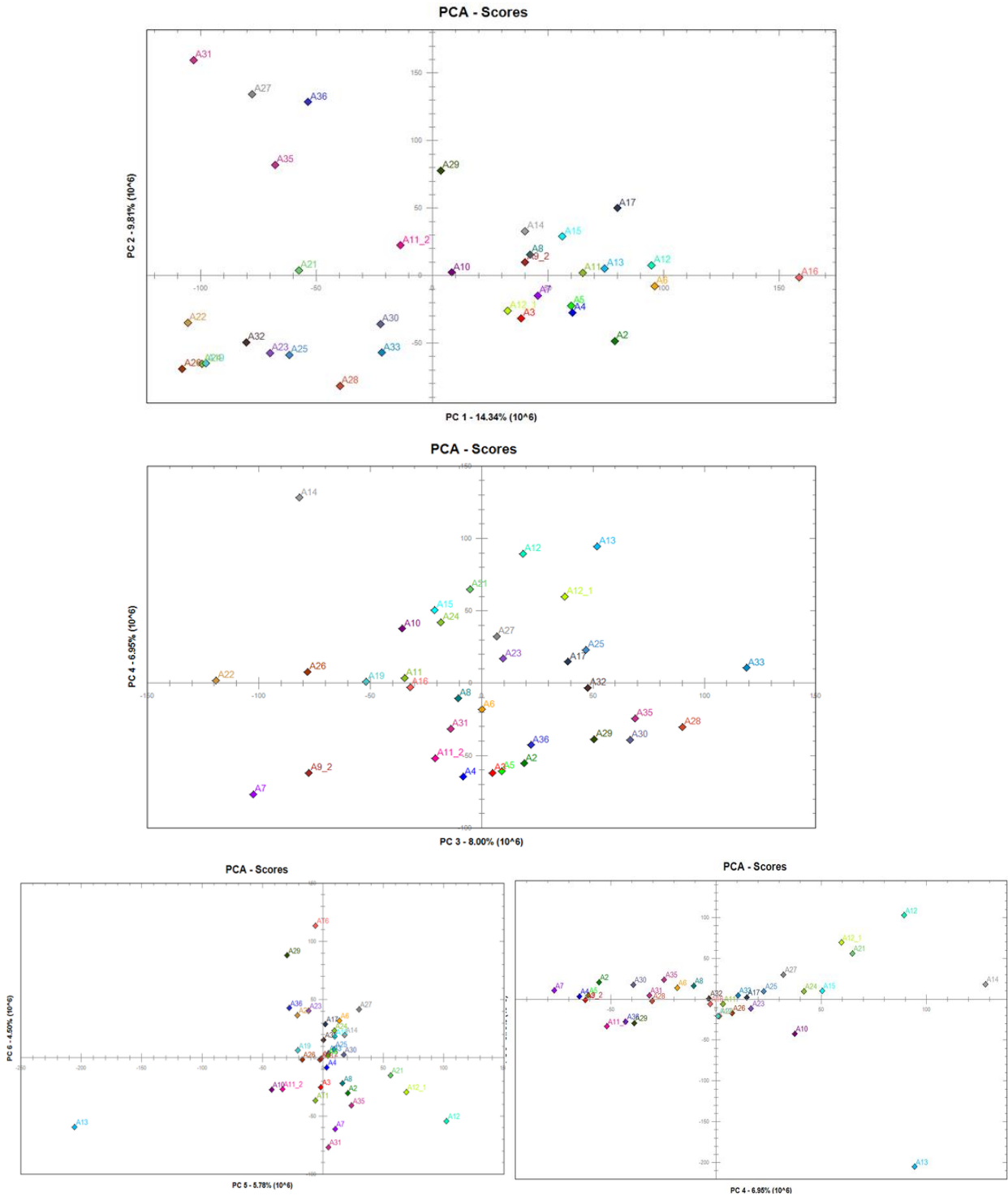


Figure 2-3. PCA scores for Blue Pens

Point). In the black pens group, in the same way of the blue pens, the pens P5 (Injex Pen) and P10 (BRW) are new pens, never used, and the pens P5-1 and P10-2 are pens that have been used already. Just like the blue pens, the HCA plot showed P5 and P5-1 near to each other, confirming that there are not too many changes in the composition despite the use, and P10 and P10-2 located far to each other, showing that this brand, no matter the color, changes its ink composition with the use. This finding was also reported in previous studies, were authors

observed that some pens presented degradation of dyes [28] and sometimes the ink is inhomogeneous inside of pen cartridge [29].

In the PC1 versus PC2 plot accounted for 31,29% data variance, and with the others PCs until PC7 accumulated 63,39% of the variability (Figure 02), showing that the black pens have less latent variables responsible for the differentiation of the samples than the blue pens. Again, the HCA showed that the majority of the clusters were formed by pens from same brand and/or similar

pictorial aspect of the ink (i.e. color, texture), so the method was able to differentiate the individuals but at the same time to group similar pens. Many samples projected onto PC1 had negative scores, characterized by the loading of the substance murexide, and the dyes basic blue 9 and acid orange family, besides ink additives.

It is significant that almost all Bic brand pens had positive scores on PC1, where the loadings were mainly the more common dyes in pen inks (Table 04). When the samples were projected on PC2xPC3 plot, almost all samples grouped near the center, except for P13 (ITA), that had the more negative PC3 score, mainly because of the presence of a great concentration of basic blue 9 dye. For the samples projected onto PC4xPC5, the sample P15 (Pentel) had the most negative score on PC5 and the main loading were the m/z 126,9040 and the cromal brown dye (m/z 353,0795), besides the basic violet 14 (m/z 301,2384).

Table 2-3. Blue pen PC1 and PC2 positive loadings

PC1 positive loading	Exact mass (m/z) observed	PC2 positive loading	Exact mass (m/z) observed
Cristal violet	372,2429	Aryl-guanidine	253,2173 [M-H] <sup>-</sup>
Methyl violet	358,2272	Acid yellow 36	351,2502 [M-H] <sup>-</sup>
Tetramethylpararosanilina	344,2116	Solvent brown 20	367,2246 [M-H] <sup>-</sup>
Solvent Blue 36	321,2201 [M-H] <sup>-</sup>	Unknown substance	413,2659 [M-H] <sup>-</sup>
Basic Violet 14	302,3041	Unknown substance	429,2398 [M+H] <sup>+</sup>
Victoria blue	470,2585	Unknown substance	522,5976 [M+H] <sup>+</sup>
Victoria blue BO (basic blue7)	478,2215	Ketomalonic acid	118,9791 [M-H] <sup>-</sup>
Victoria blue 4R (solvent blue 2)	485,2829 [M+H] <sup>+</sup>	Unknown substance	550,6289 [M+H] <sup>+</sup>
Acid Yellow 3	453,1688 [M-Na] <sup>-</sup>	Acid Yellow 3	453,1688 [M-Na] <sup>-</sup>

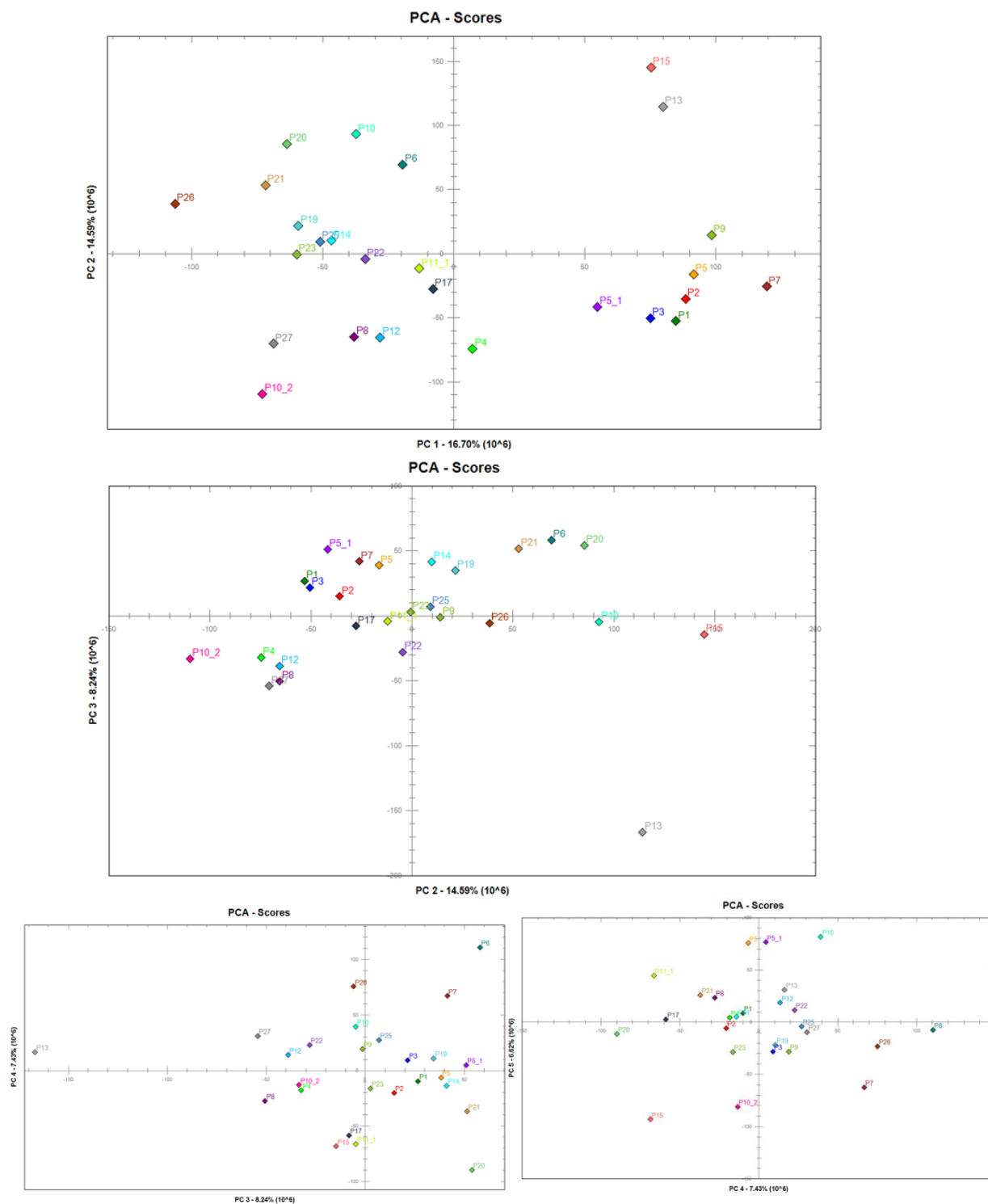


Figure 2-4. Black ballpoint pens PCA scores

On the PC4XPC5 graph also can be seen that P6 and P7 (Faber Castell) and P26 (Stabilo M Bille 508) are related, having the most positive score on PC4, with the main loadings acid yellow 3 (m/z 352,0763); Victoria blue 4R (m/z 485,2827); basic violet 4 (m/z 301,2384); basic blue 9 (m/z 284,9608) and murexide.



In relation to the blue sample A1 (Bic ecolutions), that was very divergent from the others, the main loading for the PC1 positive scores was the dye 1,3-dimethyl-1,3-ditolyguanidine (exact mass 268,1805 [M+H]<sup>+</sup>). For the black samples P16 (Paper Mate) and P18 (Faber Castell 035), that were excluded, they presented too high concentration of cristal violet, metil violet, cromal brown and Victoria blue 4R.

In the blue pens PC1xPC2 plot graph, it was observed that onto PC1 positive and PC2 negative foursquare, the samples of “Bic” and “Faber Castell” ballpoint pens were related, indicating that they have similar composition.

About the black pens P13(Ita) and P15 (Pentel) located on PC1 and PC2 positive four-square, the loadings on PC2 responsible for the similarity were mainly murexide (exact mass 265,1479 [M-H]<sup>-</sup>), acid yellow 1 (312,1720 [M-H]<sup>-</sup>), BHT (199,8043 [M-H]<sup>-</sup>), and acid orange (326,1877 [M-H]<sup>-</sup>).

Tabela 2-4. Black pen PC1 positive and negative loadings

PC1 positive loading	Exact mass (m/z) observed	PC1 negative loading	Exact mass (m/z) observed
Cristal violet	372,2431	Murexide	265,1479 [M-H] <sup>-</sup>
Methyl violet	358,2272	Basic blue 9	284,9608
Cromal Brown	353,0795	pararosaniline	288,9550
Solvent Blue 36	321,2201 [M-H] <sup>-</sup>	Unknown substance	286,9578
Victoria blue family	415,2112	surfactant	192,1382
Victoria blue 4R (solvent blue 2)	485,2829 [M+H] <sup>+</sup>	3-formilbenzoate	149,0234
Solvent brown 20	367,2854 [M-H] <sup>-</sup>	Acid orange 52	326,1877 [M-H] <sup>-</sup>
Acid Yellow 3	352,0763# [M+2H] <sup>-</sup>	Unknown substance	149,0234 [M+H] <sup>+</sup>

#Soltzberg *et al.*, 2004.

Sun *et al.* [25] analyzed dyes and blue ballpoint pen inks, using Liquid Chromatography-Diode Array Detection and Orbitrap Mass Spectrometer. The results of these authors didn't find acid dyes in ballpoint pens, but instead of these, the samples analyzed in the present study presented acid dyes in blue and specially in black ballpoint pens. One of the acid dyes that

influenced in PC2 negative score for blue pens were the Acid Yellow 1 (exact mass 312,1720 [M-H]<sup>-</sup>).

Gallidabino et al.[17] found in many ballpoint pen analysed, the pigment copper phthalocyanine (CuPc), with exact mass  $m/z$  575.1), in both ionization modes (negative and positive) with intense signals, and a variety of signals related to this pigment over  $m/z$  580 ( $m/z$  655.0; 735.0; 815.0 and 894.9). The method of ionization was MALDI, and the detector was TOF. In the present work, the ionization method of ESI associated with Orbitrap, did not find any similar peak, associated with pigment copper phthalocyanine. Maybe associating Orbitrap with another ionization interface like MALDI could increase the sensitivity of this analytical method.

Besides ballpoint pen ink,, Sun et al.[25] analyzed nine dye standards in the LC-DAD-Orbitrap MS system (acid blue 1; acid blue 9; acid red 52, crystal violet, methyl violet 2B, ethyl violet, basic blue 7, Victoria blue B and Victoria blue R) to do the quantification, by LC-DAD, of the same dyes on ballpoint pens samples, and to confirm the Orbitrap exact mass obtained for these samples. The exact mass of dyes obtained by Orbitrap direct insertion of the samples of the present study were compatible with the exact mass obtained by Sun et.al.[25] for the same substances. This finding assure that Orbitrap is a reproducible method even with different ballpoint pens in different laboratories.

Even other methods of detection like those with LDI-MS [15, 21], MALDI-TOF [17], that are able to include the molecular information of all ionized chemicals of the inks, with different exact mass, the mass resolution of these methods is low (1,000), compared with the mass resolution of parts per million (1,0000) of Orbitrap.

Association of positive and negative mode masses in the multivariate analysis increase the discrimination power of the method, like already concluded by Gallidabino et al.[17]. In their study, they used the relative area peaks values combined with qualitative information, and using an specific equation, they reached 96,0% of Discriminating Power. Despite of this, two groups of pens remained indiscriminate (same brand but different size of ballpoint, and same brand but different batch of manufacturing).

Using Orbitrap and Multivariate analysis, our study reached to discriminate all pens, even when the size of ballpoint were different. The PCA analysis provide information on the main dyes and/or ink additives responsible for the similarity and dissimilarity of the groups of pens. Multivariate analysis has the advantage to use all information provided from the Orbitrap, even the mass peaks of unidentified substances, and this increases the individuality of each pen ink formula.

## Conclusions

The analysis of ballpoint pen samples in a Q-Exactive® Orbitrap mass analyzer in positive and negative mode was able to differentiate the samples, even for inks of very similar color, and the method proved to be very sensitive. The exact mass spectra was submitted to multivariate statistical analysis and the Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) was able to characterize the variables that were responsible for the variation and/or similarity of the samples. The HCA and PCA was able to group pens from the same brand, and also to approximate pens of different brands but similar formulations. At the same time, multivariate analysis could identify pens that were very dissimilar from the others, and could classify pens of the same brand but with different ballpoint size (fine point or medium point).

The determination of ink composition of different ballpoint pen strokes is an important way to identify frauds in forensic documents, and the Orbitrap proved to be a useful tool to obtain the exact mass of almost all substances of the pen ink formulation.

## Acknowledgements

The authors wish to thank the Scientific Section of Brazilian Federal Police – Rio Grande do Sul Bureau and the Institute of Chemistry, Mass Spectrometry and Chromatography Laboratory, Federal University of Goiás.

## Notes and references

- 1 Andrasko, J. (2001) HPLC analysis of ballpoint pen inks stored at different light conditions. *J Forensic Sci*, 46(1): 21-30.
- 2 A. Kher, E.V. Green, M.I. Mulholland(2006) 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, 270-277.
- 3 Denman J.A.; Skinner, W.M.; Kirkbride, K.P.; Kempson, I.M. (2010) Organic and inorganic discrimination of ballpoint pen inks by ToF-SIMS and multivariate statistics *Applied Surface Science*, 256: 2155-2163.
- 4 Andrasko, J. (2001) Changes in composition of ballpoint pen inks on aging in darkness. *J Forensic Sci*, 47(2): 324-327.
- 5 Liu, Yi-Zi et al. (2006) Classification and dating of black gel pen ink by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 1135: 57-64.

- 6 Liu, Yi-Zi et al. (2006) 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): 95-103.
- 7 Wang J, Luo G, Sun S, Wang Z, Wang Y. (2001) Systematic analysis of bulk blue ballpoint pen ink by FTIR spectrometry. *J Forensic Sci* 46(5):1093–1097.
- 8 Lee, L.C.;Shandu, K.T.S.; Razi, N.S.M.; Ishak, A.A.; Osman, K. (2015). *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 19(2) : 397 - 401
- 9 Confortin, D. et. al. (2010) Crystal violet: study of the photo-fading of an early synthetic dye in aqueous solution and on paper with HPLC-PDA, LCMS and FORS. *Journal of Physics: Conference Series* 231: 012011
- 10 Freidenfelds, V.; Mekss, P.; (2012) The possibilities of determination of the relative age of ballpoint pen ink entries by high performance liquid chromatography. *Latvian Journal of Chemistry*, 3 : 242–248.
- 11 Williams, M.R et al. (2009), Analysis of black writing ink by electrospray ionization mass spectrometry *Forensic Science International* 191 :97-103.
- 12 Ifa, D.R.; Gumaelius, L.S.; Eberlin, L.S.; Manicke, N.E.; Cooks, R.G. (2002) Forensic analysis of inks by imaging desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Analyst*, 132: 461-467.
- 13 Siegel, J.; Allison, J.; Mohr, D.; Dunn, J. (2005) The use of laser desorption/ionization mass spectrometry in the analysis of inks in questioned documents. *Talanta*, 67: 425-429.
- 14 Grim, D.M.; Siegel, J.; Allison, J. (2002) Evaluation of laser desorption mass spectrometry and UV accelerated aging of dyes on paper as tools for the evaluation of a questioned document. *Journal of Forensic Sciences*, 47 (6): 1-9.
- 15 Weyermann, C.; Kirsch, D.; Vera, C.C.; Spengler, B. (2006) *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 17: 297-306.
- 16 Jones, R.W.; Cody, R.B.; McClelland, J.F. (2006) Differentiating writing inks using Direct Analysis in Real Time mass spectrometry. *Journal of Forensic Sciences*, 51 (4):july.
- 17 Gallidabino, M.; Weyermann, C.; Marquis, R. (2011) Differentiation of blue ballpoint pen inks by positive and negative mode LDI-MS *Forensic Science International* 204 (1-3): 169-178.

- 18 Soltzberg, L.J.; Hagar, A.; Kridaratikorn, S.; Masttson, A.; Newman, R. (2007) MALDI-TOF Mass spectrometric identification of dyes and pigments *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 18 2001-2006.
- 19 Lalli, P.M. et al. (2010) Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry *Analyst*, 135:745-750.
- 20 Coumbaros, J.; Kirkbride, K.P.; Klass, G.; Skinner, W. (2009) Application of time of flight secondary ion mass spectrometry to the in situ analysis of ballpoint pen inks on paper *Forensic Science International*, 193:42-46.
- 21 Lay-Keow Ng P. Lafontaine, L. Brazeau, J. (2002). Ballpoint pen inks: Characterization by positive and negative ion-electrospray ionization mass spectrometry for the forensic examination of writing inks. *J Forensic Sci*, 47(6) :1238-1247
- 22 Moody, C. M., *Black Writing Ink Analysis By Direct Infusion Electrospray Mass Spectroscopy* (2010). *Electronic Theses and Dissertations*.1648. <http://stars.library.ucf.edu/etd/1648> Accessed in 15.01.2018.
- 23 *Mass Spectrometry, Fundamental LC-MS, Orbitrap MassAnalyzers*.Chromacademywww.chrommunity.com Accessed in 23.03.2016
- 24 Hoffman, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Edition, John Wiley and sons, 2007, 502 pp.
- 25 Sun Q. et al., (2016) Detection and identification of dyes in blue writing inks by LC-DAD-orbitrap MS *Forensic Science International* 261, 71-81.
- 26 Carvalho, C.M.B. (2014) Análise da concentração basal dos solventes de tintas de canetas esferográficas *Brazilian Journal of Police Science*, 5, (1), 65-96.
- 27 Helfer, G.A. et al., *Quimica Nova*, 38 (4), (2015) 575-579.
- 28 Grim, D.M.; Siegel, J.; Allison, J. (2002) Does ink age inside of a pen cartridge? *Journal of Forensic Sciences*, 47 (6), Technical Note.
- 29 Andrasko, J., Kunicki, M.(2005) Inhomogeneity and aging of ballpoint pen inks inside of pen cartridges *Journal of Forensic Sciences*, 50 (3): 542–547



## **6. CAPÍTULO 3**

---

**Validation of GC/MS method for quantification of 2-phenoxyethanol from ballpoint pen ink lines and determination of the influence of support paper on solvent extraction**





### 6.1 MANUSCRITO 3

A seguir encontra-se encartado o artigo intitulado **“Validation of GC/MS method for quantification of 2-phenoxyethanol from ballpoint pen ink lines and determination of the influence of support paper on solvent extraction”**, o qual foi aceito para publicação na revista brasileira “Química Nova”, da Sociedade Brasileira de Química, em setembro de 2018, e se encontra em processo final de revisão. O artigo em questão trata sobre a validação do método de análise solventes de tintas de canetas esferográficas por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas. Além da validação do método, também foi realizado um Experimento Fatorial Completo para avaliar os efeitos principais e de interação entre as tintas de canetas azuis e pretas e características do papel de suporte, que influenciam na variável resposta “concentração de 2-FE”.



**VALIDATION OF GC/MS METHOD FOR QUANTIFICATION OF 2-  
PHENOXYETHANOL FROM BALLPOINT PEN INK LINES  
AND DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF SUPPORT PAPER ON  
SOLVENT EXTRACTION**

**Bello de Carvalho, Carina Maria<sup>a, b, c\*</sup>, Ortiz, Rafael Scorsatto<sup>a, c</sup>, Limberger, Renata  
Pereira<sup>e, c</sup>**

<sup>a</sup>Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, 90160-030 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Brazilian National Institute of Forensic Science and Technology, 90160-030 Porto Alegre, RS, Brazil.

\*e-mail: [carina.cmbc@dpf.gov.br](mailto:carina.cmbc@dpf.gov.br)

## **VALIDATION OF GC/MS METHOD FOR QUANTIFICATION OF 2-PHENOXYETHANOL FROM BALLPOINT PEN INK LINES AND DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF SUPPORT PAPER ON SOLVENT EXTRACTION**

Brazilian Forensic Scientists are frequently asked about ballpoint pen manuscripts chronology in official documents suspected to be forged. In the recent years, many methods have been developed on this subject, aiming to determine ink-aging processes, in a way to determine the age of a signature, for example, like quantification of 2-PE (2-phenoxyethanol), one of the volatile substances found in most ballpoint pens used worldwide. The validation of these methods only recently has been a concern between scientific forensic community. Published works presented interesting ideas and promising orientations, but measurement errors are rarely mentioned in the literature. Researchers exhaustively studied the behavior of ink on ageing, but few of them concerned about the influence of the paper on the extraction of 2-PE. This study performed the method validation of the quantification of 2-PE using Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry, taking in account the main parameters involved in the reliability of the method (linearity, repeatability, limits of detection and quantification, accuracy and robustness. After the validation, based on a full factorial design with four factors and two repetitions, the authors tested kind of paper, grammage of paper, ink color and three ink ages, to verify the paper influence on the quantity of 2-PE extracted from ink lines, trough GC/MS analysis. The validation showed that the method is linear, precise and accurate, and is not affected by small changes in the sample and method conditions. The results for the effect of paper showed main effects of the factors and the existence of interactions effects between the kind of paper and paper grammage, and between the kind of paper and other factors. Based on these results, the forensic examiner have to be aware of the importance to compare manuscripts on the same document and to have much more concern when comparing different documents.

Keywords: forensic documentoscopy; ballpoint pen; ink ageing; 2-phenoxyethanol; factorial design; support paper; validation;

## INTRODUCTION

Ink dating on questioned documents has been a great challenging on document examiners routine. Many official documents are forged using manuscripts with ballpoint pens and dated earlier than they really are. Ageing processes of an ink follow complex paths that are considerably influenced by several factors other than time, which may accelerate or slow down the aging, like: (i) initial composition of the ink; (ii) physical and chemical properties of the substrate; (iii) storage conditions (temperature, light, air flux, humidity etc.)<sup>1</sup>. Many current methods developed try to establish a protocol of ink dating by dye or pigment degradation<sup>2-9</sup>. However, Aginsky (1998) already stated that is more correct to measure ink volatile components than dyes to date an ink, because dyes are easily extracted from surface layers of ink lines no matter the ink age.<sup>10</sup>

Volatile solvents in ballpoint inks are also used to assess the age of ink on paper. Solvent evaporation from ink on paper can be divided into an initial fast process, and after a few hours to days, the evaporation slows down and reaches a low, steady state. The aging curve shows significant aging taking place over a period of 3 months, and after this, until 15 years the extent of extraction of the volatile component has been kept at a level of about 20%.<sup>11, 12</sup>

The solvent 2-phenoxyethanol (2-PE) was identified in 85% and 83% of the black and blue inks, respectively, from 633 ballpoint inks collection of the United States Secret Service.<sup>13</sup> Many authors proposed methods of ink dating, based on the behavior of 2-PE after the deposition of the ink on paper, like ageing curves of 2-PE concentration versus age or the manuscript<sup>12</sup>, artificial ageing for modelling natural aging process<sup>14</sup>, and others.

The validation of these methods only recently has been a concern between scientific forensic community. Published works presented interesting ideas and promising orientations, but measurement errors are rarely mentioned in the literature. The analytical dating methods require a considerable amount of time and resources and it is important not underestimate the task of ensuring their scientific validity before implementing them in practice<sup>1</sup>. Koenig *et al.*<sup>15,16</sup>, in previous publications, determined the limits of reliable measurements of 2-PE quantities and the repeatability of the liquid extraction method, and the repeatability and reproducibility of the Termal Desorption/Gas Chromatography-Mass Spectrometry method.<sup>16</sup>

Recently, Diaz-Santana *et al.*<sup>27</sup> attempt to develop a method integrating gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) with high-pressure liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-DAD) to study the relative variations between different compounds and the generation of degradation products such as phenol, from MontBlanc© pens, during 45

months. They used multiple regression model for each ink type to estimate the exposure time of the ink on paper with a maximum error of between 4 and 7 months.

In the same way, Koenig and Weyermann<sup>28</sup> very recently published a study evaluating the potential of seven ageing parameters for ink dating purposes: phenoxyethanol quantity, relative peak areas (RPA), three solvent loss ratios (R%, R%\*, NR%) and two solvent loss parameters (R<sub>NORM</sub>, NR<sub>NORM</sub>). These were calculated over approximately one year for 25 inks selected from a large database to represent different ageing behaviours.

It is essential to make certain that predicted differences provoked by aging are in fact higher than measurement errors. For ink solvents, the detection and the quantification limits (LoD and LoQ) play an important role in determining a threshold at which the method is not applicable anymore.<sup>1</sup>

Following these principles, the influence of different types of paper (substrate structure) on the drying process (evaporation of solvents) and extraction process of these solvents should not be underestimated. The paper porosity can differ quite widely as well as the paper chemistry (alkaline or acidic, fillers, detergents, additives)<sup>1</sup>. Nowadays, the offices are using recycled paper besides white paper, once the recycled paper has an ecological appeal. However, the recycled paper do not use bleaching process and has a completely different porosity. In the casuistic of handwriting exams of Brazilian Federal Police, from 2010 to 2018, 1.86% of questioned manuscripts were done in recycled paper support documents. This percentage is not so expressive, but it exists and there is an increase tendency<sup>31</sup>.

The authors are not yet in accordance about the influence of paper type on dating of an ink: Weyermann *et al.* 2011<sup>1</sup> cited that Aginsky stated that it is a strong dependence on paper type for his method, while Bügler *et al.*<sup>12</sup> thought it to be negligible, but at the end of the article stated that there was a paper effect.

As a part of a sequence of studies from our research group<sup>29,30</sup>, this paper aimed to validate the method of 2-PE extraction and quantification, and to verify the influence of different types of paper on the extraction of 2-PE from ballpoint ink lines.

## EXPERIMENTAL

### Method Validation

The important aspects of scientific reliability and validation for an analytical method were summarized early by Horwitz: reproducibility (between-laboratory precision), repeatability (within-laboratory precision), systematic error or bias (accuracy), selectivity and limits of reliable measurements.<sup>15</sup> The present study concerned to determine the linearity of the quantification curves of 2-PE; the repeatability (intra-assay precision); intermediate precision (different days and different operators); the reproducibility (using other GC/MS located in another laboratory); the detection and quantification limits of the method; the robustness (little variations in method parameters); and the detection of a possible matrix effect, that could alter the signal response. All the validation process were based on guidelines and specialized publications.<sup>16-18</sup>

#### *Preparation of samples for method validation*

The calibration curves were made dissolving a standard of 2-PE (Fluka) in methanol HPLC grade (Merck), at concentrations 0.00000353  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 0.000206  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 0.000413  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 0.00275  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 0.0275  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , and 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , with o-cresol (Sigma-Aldrich) as an internal standard, at a concentration of 0.01046  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . It was made three replicates of the curve, to evaluate the linearity of the curves, using Grubbs test to detect outlier values and the homoscedasticity of the data. The regression equation was calculated by the regression plot between 2-PE concentrations x relative peak area (area of 2-PE peak/area of Internal Standard peak).

#### *Limits of Detection and Quantification*

The regression curves obtained were used to calculate the limits of detection and quantification (LoD and LoQ), using the formulas (1) and (2):

$$LoQ = \frac{3\sqrt{MSR}}{\text{slope of regression line}} \quad (1)$$

$$LoD = \frac{10\sqrt{MSR}}{\text{slope of regression line}} \quad (2)$$

MSR = Mean Square Residual

*Repeatability*

The repeatability was calculated from measurements carried out with the same instrument by the same operator in the same day (intra-assay) and in different days (inter-assay), and from measurements carried out with the same instrument with different operators in the same day. The measurements were made from samples with three different concentrations of 2-PE (0.33 ng.mL<sup>-1</sup>; 0.0044 µg.mL<sup>-1</sup>; 0.10 µg.mL<sup>-1</sup>), and internal standard o-cresol (0.01046 µg.mL<sup>-1</sup>) with six replicates for each concentration. The evaluation of acceptance of precision characteristics of the method was evaluated through Relative Standard Deviation (RSD) equation (3):

$$RSD = \frac{SD}{Mean} \dots \dots \dots (3)$$

RSD= relative standard deviation

SD= standard deviation

Mean = concentration media of replicates

The RSD should be equal or inferior of 10% to be accepted.

*Accuracy*

The accuracy of the method was made determining the Error (E%) (Equation 4) between the 2-PE concentration obtained when compared to the expected concentration of the analite. It were performed three assays with 2-PE in different concentrations (0.00275 µg.mL<sup>-1</sup>, 0.0275 µg.mL<sup>-1</sup> and 0.05 µg.mL<sup>-1</sup>), with internal standard o-cresol (0.01046 µg.mL<sup>-1</sup>), performing three replicates for each concentration, and the accuracy was determined for each nominal concentration level of the analite. The values for the replicate contents at each level of concentration should show a maximum error of 10% when compared to the expected. The accuracy evaluation of this study was based on the Brazilian Institute of Metrology Guidelines<sup>32</sup>.

$$E\% = \frac{X_{lab} - X_v}{X_{lab}} . 100 \quad (4)$$

X<sub>lab</sub> = experimental result of 2-PE concentration

X<sub>v</sub> = nominal value of 2-PE concentration

*Robustness*



The robustness was evaluated performing the GC/MS method with small changes in the defined parameters, performing eight experiments designed through *Youden* test, as exposed in the table below: It was made five repetitions for each treatment, and it was injected a  $0.1784 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  2-PE solution, with internal standard *o*-cresol ( $0.01046 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). To quantification of 2-PE for robustness, the calibration curve was the same already validated.

Table 3-1. Youden test for robustness evaluation.

Parameter	Validated	Assay							
		0	1	2	3	4	5	6	7
Flow (mL min <sup>-1</sup> )	1.3	1.2	1.2	1.2	1.2	1.4	1.4	1.4	1.4
T <sub>injector</sub> (°C)	180	185	185	175	175	185	185	175	175
T <sub>ioven</sub> (°C)	50	55	45	55	45	55	45	55	45
Purge time	3	4	4	2	2	2	2	4	4
V <sub>injection</sub> (μL)	2	2.1	1.9	2.1	1.9	1.9	2.1	1.9	2.1

\* T<sub>injector</sub> – injector temperature; T<sub>ioven</sub>- oven initial temperature; V<sub>injection</sub> – injection volume.

The evaluation of the results were made by evaluation of the relative difference between the concentration of 2-PE without changes in the method parameters and the concentration of 2-PE measured in each assay, and to be accepted, this relative difference should not be superior of 10%.

### GC/MS Analysis

The Gas Chromatograph used for the analysis was an Agilent model 6890N coupled with mass selective detector, model 5973 (at 70 eV) using a DB-WAX capillary column (30 m x 250 μm x 0.25 μm). The chromatographic conditions were as follows: injector at 180 °C, in splitless mode for 3 min; Oven at the initial temperature of 50 °C, with ramp with rate of 18 °C per minute to 204 °C, 5 °C per minute to 230 °C. The injection volume was 2 μL and the helium flow was 1.3 mL/min. For the identification and quantification of *o*-cresol and 2-PE it was used the Single Ion Monitoring (SIM) method, where the monitored ions were those with mass / charge ratio (*m/z*) of 108.00; 107.00; 91.00; 77.00 for *o*-cresol and 138.00; 94.00; 77.00 and 66.00 for 2-PE, with gain factor 2, MS Source 230 °C, and MS Quadrupole 150 °C. The ion used for quantification purposes were *m/z* 108.00 for *o*-cresol and *m/z* 94.00 for 2-phenxyethanol.

### Influence of the paper on the extraction of 2-PE

To determine the influence of different types of paper in the efficiency of quantification of 2-PE, a full factorial design was elaborated using the software Minitab 17<sup>®</sup>, with four factors in the levels discriminated in table 2, with two replicates.

The white paper used was a brand without chlorine and the recycled paper was a paper without bleaching process. The grammage of the paper was chosen based on the grammage available in the Brazilian book stores and specific for the different kinds of papers.

Samples of 1 cm straight lines of blue and black Bic Cristal ballpoint pen made on the two kinds and grammages of papers were cutted and extracted with 250  $\mu\text{L}$  of Methanol HPLC grade. After homogenization, the samples were injected in the same column, with the same conditions used in the validated method, previous described.

Table 3-2. Factors versus levels of the factorial design

Factor	Level
Kind of Paper	White
	Recycled
Paper Grammage	High
	Low
Ink Color	Blue
	Black
Ink Age	Recently applied
	One year
	Two years

Quantitative analyzes were made by comparing the ratio of 2-PE and internal standard obtained areas with the analytical curve obtained for 2-PE standards (with internal standard o-cresol constant concentration of 0,01  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) in concentrations of 0.05; 1.0; and 1.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Statistical analyzes were performed using Minitab 17 Statistical Software<sup>®</sup> (Minitab, Pennsylvania, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Method Validation

#### *Calibration Curve and Linearity*

The calibration curve showed linearity with an  $R^2$  of 0.999, and the regression equation is showed in the regression plot (Figure 01).

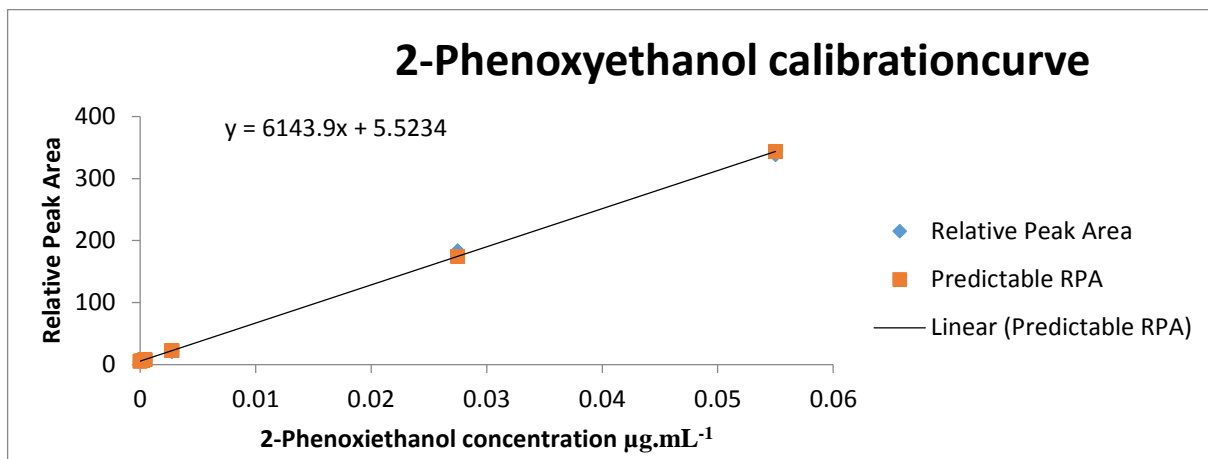


Figure 3-1. Phenoxyethanol calibration curve.

The Analysis of Variance of the regression was significant, with an F of 22857.31 (95% of significance). The residuals were homoscedastic and there were not observed outliers.

These results are consistent with the conclusion of Koenig *et. al.*<sup>19</sup>. In their article, those authors tested three different approaches of quantification of 2-PE: “solvent loss ratio R% (involves ratio of a sample and the same sample artificially aged with heat); “Relative Peak Areas between compounds (RPA)””; and “solvent loss ratio using RPA R%”. The authors concluded that the calculation of RPA values proved to be the most promising ageing parameter, and the R% was the least reproducible.

Very recently, Koenig and Weyermann<sup>28</sup> continued this study and concluded, testing seven ageing parameters for ink dating purposes: the phenoxyethanol quantity, relative peak areas (RPA), three solvent loss ratios (R%, R%\*, NR%) and two solvent loss parameters (R<sub>NORM</sub>, NR<sub>NORM</sub>), that natural ageing parameters (NR% and NR<sub>NORM</sub>) were not suitable ageing parameters for ink entries older than a few weeks. The PE quantity, R% and R<sub>NORM</sub> allowed to follow the ageing of the selected inks over the whole time frame and were identified as the most promising.

#### *Limits of Detection and Quantification*

The limits of detection and quantification (LoD and LoQ) calculated with the regression curve were  $0.00194 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $0.0064 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively.

The LoQ obtained in our quantification curve was lower than the result obtained by Koenig *et. al.*<sup>19</sup>, that was  $0.010 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for LoQ. However, the detection limits obtained for the present study was higher than  $0.003 \mu\text{g.mL}^{-1}$  obtained for LoD in Koenig *et. al.*<sup>19</sup> work. The limits of

reliable measurements of 2-PE are rarely mentioned in the literature, but an earlier paper from the same authors (Koenig *et. al.*<sup>20</sup>) also presented LoQ higher than the limits determined in this study.

### *Accuracy*

The accuracy of the method was reliable and fulfill the acceptance criteria of up to 10% of Maximum Error (E%) between the nominal and the determined values of 2-PE concentration (Table 3).

Table 3-3. Results for accuracy of 2-PE measurements

	Low Concentration (0.00275 µg.mL <sup>-1</sup> )			Medium Concentration (0.0275 µg.mL <sup>-1</sup> )			High Concentration (0.055 µg.mL <sup>-1</sup> )		
	Measured Conc.*	Theoretical Conc.	E (%)	Measured Conc.*	Theoretical Conc.	E (%)	Measured Conc.	Theoretical Conc.*	E (%)
1	0.00256	0.00275	6.89	0.0289	0.0275	5.19	0.054326	0.055	1.22

\* Mean of three replicates.

The accuracy in 2-PE measurements has a special importance because in the majority of the cases, the ballpoint ink manuscripts have low quantities of 2-PE, in the order of nanograms. Generally in trace level, the acceptance limits for accuracy are larger than 10%, however, even with the concentration of 0,00275 µg.mL<sup>-1</sup> of 2-PE, the E% was 6,89%, showing that the method is sensible and reliable.

### *Repeatability*

The repeatability was evaluated through the RSD (Relative Standard Deviation) for six replicates of three different levels of 2-PE concentration, for the same operator, in the same day and equipment (intra-assay); for six replicates of three different levels of 2-PE concentration for different operators, in the same day and instrument (inter-assay 1) and for six replicates of three different levels for the same operator and instrument, but in different days (inter-assay 2). The results reached the acceptance criteria for the repeatability (Table 4).

Table 3-4. Results for Repeatability of 2-PE measurements

RSD (%)								
Low Concentration (0.00033 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			Medium Concentration (0.0044 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			High Concentration (0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		
Intra-assay	Inter-assay 1 ( $\neq$ operator)	Inter-assay 2 ( $\neq$ day)	Intra-assay	Inter-assay 1 ( $\neq$ operator)	Inter-assay 2 ( $\neq$ day)	Intra-assay	Inter-assay 1 ( $\neq$ operator)	Inter-assay 2 ( $\neq$ day)
6.85	9.55	10	3.51	2.62	4.7	0.637	0.81	2.12

It can be seen that the RSD% obtained increases as the 2-PE concentration decreases, that is expected for too low concentrations. This results were compatible with those obtained by Koenig *et al.*<sup>20</sup> for repetitions of samples of ballpoint pen strokes and control solutions, analyzed using Thermal Desorption/GC/MS method, were the amounts of 2-PE detected were from 2.28 ng.cm<sup>-1</sup> (~0.136  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) to 16.81ng.cm<sup>-1</sup> (~1.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), much higher than the concentrations used in this study.

### *Robustness*

The robustness was evaluated by the relative difference between the concentration of 2-PE without changes in the method parameters and the concentration of 2-PE measured in each assay. For all treatments performed, this relative difference was not superior of 10% .

In the literature, the authors study ballpoint pen ageing using different pens. Although they studied a good number of individuals (from 30 to up to 85), the type of pen is not always reported.<sup>1</sup>

Sometimes, forensic community consider as proof of validation only the acceptance of a method by the courts, however if the method is probably too delicate to be reproduced correctly by scientific colleagues, so this should be strongly questioned. All dating methods should follow complete validation following adequate criteria.<sup>1</sup>

### **Influence of the paper on the extraction of 2-PE**

The concentrations of 2-PE were obtained after analyzing the assays organized by the Full Factorial Design, using the software Minitab 17. In the sequence, it was performed the analysis of results, obtaining the “Main Effect Plot for Response Variable” and the “Interaction Plot for

Response Variable”, where it could be seen the main effects and the interactions effects between the target characteristics (Figure 02 and 03). In the same way that the validation assays, the calibration curve had  $R^2 = 0,998$ , with homocedastic residuals.

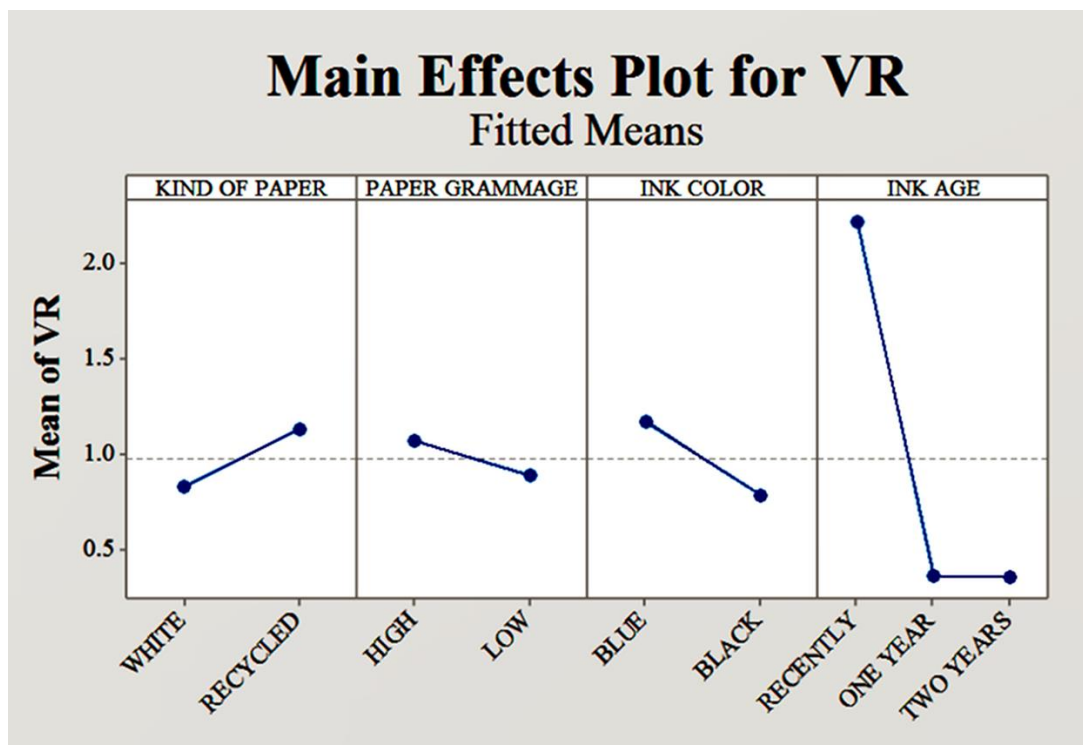


Figure 3-2. Main Effects of the variables analyzed: kind of paper, paper grammage, ink color and ink age. \*VR = Response Variable (2-phenoxyethanol concentration -  $\mu\text{g/mL}$ )

The Main Effects graph shows that the recycled paper has a positive effect, increasing the quantities of 2-PE extracted in relation to white paper. At the same time, the high grammage also has a positive effect on the extraction of 2-PE, possibly because a higher paper weight is related with a higher absorption of solvent.

Divergent from a previous work by Carvalho<sup>22</sup>, the black pens provided a lower quantity of 2-PE, having a negative effect, while the blue pens had a positive effect. However, this factorial study takes in account just one brand of pen (Bic Cristal), while the previous work analyzed several brands of pens, and the behavior had a positive bias in direction to more solvent in black pens<sup>22</sup>.

As expected, the recently strokes provided a greater quantity of 2-PE, and the quantities of strokes with one year and two years of age did not differ on the quantity of solvent extracted.

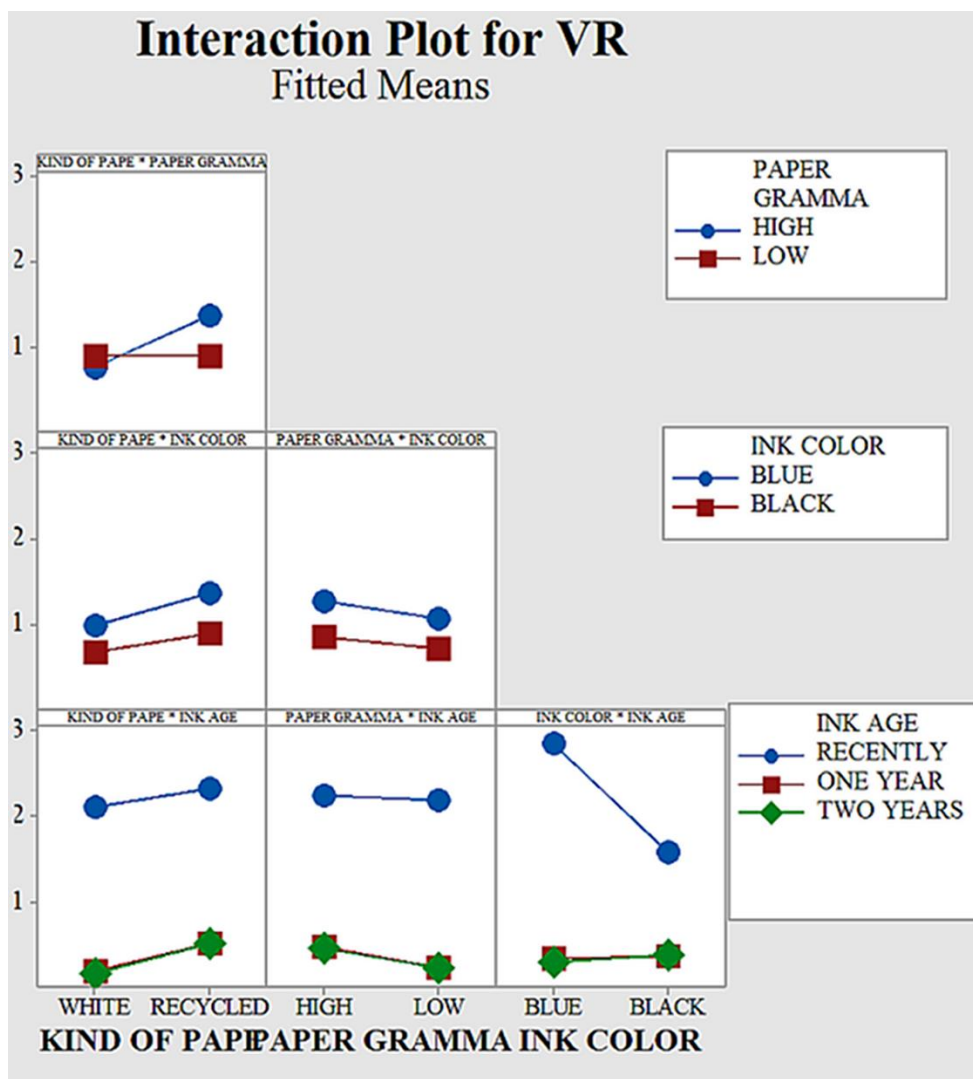


Figure 3-3. Graphs of interactions between the variables studied, showing the combined effects. \*VR = response variable (2-phenoxyethanol concentration -  $\mu\text{g/mL}$ )

The plot of interactions “kind of paper versus paper grammage” shows that there is a positive interaction when the paper is recycled and the grammage is high. This could be understood because the recycled paper has porous surface and the pulp of the paper can hold for more time the solvent, especially when the paper has a higher weight.

The plot of interactions “kind of paper versus ink color” shows that there is a positive interaction between the recycled paper and the color of the ink. The blue ink presents more quantity of 2-PE extracted than the black ink, when the paper is recycled; even if this occurs with the white paper, the difference is higher for recycled paper.

The high grammage of the paper also has a positive interaction effect with the color of ink, although this interaction is slightly positive, resulting in a difference of quantity of 2-PE slightly superior between blue and black ink for heavy paper than for paper with low grammage.

In the plots “Kind of Paper\*Ink Age”, and “Grammage of Paper\*Ink Age”, it can be seen that for one year and two year age there is no interaction effect of factors, because the lines are parallel. However, comparing the results of fresh samples (recently applied) with aged samples, there is an interaction effect. The recycled paper had a more positive effect on quantity of 2-PE extracted from aged strokes, in comparison with white paper, than the fresh strokes. For the fresh strokes, the recycled paper was less influent in the extraction of 2-PE than in aged strokes, proving one more time that recycled paper retain longer the solvents. The same conclusion can be made analyzing the “Paper Grammage\*Ink Age” plot, where the paper with higher weight provided more quantity of 2-PE extracted from old samples than for recently samples.

Looking closer to the plot “Ink color\*Ink Age”, there is interaction effect between the ink color and one year and two year age, although it is a slightly interaction. For blue samples, the amount of 2-PE detected at one year was higher than for two years. However, for the black pens, in the older samples there was no difference in the quantity of 2-PE, no matter the time. Between recently samples and aged samples, black pens showed less difference on the concentration of 2-PE than the blue pens, which even starting from a higher quantity of solvents the quantity of solvents detected after two years was below of the quantities detected for black ink.

What it can get from all these experiments is that the kind of paper exerts importance in the 2-PE quantification. Bügler *et. al.*<sup>12</sup> proposed threshold values calculated from the rate of desorption of 2-PE in different temperatures, to document dating. Initially these authors thought that the kind of paper had no influence in the method, but in their conclusions, they stated that it was observed an effect of the kind of paper. Aginsky<sup>10</sup> stated that two inks being compared must be written on paper of the same composition. According to this author, papers of different compositions sorbed significantly different amounts of a dye, and the reason for this is that the ability of paper to sorb ink dyes strongly depends on its composition – fiber composition: the larger the wood pulp content in the paper, the more the sorption of dye. However, Aginsky<sup>10</sup> concerned about the dyes, and not about the solvents. The present study confirmed statistically that papers with different compositions could alter the absorption and retention of a specific ink solvent.

Besides of that, as a document ages, both the ink and the paper age, and the effects of paper ageing on ink ageing may be small, but the document examiner should know how to delete this effect, doing relative comparisons.<sup>23</sup>

Recently, Koenig *et al.*<sup>20</sup> also concerned about the influence of paper in the ageing of ballpoint pens, looking on solvent evaporation. They studied the same ink in two different white papers with low grammage (80 g.m<sup>2</sup>), Xerox Business and Xerox Performer. Even being the same



paper weight and color, this authors found a small effect on values as these related on the Xerox Business were slightly higher than for Xerox Performer.

The present study observed that recycled paper and high grammage paper could influence greatly the quantification of 2-PE, so the requirement to the paper be the same for two ink lines to be compared should not be neglected.

## **CONCLUSIONS**

This study focused on the validation process of the quantification method for 2-PE, a solvent used in ballpoint pens, that is the main substance studied for the determination of a manuscript age in forensic documents. The verification of document paper support influence in the quantification of 2-PE it is of remarkable importance in order to avoid mistaken conclusions.

The method of GC/MS proved to be reliable for 2-PE detection and quantification, once it was successfully validated. Once the validation of a method is carried out satisfactorily, blind testing on realistic samples will be imperative, in order to check the reliability of the method under real casework conditions.

Relating to the experiment testing the influence of kind of paper on 2-PE concentrations, it can be concluded that the kind of paper exerts importance in the 2-PE quantification. In the literature, we found that two different sheets of white paper with the same weight can influence the evaporation of 2-PE and in consequence the pen stroke dating. Until now, the literature<sup>20, 24-26</sup> only used white paper with grammage varying from 75 up to 80 g.m<sup>2</sup> in ballpoint ink dating studies. However, with growth of initiatives aimed at the recycling and preservation of natural resources, recycled paper will became a routine paper in offices, and the ageing behavior of pen inks in this kind of paper should be studied.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank the Brazilian National Institute of Forensic Science and Technology and the Brazilian Federal Police.

## REFERENCES

1. Weyermann, C.; Almog, J.; Bügler, J.; Cantu, A.A.; *Forensic Sci. Int.*, **2011**, *210*, 52-62.
2. Andrasko, J.; *J Forensic Sci*, **2001**, *47*(2), 324-327.
3. Liu, Yi-Zi *et al.*; *J Chromatogr A*, **2006**, *1135*, 57-64.
4. Liu, Yi-Zi *et al.*; *J Chromatogr A.*, **2006**, *1125* (1), 95-103.
5. Confortin, D. *et al.*; *Journal of Physics: Conference Series*, **2010**, *231*, 012011
6. Freidenfelds, V.; Mekss, P.; *Latvian Journal of Chemistry*, **2012**, *3*, 242-248.
7. Williams, M.R. *et al.*; *Forensic Sci. Int.*, **2009**, *191*, 97-103.
8. Siegel, J.; Allison, J.; Mohr, D.; Dunn, J.; *Talanta*, **2005**, *67*, 425-429.
9. Grim, D.M.; Siegel, J.; Allison, J.; *J. Forensic Sci.*, **2002**, *47* (6), 1-9.
10. Aginsky, V.N.; *Int. J. Forensic Doc. Exam.*, **1998** (jul/sep), *4* (3), 214-230.
11. Aginsky, V.N.; *J Forensic Sci.*, **1993**, *38* (5), 1134-1150.
12. Bügler, J.H.; Buchner, H.; Dallmayer, A.; *J Forensic Sci*, **2008**, *53* (4).
13. Laporte, G.M.; Wilson, J.D.; Cantu, A.A.; Mancke, A.; Fortunato, S.L.; *J Forensic Sci*, **2004**, *49* (1), 155-159.
14. Weyermann, C.; Spengler, B.; *Forensic Sci. Int.*, **2008**, *180*, 23-31.
15. Weyermann, C.; Schiffer, B., Margot, P.; *Sci. Justice*, **2008**, *48*, 118-125.
16. ICH – International Conference on Harmonization, Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1996. Available at: [www.ich.org](http://www.ich.org). Accessed in Feb/2017.
17. BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do guia de validação de métodos analíticos. [www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm). Accessed in 08/11/2011.
18. Pinho, G.P., Neves, A.A., Queiroz, M.E.L.R., Silvério, F.O.; *Química Nova*, **2009**, *4*, 987-995.
19. Koenig, A.; Magnolon, S.; Weyermann, C.; *Forensic Sci. Int.*, **2015**, *252*, 93-106.
20. Koenig, A.; Bügler, J.; Kirsch, D.; Köhler, F.; Weyermann, C.; *J Forensic Sci.*, **2015**, *60*(S1), doi: 10.1111/1556-4029.12603.
21. Guedes, T.A., Ivanqui I. L., Martins, A. B. T.; *Acta Scientiarum*, **2001**, *23* (6), 1531-1535.
22. Carvalho, C.M.B.; *Revista Brasileira de Ciências Policiais*, **2014**, *5* (1), 65-96.
23. Cantu, A.A. ; *Int. J. Forensic Doc. Exam.*, **1996**, *2* (3), jul/sep.
24. San román, I.; Bartolomé, L.; Alonso, M.L.; Alonso, R.M.; Ezcurra, M.; *Analítica Chimica Acta*, (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.038>.
25. Locicero, S.; Dujourdy, L.; Mazzella, W.; Margot, P.; *Sci. Justice*, **2004**, *44* (3), 165-171.
26. Brazeau, L.; Gaudreau, M.; *J Forensic Sci*, **2007**, *52* (1), jan.

27. Diaz-santana, O.; Vega-Moreno, D.; Conde-Hardisson, F. *J Chromatogr A.*, 2017, *1515*, 187-195.
28. Koenig, A.; Weyermann, C. *Sci Justice*, **2018**, *58 (1)*, 17-30.
29. Carvalho, C.M.B.; Souza, D. Z.; Ortiz, R. S.; dos Reis, M.; Limberger, R. P. *Current Chromatography*, **2017**, *4*, 1-12.
30. Carvalho, C.M.B.; dos Reis, M.; Zamboni, A.; Ortiz, R. S.; Ferrão, M. F.; Vaz, B. G.; Limberger, R. P. . *Forensic Sci Add Res.* **2018**, *2(2)*, FSAR.000537.
31. BRASIL, Ministério Extraordinário da Segurança Pública, Polícia Federal, Diretoria Técnico Científica. **Sistema de Criminalística**. <https://ditec.pf.gov.br>. Accessed in 13/04/2018.



---

**7. CAPÍTULO 4**  
**Characterization, differentiation and dating of ballpoint pen ink strokes on paper**  
**using Infrared Spectroscopy with Total Attenuated Reflectance Accessory and**  
**multivariate statistic**



#### **7.1 MANUSCRITO 4**

A seguir encontra-se encartado o artigo intitulado “**Characterization, differentiation and dating of ballpoint pen ink strokes on paper using Infrared Spectroscopy with Total Attenuated Reflectance Accessory and multivariate statistic**”, o qual foi submetido para publicação na revista “Analytical Methods”, da Royal Society of Chemistry. O artigo em questão trata sobre a aplicação do método de Espectroscopia no Infravermelho utilizando o Acessório de Refletância Atenuada para aquisição dos espectros das canetas diretamente do papel com o objetivo de caracterizar, diferenciar e datar os traços utilizando Análise Estatística Multivariada.





## Characterization, differentiation and dating of ballpoint pen ink strokes on paper using Infrared Spectroscopy with Total Attenuated Reflectance Accessory and multivariate statistic

Carvalho, Carina Maria Bello de <sup>a, b, d</sup>, dos Reis, Monique<sup>b</sup>, Ortiz, Rafael Scorsatto<sup>a, d</sup>, Ferrão, Marco Flores<sup>c</sup>; Limberger, Renata Pereira<sup>b, d</sup>

<sup>a</sup>Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Brazilian National Institute of Forensic Science and Technology, 90160-030 Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author: e-mail address [carina.cmbc@dpf.gov.br](mailto:carina.cmbc@dpf.gov.br) (Carina M. Bello de Carvalho)

### Abstract

In criminal expertise routine, a kind of forgery is the adulteration of the date of emission of a document through the erasure and addition of another date with ballpoint pen of color similar to original. The chronology of manuscripts in a document has been a concern between scientific forensic community. Recently, Infrared spectroscopy (IR) and multivariate statistic analysis have been used to differentiate pens, but this paper aimed to develop an IR method that could also date a manuscript by multivariate statistic. Ballpoint pen lines from different brands made in different kind of papers (office white and recycled), with variable ages, were submitted to Infrared Spectroscopy with Total Attenuated Reflectance Accessory and the spectra obtained were analysed with multivariate statistical analysis and the Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA). This study leading to the conclusion that different kinds of paper did not influence in the characterization of the pens by IR-ATR, and it was able to characterize the variables that were responsible for the discrimination of ballpoint pens from different brands/models and for differentiation of samples of different ages. The HCA and PCA were able to group pens with similar ages, and differentiate lines recently apposed from lines aged. Between the loadings that are responsible for the differentiation, it was possible to identify absorption peaks from 2-phenoxyethanol, a solvent which evaporation from the ink lead to determine the line age. Further studies regarding other pen samples and multivariate statistisc approaches could be done to confirm this findings.

**Keywords:** ballpoint pen; document dating; infrared spectroscopy; Attenuated Reflectance; ink; Multivariate Statistic;

## 1. Introduction

A kind of adulteration in the date of emission of a document is the erasure of the manuscript and addition of another date with ballpoint pen of color similar to original. The chronology of manuscripts in a document has been a concern between scientific forensic communities. It is reported that around 80% of questioned documents requiring analysis contain ballpoint pen ink<sup>1</sup>.

The dyes used in blue and black ballpoint pens are basic dyes based on triarylmethane and acid dyes derived from diazo compounds or phthalocyanine, and both types are ionic in nature, with the basic and acid dyes generally containing iminium and sulfonate groups, respectively<sup>2</sup>. The dyes and pigments (organic and/or inorganic) make up about 25% of the formulation, while the solvent makes up about 50% by weight. The remainder is a variety of additives like resins, viscosity adjusters, antioxidants, surfactants, softeners, and lubricants<sup>3</sup>.

To determine each pen ink formulation in a way to differentiate and date the ink strokes, many destructive methods such as high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to Diode Array or Ultraviolet Detection<sup>4-8</sup> or Mass Spectrometry detection<sup>9,10</sup> have been used, and more recently high resolution mass spectrometry (HMRS) like Orbitrap<sup>11</sup> and Time-of-Flight Second Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS)<sup>12</sup>. The destructive analysis starts by removal of a small section of the ink line followed by solvent extraction of the ink<sup>13</sup>. However, some documents are too much important to allow cutting a piece of the paper, and it is recommended the option of non-destructive methods as Infrared Spectroscopy with Total Attenuated Reflectance Accessory (IR-ATR). Besides of that, although many components of the ink may be collected following analysis by certain chemical techniques, the ink itself cannot be recovered in its original form<sup>14</sup>.

Few non-destructive methods have been used to characterize and differentiate ballpoint pen inks, using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFTS)<sup>2, 14, 15</sup>; IR-ATR<sup>2, 16, 17</sup>; Micro-FTIR (Fourier Transform Infra Red) spectroscopy<sup>18, 19</sup>; Raman spectroscopy<sup>19</sup> or Ultraviolet-visible (UV-vis) and Near-infrared (NIR) chemical imaging methods<sup>20, 21</sup>, to analyze the chemical composition of ballpoint pen ink.

Wang *et al.*, Payne *et al.*, Zieba Palus and Kunicki, differentiated the ballpoint pen inks with good precision using a pattern recognition system and the discriminant power, while Silva *et al.*, Thanasoulis *et al.*, Adam *et al.*, Senior *et al.*, and Kher *et al.* invested in multivariate statistics to differentiate the pens, obtaining good results<sup>2, 13, 16, 19-24</sup>.

A chromatogram or a spectrum may be visualized as a pattern in multivariate space. Samples displaying similar patterns cluster together and those displaying dissimilar patterns are located away from each other in multivariate space. By knowing this concept, the Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of each ink mass spectrum can be used to differentiate the ballpoint pens<sup>2</sup>.

Many studies subjecting ballpoint pens characterization have been conducted with ballpoint pens from European manufacturers, however the pens in Brazilian market have different manufacturers and because of this, different formulations.

Microspectrometry<sup>19</sup> is a method that was applied to achieve differentiation between ballpoint pens; some authors tried to improve the discrimination power of microspectrophotometry on transferring a small area of inked fibres on a slide and smearing using an engraving tool or immersing in a mounting medium, but the type of paper influenced the results when the blue and black ink traces on white or brown paper were smeared on glass slides<sup>25</sup>.

Some researchers are attempting to differentiate ballpoint pen inks by FTIR or UV/VIS of inks sampled direct from the pen cartridge or extracted from paper<sup>14, 15, 22-24</sup>, and some other researchers published papers regarding FTIR of ballpoint ink pens analyzing them directly on paper<sup>2, 12, 16, 18, 19</sup>. From those, only Silva *et al.* concerned about the paper influence in FTIR-ATR spectra of the ink<sup>16</sup>, and more recently, Lee *et al.* observed that FTIR-ATR is a suitable method for determining intersecting lines sequence because de IR penetrates only a short distance into the ink sample, so that the spectra would contain less contribution from the paper background<sup>12</sup>.

Other attempts to analyze nondestructively ballpoint ink on paper using a FTIR microscope were also unsuccessful, because strong absorption from de paper tended to mask any absorption contributed by the ink<sup>14, 25</sup>.

Concerning on this, the present study aimed to apply multivariate statistic on spectra data from FTIR-ATR of ballpoint pen strokes in different papers, in a way to clarify if the paper do influence the spectra of inks.

Besides of the differentiation of ballpoint inks, the dating of the manuscripts also is a challenge to forensic researchers. Until now, only Senior *et al.* used Principal Component Analysis (PCA) of UV/VIS Spectroscopy with a dating objective<sup>13</sup>. However, they only did the dating on ballpoint ink collected directly from the cartridge and from reference dyes<sup>13</sup>. Silva *et al* 2013, Feraru *et al.*, Wang *et al.* and more recently Sharma and Kumar identified in the ink spectra absorption peaks from 2-phenoxietanol and other solvents, which evaporation from the ink stroke could lead to dating of the manuscript<sup>16, 17, 22, 26</sup>.

This study aimed to perform analysis of ink strokes in paper, of several models of blue and black ballpoint pens, by FTIR-ATR, in a way to differentiate the pens by multivariate statistic (PCA and HCA). For the most representative pens in groups formed by PCA, this study follow the ageing of these pen strokes, acquiring IR-ATR spectra in each date and performing multivariate statistic (PCA) to differentiate the pens by date. The contribution from the paper background for the FTIR-ATR spectra was also tested.

## 2. Materials and methods

Thirty-seven different brands/models of blue ballpoint pens and twenty-seven different brands/models of black ballpoint pens (Bic, Stabilo, Injex, Faber Castell, Pilot, Cis, Uni, BRW, Staedler, Molin, Office, Mon Ami, Jocar, Tilibra, Pentel, Ita, Tris, Compactor, Masterprint, Paper Mate, NewPen) were applied as strokes, with a ruler, on white office paper (75 g/m<sup>2</sup>) and on recycled office paper (75 g/m<sup>2</sup>). The brands of pens analyzed were chosen because they are the most sailed in Brazilian markets (Tables 01 and 02). Some models of pens had two individuals of different batches tested, to see if the method could group these individuals despite the manufacture batch.

The strokes freshly applied were analysed on a Fourier Transform Infrared Spectrometer Nicolet 380 (Thermo), with an Attenuated Total Reflectance device, and the spectra obtained (three replicates) were analyzed through multivariate statistic (Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA). The acquisition parameters of the spectra were 32 scans made from 4000 to 525 cm<sup>-1</sup>, with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. The data were then processed with Chemostat software<sup>27</sup> and some representative brands/models (eight blue pens and six black pens), of each formed group of similar formulation, were chosen to be analyzed, using the same method: recently applied, after 14 days (for blue pens only), 7 months, 1 year (for blue pens), 2 years and 2 years and 3 months (for blue pens) or 2 years and 6 months (for black pens). Three replicates of spectra of each individual pen obtained in each date were analyzed together by multivariate statistic (performing PCA). During the ageing, the samples were stored in darkness, in a controlled temperature of 20 °C and 30% of relative humidity.

Additionally, to evaluate the influence of the support paper in the spectra of ballpoint pen ink line, FTIR-ATR spectra of different papers (Table 03) were obtained in six replicates, and these spectra were compared with the Principal Component Loadings obtained in the multivariate analysis of spectra from ballpoint pen lines made in each kind of paper. Freshly applied blue and black lines were made in Paper 14 (see Table 03), and there were analyzed blue lines with 2 years and 3 months of age made in paper 1 and in paper 2; and black lines with 2 years and 3 months of age made in paper 6 and in paper 8.

Another experiment was performed using the same brand/models ballpoint pens, and the ink collected directly from the pen cartridge, with a needle, was analyzed in an Fourier Transform Infrared Spectrometer Nicolet iS50 (Thermo), with an Attenuated Total Reflectance device, installed at the Customer Experience Centre, in Thermo Fischer Scientific-São Paulo, Brazil. The spectra of all pens analyzed were then processed with Chemostat software<sup>27</sup> and the HCA results were compared with

the HCA results obtained for the spectra of the same pens but apposed as lines in the papers, as described previously. This experiment is important to confirm if the power of discrimination of different ballpoint pens by FTIR-ATR using multivariate statistics is compatible between ink from the pen cartridge and ink lines on a paper support.

Table 4.1. Blue pens Analyzed

Pen code	Brand/model
A1	Bic ecolutions round stic
A2	Bic fine point
A3	Bic cristal pocket
A4	Faber Castell trilux 032 Medium
A5	Faber Castell trilux 035 Fine
A6	Faber Castell EC-07
A7	Faber Castell Medium
A8	Compactor 07 fine
A9	Compactor TOP2000
A10	Pilot BPS 0.7 AZ
A11	Injex Pen new
A11.2	Injex Pen used
A12	BRW new
A12.1	BRW used
A13	Pilot Super Grip 1.0
A14	Tris Hit Blue
A15	Tris Exec 1.0
A16	CIS Silver Stick 1.0
A17	Pentel Star V 0.7– India
A19	Uni Laknok 1.4 (Japan)
A20	Office
A21	Stabilo Excel 828M
A22	Stabilo Tropikana (Germany)
A23	Paper Mate Kilometrica 100 1.0
A24	New Pen Clic
A25	Master Print
A26	Bic Cristal
A27	Unknown brand
A28	Compactor Economic
A29	Pilot Super Grip nova 1.6
A30	Bic Atlantis 1.6
A31	Tilibra super BP 1.0
A32	Uni SAS Fine (Japan)
A33	Uni Lakubo 1.0 (Japan)
A35	Stabilo bille 508 (Germany)
A36	Molin CR-45 (France)

Table 4.2. Black pens analysed.

Pen Code	Brand/model
P1	Bic cristal pocket
P2	Bic ECOLUTIONS round stic
P3	Bic Diamond
P4	Bic cristal
P5.1	Injex Pen used
P6	Faber Castel trilux 032 Medium
P7	Faber Castell fine point
P8	Pilot BPS 0.7 fine point
P9	Stabilo Excel 828 M
P10	BRW new
P10.2	BRW used
P11.1	Molin (France)
P12	Uni Laknok 0.7 fine point
P13	Ita
P14	Cis Neotip 1.0
P15	Pentel Star V 0.7 – India
P16	Paper Mate Kilometrica 1.0
P17	Jocar Office
P18	Faber Castel trilux 035 fine
P19	Bic Atlantis 1.6
P20	Pilot Super Grip 1.6
P21	Tilibra Super BP 1.0
P22	Staedler Ball 432 M
P23	Molin 0.7 trion (France)
P25	Uni SAS Fine – Japan
P26	Stabilo M Bille 508 (Germany)
P27	Cis Speed 1.0

Table 4.3. Kind of papers analysed.

Paper Code	Characteristics
Paper 1	White office paper 75 g/m <sup>2</sup> (Chamex®)
Paper 2	Recycled office paper 75 g/m <sup>2</sup> (Chamex®)
Paper 6	White office paper 75 g/m <sup>2</sup> (Premiatto®)
Paper 8	Recycled office paper 80 g/m <sup>2</sup> (Beller®)
Paper 14	White office paper 75 g/m <sup>2</sup> (One®)

### 3.Results and Discussion

In relation to the paper influence experiment, the results showed that the loadings of the ballpoint pens PC1, PC2, PC3, PC4 and so on, did not reproduced the absorption peaks of the paper spectra for all kinds of papers tested (Figure 01). These findings assure that the paper did not influence in the spectra acquisition for FTIR-ATR analysis, accordingly with the findings of Lee *et al.*<sup>12</sup>. Silva *et al.*<sup>16</sup> also tested three different papers to evaluate influence of paper on predictions for the Linear Discriminant Analysis test set, but they used a different approach to evaluate this influence<sup>16</sup>

Once the paper showed not to have effect in the spectra of pen strokes, the spectra collected from the ballpoint pen strokes freshly applied in the paper 14 (White office paper 75 g/m<sup>2</sup> One®) were subjected to multivariate statistic analysis. Before performing PCA and HCA, the data was pre-treated with Savitzky-Golay transform and normalized by range 0-1.

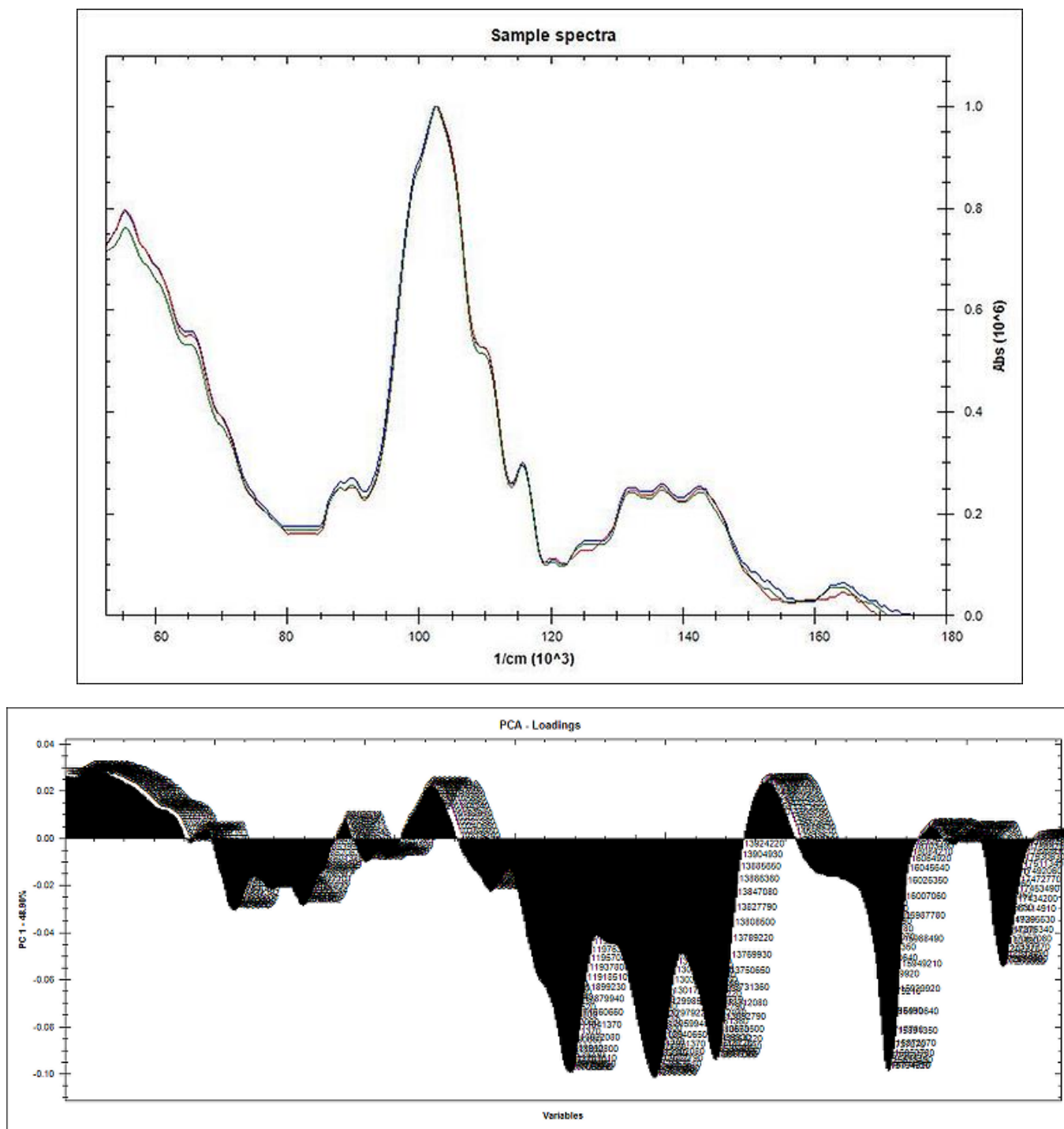


Figure 4.1. Illustrative image of paper influence experiment. Above: spectra of Paper 14. Below: PC1 loadings of blue pens.

Most of the variability in the region between 4000 and 2000  $\text{cm}^{-1}$  is due to atmospheric constituents such as water vapor and carbon dioxide<sup>2</sup>. Typical cellulose bands corresponding to C-H and O-H stretching can be found between 3300 and 2900  $\text{cm}^{-1}$  and print papers may contain spectral features by the presence

of additives, such as calcium carbonate (around 1430, 875 and 712  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>14, 16</sup>.

Some authors that analyzed ink directly on paper substrate had taken the paper spectra and subtracted it from the ink stroke spectra, to avoid the effect of paper background<sup>15-18</sup>. In the

present study, this subtraction of spectra was attempted; however, it was found that this process lead to a loss of important information from the spectra, once some absorption bands from paper coincide with absorption bands from ink dyes.

The most important region for ink analysis is from 1800  $\text{cm}^{-1}$  and 650  $\text{cm}^{-1}$ , so this study was concentrated on this range.

For the blue pens recently applied, the PC1 versus PC2 plot accounted for 64,04% data variance, and with the others PCs until PC5 accumulated 90,31% of the variability. Along with this, the HCA presented five great hierarchical clusters and two differentiated samples (A19 – Unilaknok and A1 – Bic Ecolutions) (Figure 02).

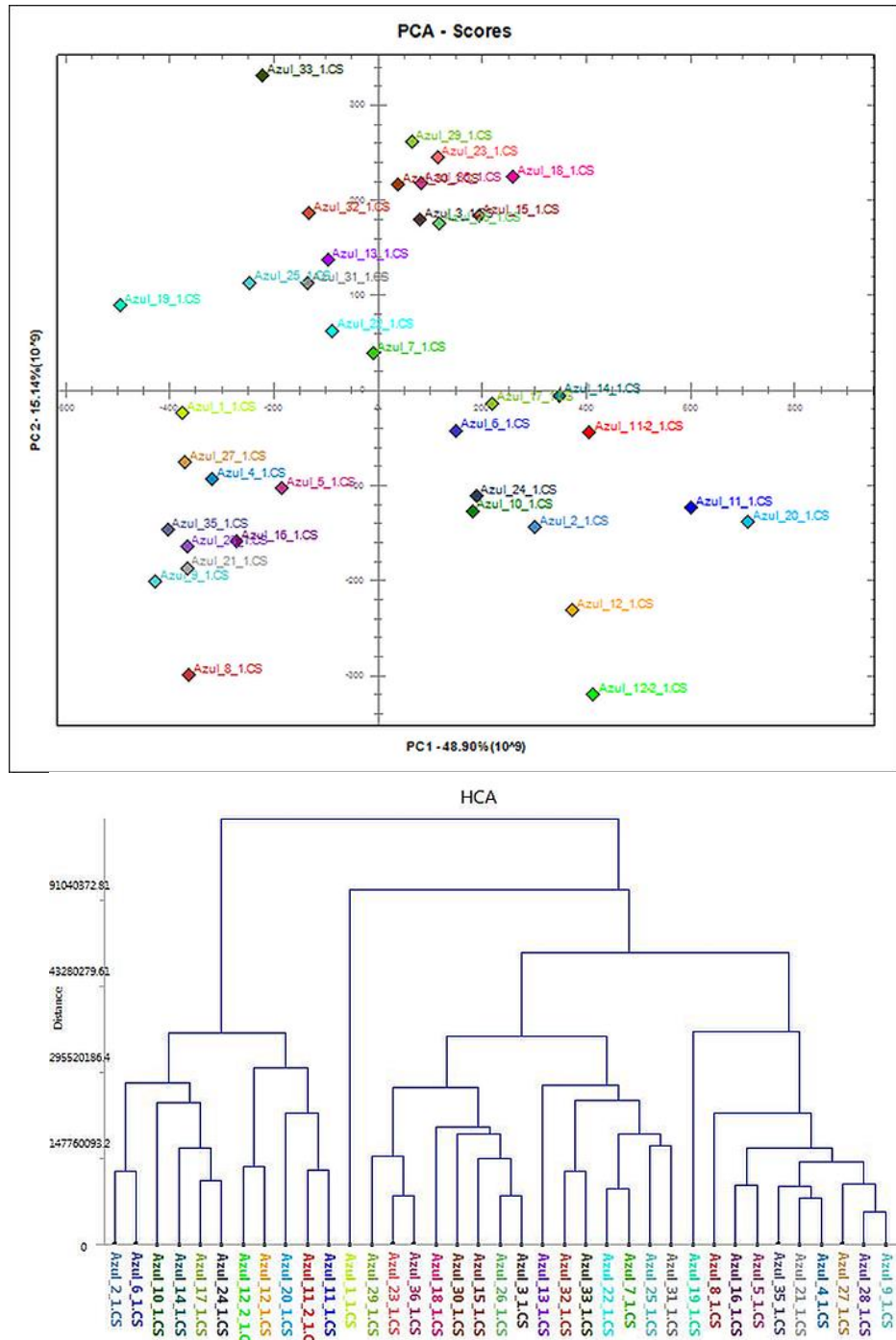


Figure 4.2. PC1 versus PC2 and HCA results for blue pens recently applied.

The HCA showed that the majority of the clusters were formed by pens from same brand and/or similar pictorial aspect of the ink (i.e. color, texture), so the method was able to differentiate the individuals but at the same time cluster the pens with great similarity (same brand/similar model).

For the black pens recently applied, the PC1 versus PC2 plot accounted for 71,41% data variance, and with the others PCs until PC5 accumulated 91,6% of the variability, a result very similar to the blue pens. Along with this, the HCA presented four great hierarchical clusters and two differentiated samples (P4 – BIC Cristal and P13 – Ita) (Figure 03).

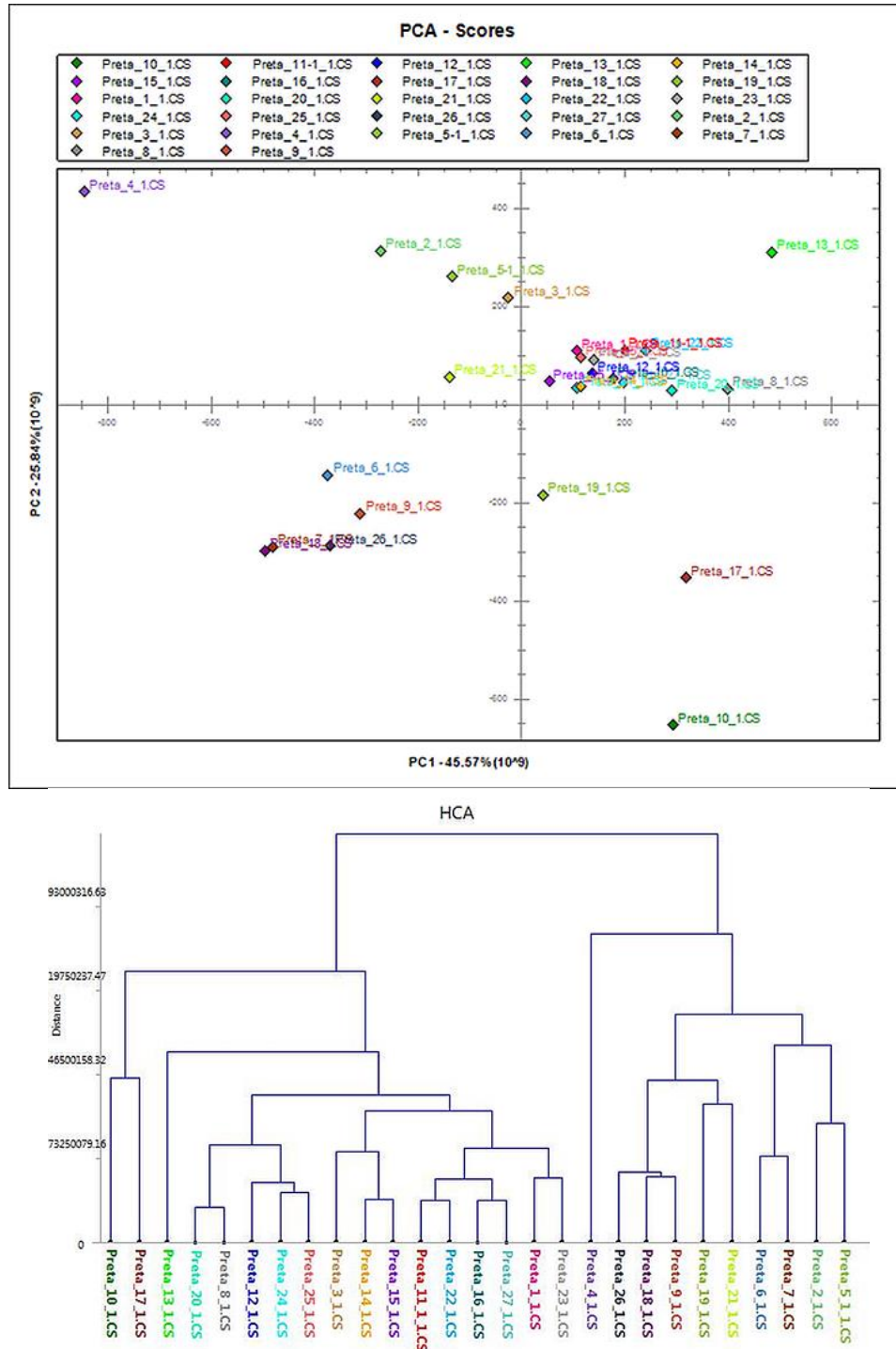


Figure 4-3. PC1 versus PC2 and HCA results for black pens recently applied. \*Preta = means “black pen”



In the same way as the blue pens, the black pens HCA showed that the majority of the clusters were formed by pens from same brand and/or similar pictorial aspect of the ink (i.e. color, texture) and at the same was able to differentiate the individuals.

Looking at the results of the HCA obtained with the spectra of the same blue and black pens inks collected directly from the pen cartridge (figure 4), and analyzed in the FTIR-ATR Nicolet iS50 (Thermo), the HCA showed that the grouping of pens remained the same, at least on the majority of the clusters formed. It can be observed, for example, that the pens A26 and A1 (both BIC brand), A32 and A33 (both Uni brand), P12, P24 and P25 (both Uni brand) clustered together in both methods.

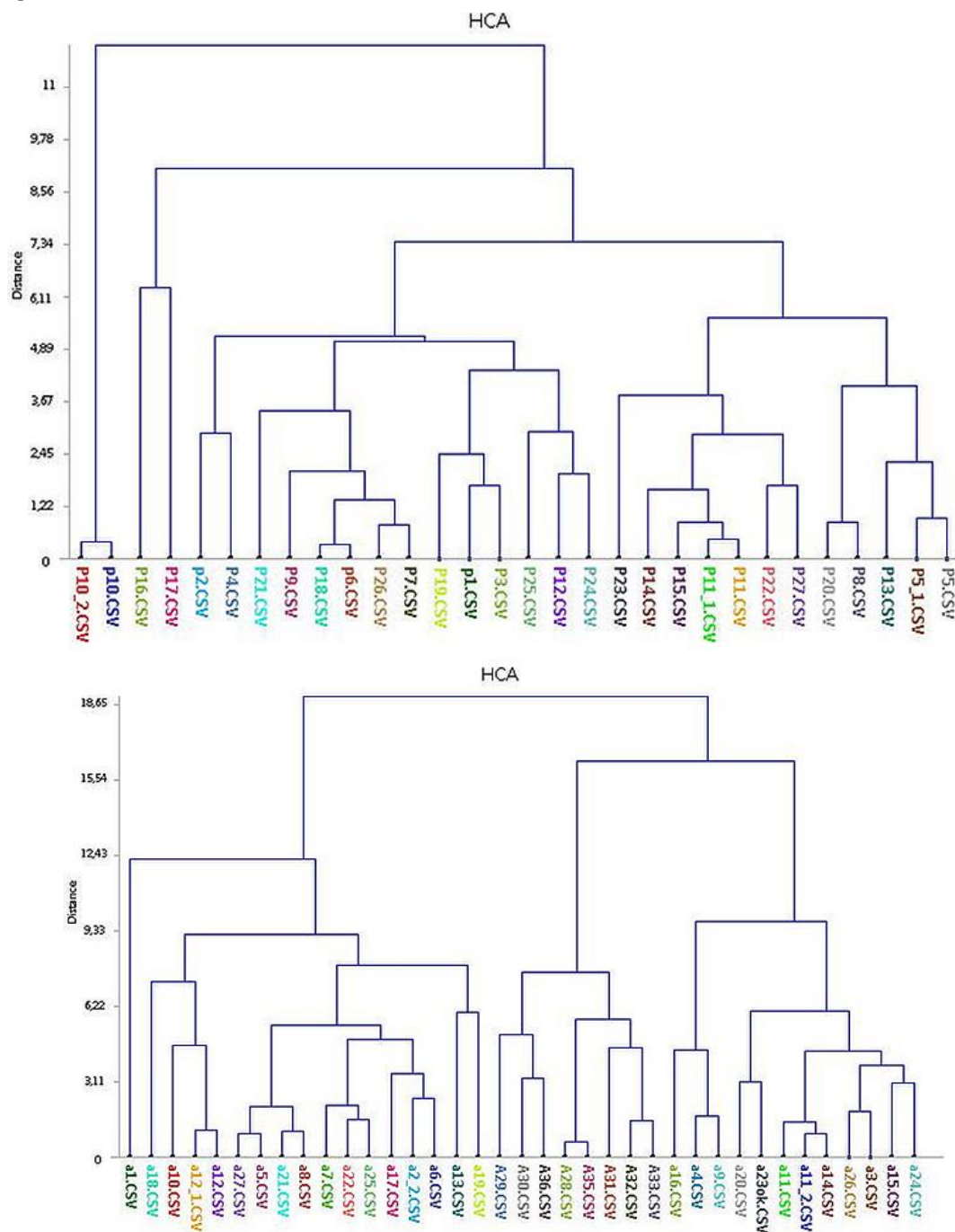


Figure 4-4. HCA results for black pens (P) (above) and blue pens (A)(below) sampled directly from the cartridge.

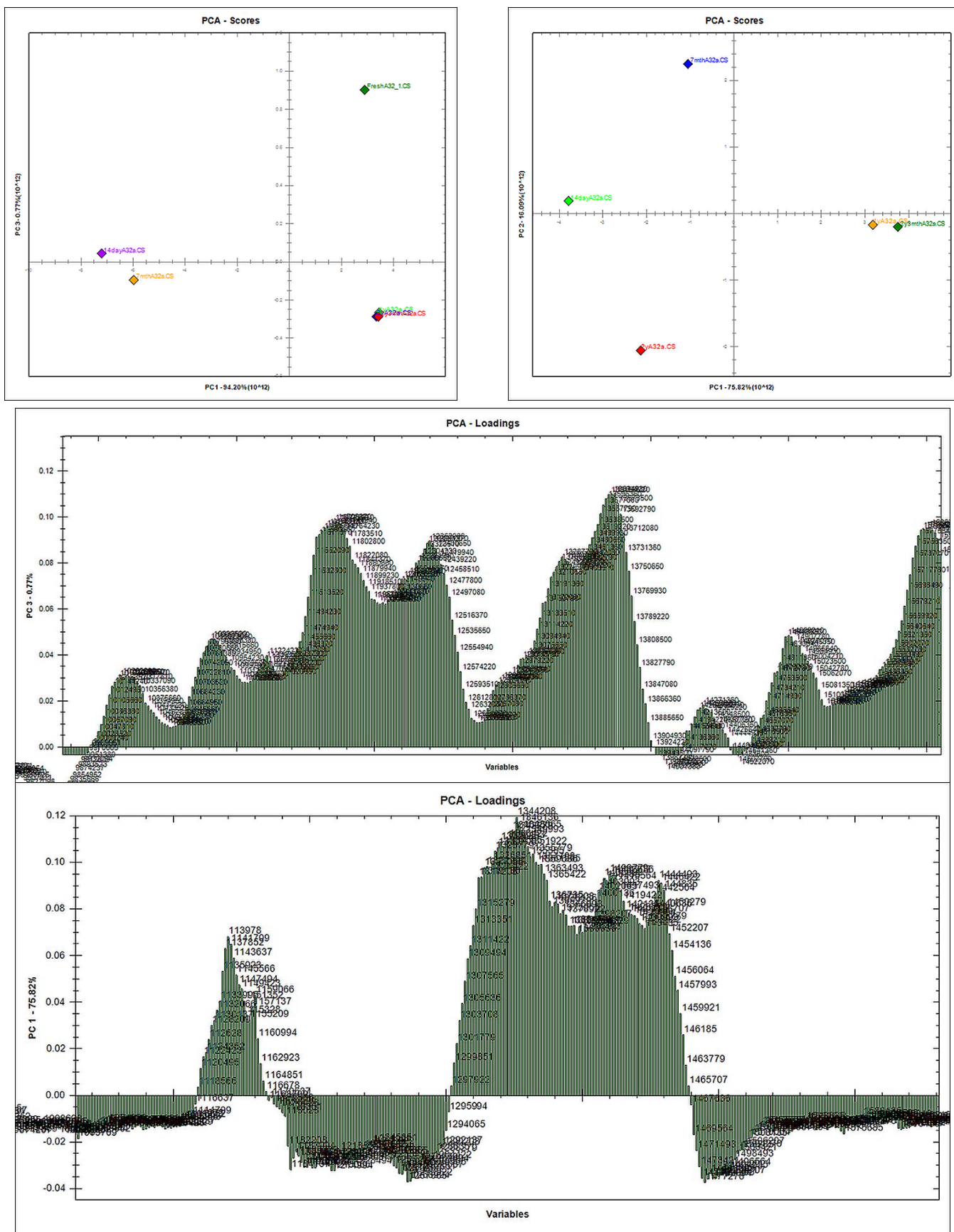
The pens that had two individuals of different batches tested (A11, A12) clustered together despite the manufacture batch, for both methods.

Other examples of pens that clustered together for both approaches were the Pilot pens P8 and P20; P11, P14, P15, P22 and P27; A36, A30 and A29.

These results confirm that the FTIR-ATR can differentiate or grouping the pens the same way, even if it is collected the bulk ink spectra or the pen line in a paper. Senior *et al.* performed PCA analysis of spectra from 10 blue ballpoint pen from different factories, and have encountered difficulties to discriminate all the pens<sup>13</sup>. Kher *et al.* achieved the complete separation of 17 pen pairs and 11 pen pairs partially resolved, using PCA analysis, and using Linear Discriminant Analysis approach, obtained a correct classification of 62,5% of the pen samples<sup>2</sup>. Silva *et al.* achieved 100% of correct classification for the test set, using LDA approach<sup>16</sup>. However, to perform LDA, the PCA and classes of samples have to be known.

From the hierarchical clusters formed in the HCA of freshly applied pen strokes, it were chosen pens representatives of each cluster, to perform the multivariate analysis of these pens with different ages, in a way to develop a suitable method to date a ballpoint pen manuscript in real forensic cases. The pens chosen were A26, A1, A12, A17, A21, A31, A19 and A32 for blue pens, and P1, P10, P6, P16, P15, P9, P21 and P25 for black pens. For blue pens, the PCA was able to resolve the samples from each age, with the first three PCs describing more than 95% of the variability.

Looking carefully at the loadings, it could be seen that the PCs where the more recently samples were located were the ones that had the absorption bands typical from solvents like 2-phenoxyethanol and benzyl alcohol. The peaks at  $695\text{ cm}^{-1}$ ,  $750\text{ cm}^{-1}$  (mono-substituted aromatic bending vibration),  $1235\text{ to }1294\text{ cm}^{-1}$  strong band (aromatic ethers Ar-O),  $1456\text{ to }1497\text{ cm}^{-1}$  (C=C aromatic vibration),  $1025\text{ to }1048\text{ cm}^{-1}$  (primary alcohol C-OH) and  $1587\text{ cm}^{-1}$ , are characteristic of 2-phenoxyethanol and related solvents<sup>17, 26</sup>. In the score plot of the blue pens that have samples "freshly applied", once the fresh ink have much solvents, the PCA reverberate more the difference between fresh samples and the others. Removing the fresh samples from the set and repeating the PCA analysis, the PCA was able to discriminate the samples "14 days", "7 months" and sometimes "1 year" from the other samples older (2 years; 2 years and 3 months). Figure 05 illustrates the results with fresh sample and removing fresh sample, for the pen A32 (UniSAS), and it can be seen that for A32pen, the 1 year sample did not differ from older ones.



Some brands of pens differentiated well the “1 year” sample from the older “2 years” and “2 years and 3 months”, while for other brands, it was not possible to differentiate the “1 year” sample from the oldest ones. This result was comparable with the results observed for samples analyzed in a recent study of our research group performed with the same samples (data not published yet), where it was determined the 2-phenoxyethanol concentration in blue and black ballpoints aged for 4 months, 18 months, 27 months and 36 months<sup>28</sup>. In this study, some samples with 18 months ages did not present a 2-phenoxyethanol concentration statistically different from older ages. Table 04 presents a resume of the results for blue pens.

Table 4.4. Blue pens Analyzed by age

Pen code	PCA Results With fresh samples	PCA Results Without fresh samples
A1	PC1 x PC2 Only resolved Fresh sample	PC1xPC2 resolved recent ink in PC1 negative Loadings of solvents in PC1 and PC3 negative
A12	PC2 x PC3 resolved fresh ink in PC3 positive Loadings of solvents in PC3 positive	PC1 x PC2 resolved earlier from older samples Recent ink in PC1 negative Loadings of solvents in PC1 negative
A17	PC2 x PC3 resolved Fresh ink in PC2 negative Loadings of solvents in PC2 positive	PC2 x PC3 resolved Recent ink in PC3 negative Loadings of solvents in PC3 negative One year sample <u>differed</u> from older ones
A19	PC1xPC2 resolved fresh ink in PC2 negative Loadings of solvents in PC2 negative	PC1 x PC2 resolved earlier from older samples Recent ink in PC1 negative Loadings of solvents in PC1 negative
A21	PC1 x PC2 resolved Fresh ink in PC1 positive Loadings of solvents in PC1 positive	PC1 x PC2 resolved all samples each one in a PC square Loadings of solvents in PC1 negative
A26	PC2xPC3 resolved well fresh ink from older ink Loadings of solvents in PC3 positive and PC2 negative	PC1xPC4 resolved 14days sample from de others Loadings of solvents in PC1 negative and PC4 positive
A31	PC1xPC2 resolved fresh and 14 days ink in PC2 negative Loadings of solvents in PC2 negative	PC1xPC4 resolved 14days sample from de others Loadings of solvents in PC1 negative and PC4 positive 1year sample <u>did not differ</u> from older samples
A32	PC1xPC3 resolved fresh ink in PC1 and PC3 positive and PC2 x PC3 resolved Fresh an 14 days ink Loadings in PC3 positive, 1year sample did not differ from older samples	PC1 x PC2 resolved earlier from older samples Recent ink in PC1 negative and PC2 positive 1year sample <u>did not differ</u> from older samples

Performing the HCA for some blue pens recently applied (A1, A12, A17, A21, A23, A26, A31 and A32) and comparing it with the HCA performed for the 14 days, 7 months and 2 years old pens, some changes in the clustering of the pens can be seen (Figure 06a, 06b and 06c). While fresh pens clustered together in two groups, after 14 days, the ageing affected more the pens A12,

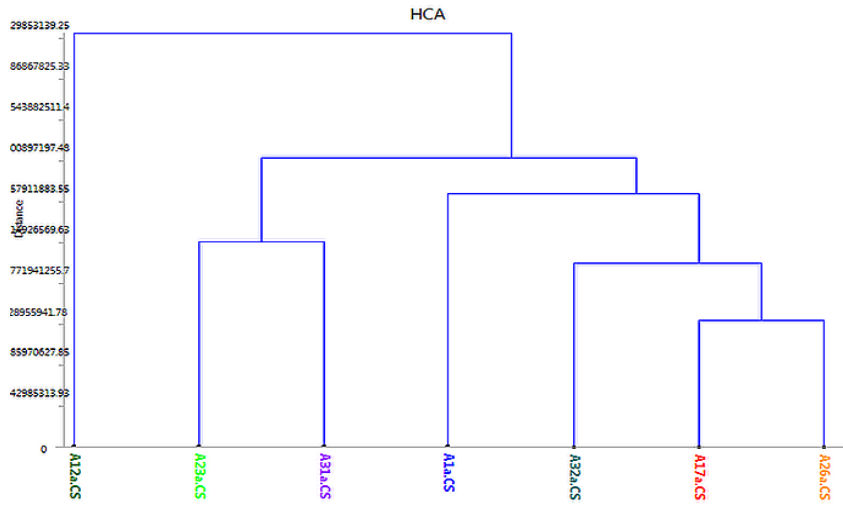


Figure 4.6a. HCA results for blue pens after 14 days

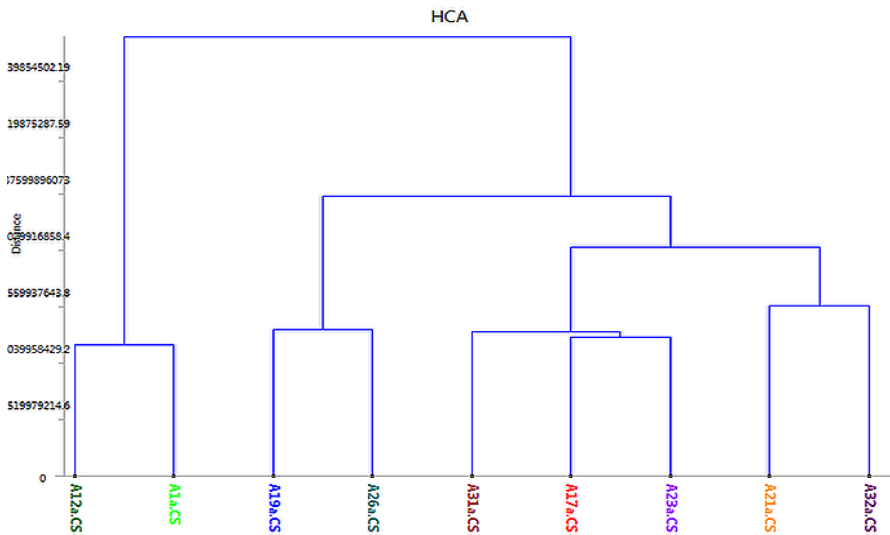


Figure 4.6b. HCA results for blue pens after 07 months

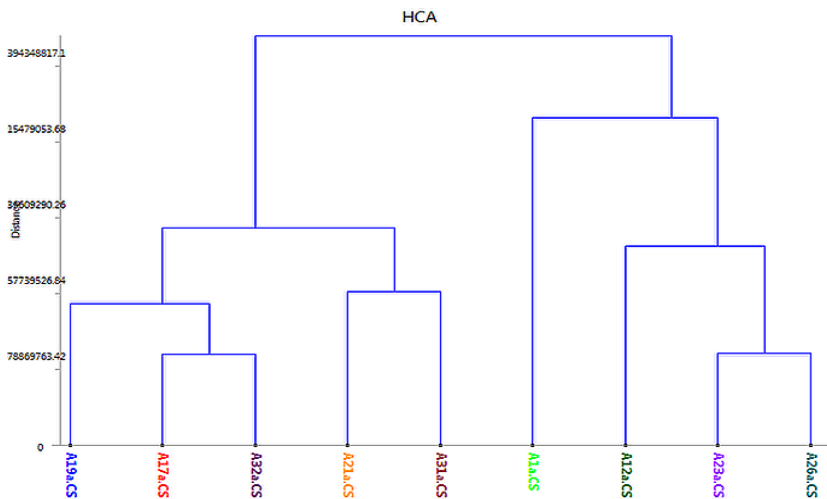


Figure 4.6c. HCA results for blue pens after 2 years.

A1 and A23. After 7 months, the clusters and the Euclidian distance between the pens increased, though some pens that were apart with 14 days, regrouped with 7 months.

After two years, the A1 resulted more dissimilar to the others, and two great clusters were formed: cluster 1 (A26, A12 and A23 plus A1) and cluster 2 (A31, A21, A32, A17, A19). After two years, the pens became more similar, especially the ones made in Brazil. The inconstancy in HCA results through different ages could be due not just to the solvent evaporation, but to the ageing behavior of other ink components, like polymerization of resins and decomposition of triarylmethane dyes. Wang *et al.* observed a decrease in the absorption bands 1584, 1494, 1360, 1296, 1245, 1094 and 1055  $\text{cm}^{-1}$  attributed to the changes in the epoxy resin and volatilization of solvents; the signal 1245  $\text{cm}^{-1}$  almost disappeared after artificial ageing at 150 °C for 24 min<sup>22</sup>.

For the black pens dating analysis, it were collected spectra of recently applied, 7 months, 2 years and 2years and 6 months. The PCA was able to resolve the samples from each age, with the first two or three PCs describing more than 98% of the variability. Illustration of the findings are shown in Figure 07a and 07b, with PCA and loadings for BRW pen (P10). Table 5 also presents a resume of the results for black pens. These were very constant and similar for all samples, in which PC1xPC2 resolved fresh ink in PC1 positive, and the older samples in PC1 negative. The absorption peaks from solvents like 2-phenoxyethanol were more pronounced in PC1 positive and PC2 negative. The PC2xPC3 scores resolved samples with different ages, each one in a PC square, and PC3 did not influenced fresh samples; however, the solvent absorption peaks could not be attributed as loadings counting for the difference of the samples in PCA. Nevertheless, these results should be take into account because other pen ink components as resins and dyes that changes with time, could be the loadings that differentiate the samples in PCA.

The only black pen that provided a good result removing the samples recently applied from the PCA was Bic Cristal (A1). PC1 *versus* PC2 (Figure 8a) were able to resolve the 7 months ink in the positive square of the PCs, and the loadings from solvents could be seen in PC1 and PC2 positive (Figure 08b).

In the same way that the blue pens, performing the HCA for few black pens recently applied (P1, P9, P10, P15, P16, P20, P21, and P25) and comparing it with the HCA performed for the 7 months and 2 years old pens, some changes in the clustering of the pens can be seen. After 7 months, P10 and P25 differed more than the other pens. After two years, the ageing of the pens resulted in a HCA with two clusters, in which the pens made in Brazil tended to cluster together.

Table 4.5. Black pens Analyzed by age

	<b>PCA Results With fresh samples</b>	<b>Other relevant PCs</b>
P1	PC1xPC2 resolved fresh ink in PC1 positive Loadings of solvents in PC1 positive	<u>Without fresh samples:</u> PC1xPC2 resolved recent ink in PC1 and PC2 positive Loadings of solvents in PC1 and PC2 positive
P9	PC1xPC2 resolved fresh ink in PC1 positive Loadings of solvents in PC1 positive	PC2 x PC3 resolved all samples each one in a PC square. These PCs did not influence in fresh sample
P10	PC1xPC2 resolved fresh ink in PC1 positive Loadings of solvents in PC1 positive	PC2 x PC3 resolved all samples each one in a PC square. PC3 did not influence in fresh and 7 months sample
<b>P15</b>	<b>PC1 x PC2 resolved Fresh ink in PC1 positive Loadings of solvents in PC1 positive</b>	<b>PC2 x PC3 resolved all samples each one in a PC square. These PCs did not influence in fresh sample</b>
P16	PC1 x PC2 resolved Fresh ink in PC1 positive Loadings of solvents in PC1 positive	PC2 x PC3 resolved all samples each one in a PC square. These PCs did not influence in fresh sample
P21	PC1 x PC2 resolved Fresh ink in PC1 positive Loadings of solvents in PC1 positive and PC2 negative	PC2 x PC3 resolved all samples each one in a PC square. PC3 did not influence in fresh sample Loadings of solvents in PC2 negative
P25	PC1 x PC2 resolved Fresh ink in PC1 positive Loadings of solvents in PC1 positive and PC2 negative	PC3 did not influence in fresh and 7 months samples Loadings of solvents in PC2 negative
P6	PC1xPC2 resolved fresh ink in PC1 positive Loadings of solvents in PC1 positive	NA

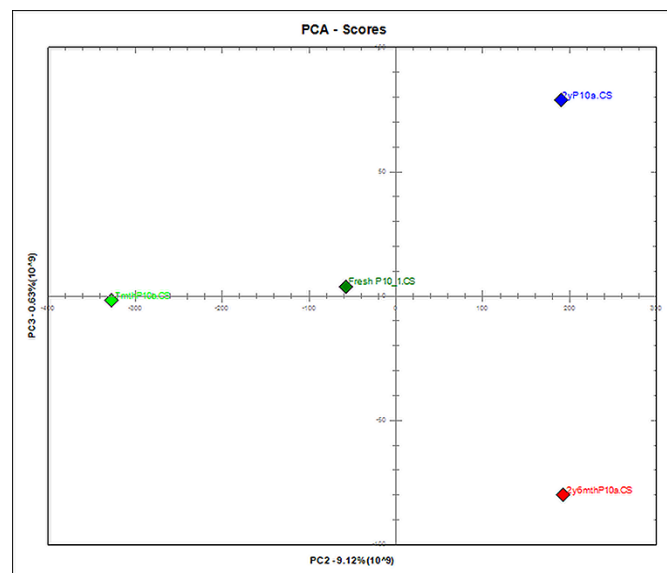
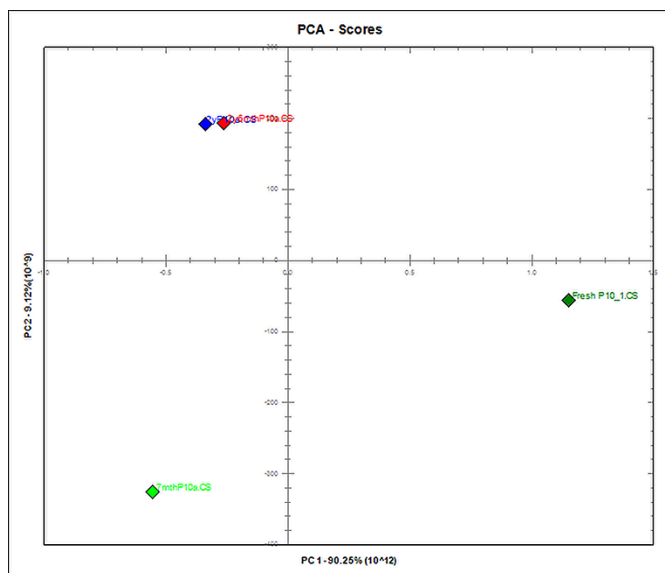


Figure 4.7a. PCA results for black pen BRW (P10): left: PC1xPC2; right: PC2xPC3.

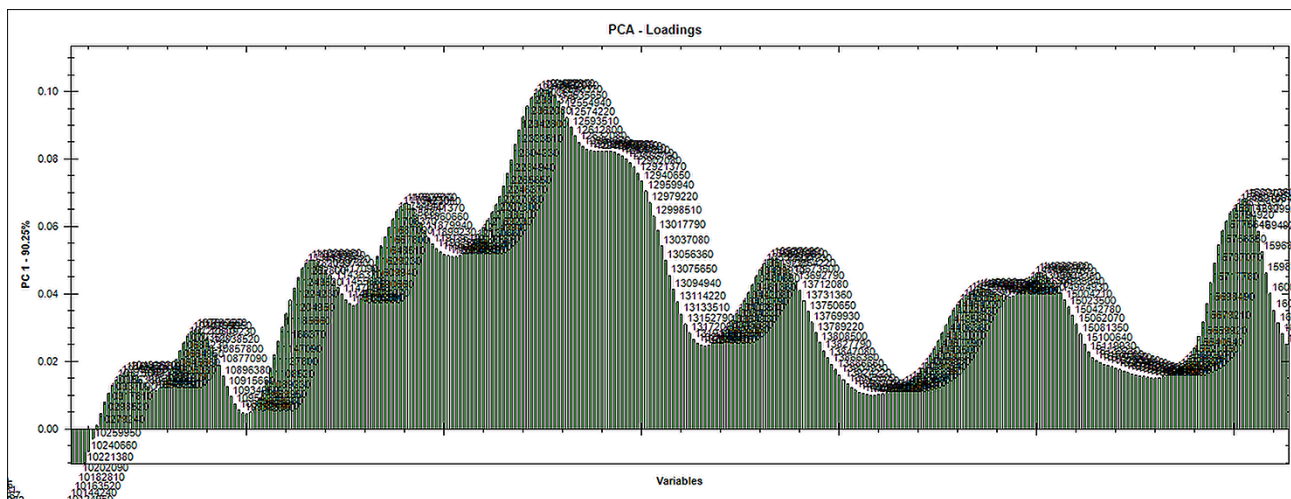


Figure 4.7b. Loadings of PC1 for black pen BRW (P10).

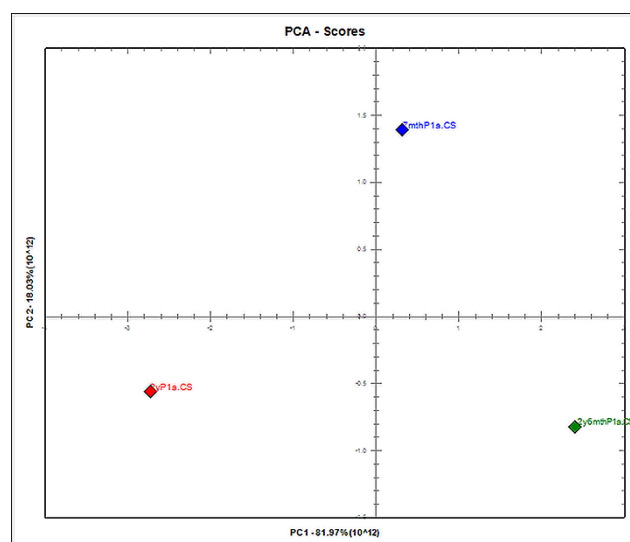
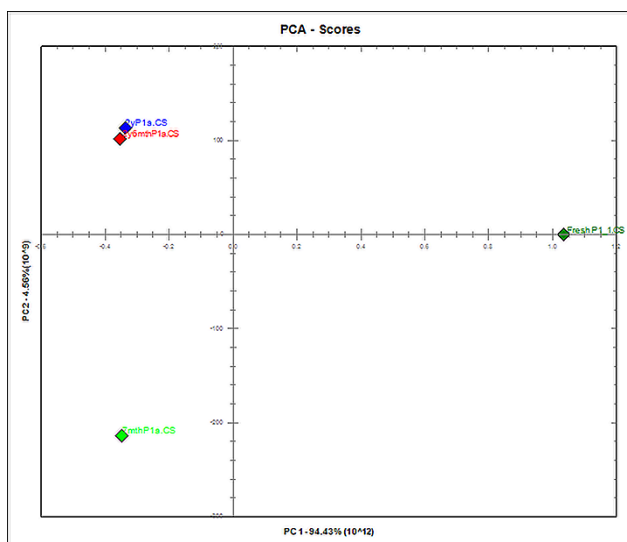


Figure 4.8a. PC1 x PC2 for Bic Crystal (P1): left: with fresh sample; right: removing fresh sample.

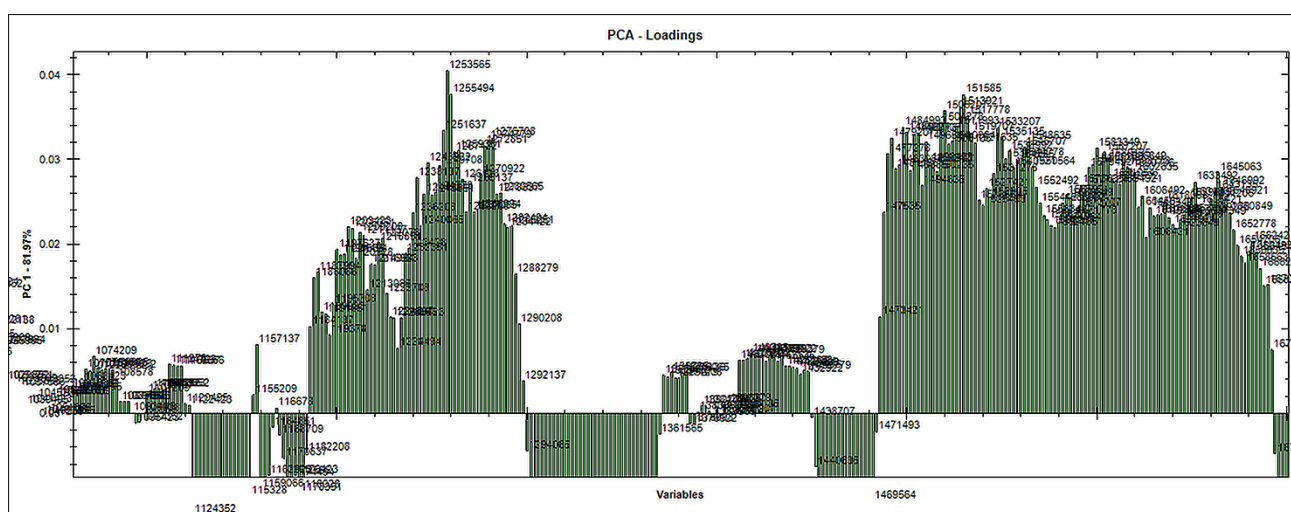


Figure 4.8b. PC1 Loadings for Bic Crystal pen, removing the freshly applied sample.



#### 4. Conclusions

The analysis of ballpoint pen samples through IR-ATR was able to differentiate or grouping the samples, even for inks of very similar color, and even if the spectra is collected from the bulk ink or from the ink line in a paper.

The spectra were submitted to Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA), and this approach could confirm that the paper where the pen line is written did not influence in the differentiation and grouping of the pens.

The PCA characterized the variables that were responsible for the variation and/or similarity of the samples.

Performing PCA for ballpoint pen line IR-ATR spectra collected from samples with different ages, this approach was able to differentiate pen lines freshly applied, with 14 days and 7 months from pen lines older than 7 months.

The PCA loadings evidenced that the samples recently applied until 7 months samples had in common the absorption peaks from solvents like 2-phenoxyethanol, which are the formulation components that evaporate through time.

The HCA results for blue and black pens, showed different clusters of brands of pens, for spectra collected from different ages. Ballpoint pens made in Brazil, which are different from each other when recently applied, tended to group together after two years, becoming more similar. Some blue pen lines with one year of age did not differ from older pens in the PCA. At the same time, other one year and seven months pen lines were divergent from older ones, but the loadings did not show absorption peaks of the solvents. This result should be explained by other pen ink components as resins and dyes, that changes with time, and could be the loadings that differentiate the samples in PCA.

Additional research should be performed with real cases of pen manuscripts naturally aged, and with experimental samples followed for more than two years, to confirm this behavior and the applicability of this IR-ATR method to ballpoint pen dating. Other models of Multivariate Analysis like Linear Discriminant Analysis could be applied forward to classify pen inks by date.

#### 5. Acknowledgements

The authors wish to thank the Scientific Section of Brazilian Federal Police – Rio Grande do Sul Bureau and the Brazilian National Institute of Forensic Science and Technology.

#### 6. Notes and references

- 1 Andrasko, J. *J Forensic Sci*, **46**(1), (2001) 21-30.
- 2 Kher, A. *et al.*, *Vibrational Spectroscopy* **40**, (2006) 270-277.
- 3 Denman J.A. *et al.*, *Applied Surface Science*, **256**, (2010) 2155-2163.
- 4 Andrasko, J. *J Forensic Sci*, **47**(2), (2001) 324-327
- 5 Liu, Yi-Zi *et al.* *J. Chromatogr. A*. **1135** (2006) 57-64.
- 6 Liu, Yi-Zi *et al.* *J. Chromatogr. A*. **1125**(1) (2006) 95-103.
- 7 Wang J, Luo G, Sun S, Wang Z, Wang Y. *J Forensic Sci* **46**(5) (2001) 1093–1097.
- 8 Lee, L.C. *et al.* *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, **19**(2) (2015) 397 - 401
- 9 Confortin, D. *et al.* *Journal of Physics: Conference Series* **231** (2010) 012011.
- 10 Freidenfelds, V.; Mekss, P.; *Latvian Journal of Chemistry*, **3** (2012) 242–248.
- 11 Bello de C., C. M. *et al.* *Forensic Sci Add Res* **2**(2) (2018) FSAR.000537.
- 12 Lee, J. *et al.* *J Forensic Sci* **61**(3) (2016) DOI 10.1111/1556-4029.13047.
- 13 Senior, S., Hamed, E., Masoud, M., Shehata, E. *J Forensic Sci* **57**(4) (2012) 1087–1093.
- 14 Harris, J. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, **24** (1) (2016) 5-21.
- 15 Causin, V. *et al.* *J Forensic Sci* **53**(6) (2008) 1469–1473.
- 16 Silva, C. S. *et al.* *Microchemical Journal*, **109**, (2013) 122-127.
- 17 Sharma, V., Kumar, R.; *Vibrational Spectroscopy* **92** (2017) 96-104.
- 18 Nam, Y.S., Park, J. S., Lee, Y., Lee, K. *J Forensic Sci*, **59** (3) (2014) 800-805.
- 19 Zieba-Palus, J., Kunicki, M. *Forensic Sci Int*, **158**, (2006), 164-172.
- 20 Payne, G. *et al.* *Talanta*, **67**, (2005), 334-344.

- 21 Silva, C. S. *et al. Analyst*, **139** (2014) 5176-5184.
- 22 Wang, J., Luo, G., Sun, S., Wang, Z., Wang, Y. *J Forensic Sci*, **46** (5) (2001) 1093-1097.
- 23 Thanasoulis, N.C., Parisi, N.A., Evmiridis, N. P. *Forensic Sci Int*, **158**, (2006), 164-172.
- 24 Adam, C. D., Sherrat, S. L., Zholobenko, V. L. *Forensic Sci Int*, **174**, (2008), 16-25.
- 25 Chen, H.S., Meng H.H., Cheng, K.C., *Forensic Science Journal* **1**, (2012) 1-14.
- 26 Feraru, D.L., Meghea, A., Badea, N. *Rev. Chim.* **64**, (1), (2013) 74-80.
- 27 Helfer, G.A. *et al.*, *Quimica Nova*, **38** (4), (2015) 575-579.
- 28 Carvalho, C.M.B., Ortiz, R. S., Limberger, R. P. Ageing profile of manuscripts made with different brands of ballpoint pens used in Brazil. (data not published yet).

---

**8. CAPÍTULO 5**  
**Ageing profile of manuscripts made with different brands of ballpoint pens used**  
**in Brazil**



### **8.1 MANUSCRITO 5**

A seguir encontra-se encartado o artigo intitulado “**Ageing profile of manuscripts made with different brands of ballpoint pens used in Brazil**”, o qual será submetido para publicação na revista “Journal of Forensic Sciences”, da Wiley Online Library. O artigo em questão trata sobre o acompanhamento do comportamento de envelhecimento de traços de canetas em diferentes tipos de papéis e em diferentes ambientes de armazenamento, relativo a evaporação do solvente 2-PE, por três anos.



**Ageing profile of manuscripts made with different brands of ballpoint pens used  
in Brazil**

Carvalho, Carina Maria Bello de <sup>a, b, c</sup>, Ortiz, Rafael Scorsatto<sup>a, c</sup>, Limberger, Renata  
Pereira<sup>b, c</sup>

<sup>a</sup>*Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup>*Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>c</sup>*Brazilian National Institute of Forensic Science and Technology, 90160-030 Porto Alegre, RS, Brazil.*

Corresponding Author: e-mail address [carina.cmbc@dpf.gov.br](mailto:carina.cmbc@dpf.gov.br) (Carina M. Bello de Carvalho)

**ABSTRACT**

Dating of ballpoint pen manuscripts in forensic documents is still a challenge for experts. Methods of ink dating have regarding solvent evaporation through time, especially 2-phenoxyethanol (2-PE). This paper performed a continued study with pen ink strokes of ballpoint pens commercialized in Brazil, to characterize the ageing profile of 15 brands of blue and black pens. Analyses of ink lines applied in white and recycled paper were performed by gas chromatography/mass spectrometry, to quantify 2-PE, in recently and aged 4, 18, 27 and 36 months. The results showed that the pens had initial quantities of 2-PE smaller than in Europe but ageing behavior was similar. Kind of paper influences in pens aged but influences less in the pens recently applied. Light and heat accelerated the ageing. Some pens stopped ageing at 18, 27 and 36 months. Further statistical treatments could be done in view of adequate interpretation in real cases.

**KEYWORDS**

Forensic Science; Forensic Chemistry; Documentoscopy; Ballpoint Pen Ink; 2-phenoxyethanol; ink aging; document forgery; Gas Chromatography; Mass spectrometry.



Dating of ballpoint pen manuscripts to detect chronology fraud in documents of forensic interest is still a challenge for forensic experts. Notwithstanding forensic chemistry researchers have been developing methods to determine the age of a ballpoint pen manuscript, the variation in pen ink formulations and the behavior of the ink compounds through time in different climate conditions are still a source of variability that should be taking into account for a reliable result [1, 2, 8, 9, 18].

Some authors tried to date ballpoint pen using degradation of dyes as an indication of the ink age [1, 2, 3, 4, 5, 6]. However, the ageing of the dyes are too dependent of the physical properties of the ink layer on the surface of the paper, associated with the ink composition and exposure to light and humidity, so ink dating methods target to dyes are highly controverted in forensic science [7, 8]. Because of this, methods of ink dating have being regarding solvent evaporation through time, especially 2-phenoxyethanol [8, 9, 10, 11, 12].

Most authors developed methods using Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry to quantify volatile solvents in the ink, some of them performing artificial aging (a method based on the analysis of two samples of ink, one of which is heated at moderated temperature and compared with the non-heated sample) [4, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ]. The modelling of natural ageing of dyes and solvents through artificial ageing, however, proved to be very complex, because, again, of the number of factors playing a role in the ageing process, such as the initial ink composition, paper substrate and storage conditions (light, heat and humidity) [4].

Recently, Koenig *et al.* [8] tested three different approaches of quantification of 2-PE: “solvent loss ratio R% (involves ratio of a sample and the same sample artificially aged with heat); “Relative Peak Areas between compounds (RPA)””; and “solvent loss ratio using RPA R%”. The authors concluded that the calculation of RPA values proved to

be the most promising ageing parameter, and the R% was the least reproducible. Continuing this study, very recently, Koenig and Weyermann [12] evaluated the potential of seven ageing parameters for ink dating purposes: evaluating the phenoxyethanol quantity, relative peak areas (RPA), three solvent loss ratios (R%, R%\*, NR%) and two solvent loss parameters (RNORM, NRNORM). These were calculated over approximately one year for 25 inks selected from a large database to represent different ageing behaviours. They concluded that natural ageing parameters (NR% and NRNORM) were not suitable ageing parameters for ink entries older than a few weeks. The PE quantity, R% and RNORM allowed to follow the ageing of the selected inks over the whole time frame and were identified as the most promising.

Some researches show the comparative behavior of the pens, only based on Relative Peak Area or other ratios [4, 14, 17, 19] and just few papers mention the real quantities of 2-phenoxyethanol in the pens tested, for each time of ageing [8, 12, 19].

The complexity of the ink ageing process, once the ink is deposited on paper, makes it difficult to interpret experimental results for a given kind of ink in particular, and makes it even more difficult to extrapolate these results to other inks [19].

The influence of the initial ink composition on the ageing rates of inks is very important, and two aspects must be considered: the ink compounds (resins, dyes, solvents and additives) and their relative amounts [18,20]. The initial quantities of solvents in an ink stroke influences significantly the ageing process, and this could be dependent on the writing pressure, and/or on the size of the ball in the ballpoint pen, as stated Weyermann *et al.* [20]. Besides that, the relative content of 2-phenoxyethanol varies amount different ballpoint inks [18, 21, 22].

The influence of paper type (subtract structure of fibers) and the paper chemistry (alkaline or acidic, fillers, whiteners, detergents) on the drying process should not be

underestimated [20]. The authors are not yet in accordance about the influence of paper type on dating of an ink: Weyermann *et al.* [20] cited that Aginsky, in his paper, reported it to be negligible while Bügler *et al.* [18] observed a strong dependence on paper type for the method of thermal desorption. San-Román *et al.* [10] also commented about the effect of paper porosity or density, as well as the fibers and paper chemistry, in the behavior of ink solvent compounds.

Diffusion and evaporation mechanisms play an important role in the drying of solvents in a porous media, so the storage and environmental conditions as temperature, humidity, air movement should be taken into account. Many reports contain data collected in controlled ambient conditions of a laboratory, but it is still important to achieve data of documents storage on normal conditions of an office room, for example [20].

Although all the published studies provide many methodological ways to date ballpoint inks, these studies were performed with pen brands and formulations, as well as environmental conditions, diverse from the ones available in Brazil [8, 9, 10, 12, 14, 15, 18, 19]. Pens manufactured in Brazil, in view of the heater weather of South America, could have different compositions of solvents, dyes, resins and conservatives from the pens manufactured in the Europe.

In view of these many variables involved in the ageing process of pen ink, and concerning the importance to achieve reliable results to determine de age of a manuscript in order to solve real forensic cases of document forgeries, our research group developed a continued study with pen ink strokes from the most commercialized ballpoint pens in Brazil. These ballpoint pen strokes were followed through 3 years, in different kind of papers and in different environmental conditions, in order to report the pen ageing behavior.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Analyzed specimen

In this study it have been chosen 15 blue and 15 black pens (Table 01 and 02) from thirty-seven different brands/models of blue ballpoint pens and twenty-seven different brands/models of black ballpoint pens, based on the clusters formed by Multivariate Statistic Analysis of the Infrared Spectra collected, in a previous study, conducted by our research group (data not published yet). Straight lines made with these 30 chosen pens were made with a ruler, in two different kinds of paper (Table 03). Samples of 10 mm long for 2 mm large were cut from each pen and paper, in different periods of time: recently applied (few hours after lines have been written), 4 months of age, 1 year and a half of age, 2 years and 3 months of age and 3 years of age. The written material for sampling was stored in the darkness, in a controlled temperature of 20 °C, and a relative humidity of 30%. A replicate of this written material was stored under natural light conditions, over an office desk, near a window, with the temperature varying from 29 °C in the summer to 21 °C in the winter, and an averaged relative humidity of 50% (all seasons). This replicate was made to evaluate the ageing behavior in natural and non-controlled ambient conditions, to simulate the ageing of a real case document.

To evaluate the ageing of the samples, it was monitored the evaporation of the main solvent in the ink formulations, 2-phenoxyetanol (2-PE), through quantification of this solvent by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS).

Pen code	Brand/model
A1	Bic ecolutions round stic
A4	Faber Castell trilux 032 Medium
A11	Injex Pen new
A12	BRW new
A13	Pilot Super Grip 1.0
A16	CIS Silver Stick 1.0
A17	Pentel Star V 0.7 (India)
A19	Uni Laknok 1.4 (Japan)
A23	Paper Mate Kilometrica 1.0
A26	Bic Cristal
A29	Pilot Super Grip nova 1.6
A30	Bic Atlantis 1.6
A31	Tilibra super BP 1.0
A32	Uni SAS Fine (Japan)
A35	Stabilo bille 508 (Germany)
A36	Molin CR-45 (France)

Table 5-2. Black pens analysed.

Pen Code	Brand/model
P1	Bic cristal pocket
P2	Bic Ecolutions round stic
P5	Injex Pen used
P6	Faber Castel trilux 032 Medium
P10	BRW new
P11	Molin (France)
P12	Uni Laknok 0.7 fine point
P14	CIS Silver Stick 1.0
P15	Pentel Star V 0.7 (India)
P16	Paper Mate Kilometrica 1.0
P19	Bic Atlantis 1.6
P20	Pilot Super Grip 1.6
P21	Tilibra Super BP 1.0
P25	Uni SAS Fine (Japan)
P26	Stabilo M Bille 508 (Germany)

Table 5-3. Kind of papers analysed.

Paper Code	Characteristics
Paper 13	Recycled office paper 75 g/m <sup>2</sup> (Jandaia®)
Paper 14	White office paper 75 g/m <sup>2</sup> (One®)

## 2.2. Sample preparation

The 1 cm samples collected in triplicate from each pen and paper were extracted with 250  $\mu$ L of Methanol (HPLC grade, Merck) containing 1.0  $\mu$ g/mL of o-cresol as internal standard, in a vial with a glass insert of 300  $\mu$ L capacity inside, and agitated in a vortex for 1 minute.

For the 2-PE quantification in the samples, a calibration curve was performed using control solutions of a 2-PE standard ( $\geq 99,5\%$  - Sigma-Aldrich), at concentrations of 0.005; 0.05; 0.5; 1.5; and 3.0  $\mu\text{g/mL}$ , containing o-cresol as internal standard, at a concentration of 1.0  $\mu\text{g/mL}$ .

### 2.3. GC/MS analysis

The quantification analysis of 2-PE content of the pen ink samples were performed in a Gas Chromatograph Agilent 6890N model, selective mass detector Agilent, model 5973 (operating at 70 eV) and capillary column DB-WAX (30m x 250 $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ ). The chromatographic conditions were: injector at 180 °C, in splitless mode for 3 minutes, flow of 1.3 mL/min, oven initial temperature at 50 °C, ramp at 18 °C per minute to 204 °C (hold 1 min), 5 °C per minute to 230 °C (hold 2 minutes); and injection volume of 2  $\mu\text{l}$ . The transfer line was maintained at 290 °C, and the MS detector at 230 °C. For identification of 2-PE, ions monitored by Single Ion Monitoring (SIM) method were those with reason mass / charge (m / z) of 138.0; 94.0, 77.0 and 66.0 and monitored to identify the internal standard were in the ratio of mass / charge (m / z) of 108.0; 107.0 and 91.0 and 77.0. The ions used for quantification had the highest relative abundance, being chosen the ion 94.0 for 2-PE and 108.0 for o-cresol.

Quantitative analyzes were made by comparing the ratio of 2-PE and internal standard obtained areas of the selected ions with the analytical curve obtained for 2-PE standards.

For statistical analyzes, it was performed Linear Regression, the Variance Analysis (ANOVA) and Fisher LSD Test, using Minitab 17 Statistical Software (Minitab, Pennsylvania, USA) and Microsoft Excel 2013.

To evaluate the ageing behavior of the pens, it was constructed a regression curve of 2-PE *versus* time, and the regression slope was used to compare between

the pens. It were tested different statistical approaches for mean discriminations, and between Tuckey and Fisher, the Fisher LSD test have been chosen because it is less conservative and had a better discrimination power for the samples.

### 3. Results and Discussion

The calibration curve of 2-PE versus internal standard resulted linear with determination coefficient  $R^2 = 0.998$ , and the regression equation was  $y = 1.4164x + 0.061$ (Figure 01). The residuals were homoscedastic.

#### 3.1. 2-PE concentration in blue and black ballpoint pen ink lines recently applied

In order to evaluate if the blue and black pens analyzed have similar initial concentrations of 2-PE, samples recently applied in the white paper (Paper 14 – 75 g/m<sup>2</sup>) were compared trough ANOVA with 95% of confidence, and the results are discriminated at tables 4 and 5. The ANOVA of the samples was significant, with an *F-value* of 3.96 (*p-value* 0.006) for blue pens, and an *F-value* of 3.87 (*p-value* 0.007) for black pens, showing that there is statistical difference between the samples. The Fisher LSD test was performed to determine which samples differed statistically.

Table 5-4. Anova results for of the blue pens\*†.

Blue Pen	2-PE concentration	SD	Grouping
	Mean (µg/mL)	± µg/mL	

A23 <sup>‡</sup> Papermate	5.759	0.461	A
A30 <sup>‡</sup> Bic atlantis	4.82	1.8	A B
A29 <sup>‡</sup> Pilot	4.53	2.75	A B
A19 <sup>‡</sup> Unilaknok	3.556	0.362	B C D
A17 <sup>‡</sup> Pentel	3.218	0.640	B C D
A36 <sup>‡</sup> Molin	3.178	0.936	B C D
A4 <sup>‡</sup> Faber	2.494	1.052	C D E
A32 <sup>‡</sup> Unisas	2.277	0.662	D E
A35 <sup>‡</sup> Stabilo	2.274	0.477	D E
A31 <sup>‡</sup> Tilibra	2.162	0.793	D E
A16 <sup>‡</sup> Cis	1.938	0.770	D E
A11 <sup>‡</sup> Injex	1.644	0.313	D E
A12 <sup>‡</sup> BRW	1.4795	0.1301	D E
A26 <sup>‡</sup> Bic Crystal	1.468	0.669	D E
A1 <sup>‡</sup> Bic Ecolution	0.2978	0.0483	E

\* Fischer Test - Means that do not share a letter are significantly different

† The letter "A" represents "blue pens", the subsequent number is the pen code number.

Table 5-5. Anova results for of the black pens\*†.

Black Pen	2-PE concentration	SD	Grouping
-----------	--------------------	----	----------



	Mean ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\pm \mu\text{g/mL}$	
P19 <sup>†</sup> Bic Atlantis	7.702	0.767	A
P16 <sup>†</sup> Papermate	5.69	1.44	A B
P14 <sup>†</sup> Cis	5.33	3.7	A B C
P6 <sup>†</sup> Faber	2.937	0.909	B C D
P12 <sup>†</sup> Unilak	2.866	1.068	B C D
P15 <sup>†</sup> Pentel	2.73	1.81	C D
P20 <sup>†</sup> Pilot	2.59	1.47	C D
P10 <sup>†</sup> BRW	2.551	0.382	C D
P11 <sup>†</sup> Molin	2.535	1.223	C D
P26 <sup>†</sup> Stabilo	2.095	0.630	D
P5 <sup>†</sup> Injex	2.020	0.313	D
P1 <sup>†</sup> Bic Crystal	1.888	0.267	D
P25 <sup>†</sup> Unisas	1.3475	0.0007	D
P21 <sup>†</sup> Tilibra	1.323	0.907	D
P2 <sup>†</sup> Bic Ecolution	0.884	0.179	D

\* Fischer test - Means that do not share a letter are significantly different

† The letter "P" represents "black pens", the subsequent number is the pen code number.

Even for blue or black pens, the pens recently applied that presented the greatest concentration of 2-PE were Bic Atlantis and Papermate, and the pen that presented the lowest 2-PE concentration was Bic Ecolution. Comparing statistically the results for blue and black pens simultaneously (Table 06), it was observed that for two brand/models of pens, black color presented higher amounts of 2-PE (Bic Atlantis and Cis), for some brand/models the blue color presented a higher amount of solvent, even though they do not differed statistically (Unilaknok, Pentel, Molin and Faber). The great majority of the brands did not differed statistically in the 2-PE amounts for blue and black

pens. These results were very similar of previous results obtained for blue and black pens of similar brands, but with the samples analyzed by Gas Chromatography and Flame Ionization Detector. In this paper, the Papermate pen also had the higher amount of 2-PE [21]. Koenig & Weyermann [12] also observed no significant statistical differences between black and blue inks, related to the 2-PE concentration.

Table 5-6. Grouped ANOVA for blue and black pens\*†.

Pen analyzed	2-PE concentration Mean ( $\mu\text{g/mL}$ )	Grouping
P19 bic atlantis	7.702	A
A23 papermate	5.759	A B
P16 papermate	5.69	A B
P14 cis	5.33	A B C
A30 bic atlantis	4.82	B C D
A29 pilot	4.53	B C D E
A19 Unilaknok	3.556	B C D E F
A17 pentel	3.218	C D E F G
A36 molin	3.178	C D E F G
P6 faber	2.937	C D E F G
P12 unilak	2.866	D E F G
P15 pentel	2.73	D E F G H
P20 pilot	2.59	D E F G H
P10 BRW	2.551	D E F G H
P11 molin	2.535	D E F G H
A4 faber	2.494	D E F G H
A32 unisas	2.277	E F G H
A35 stabilo	2.274	E F G H
A31 tilibra	2.162	E F G H
P26 stabilo	2.095	E F G H
P5 INJEX	2.020	F G H
A16 CIS	1.938	F G H
P1 BIC CRIST	1.888	F G H
A11-2 INJEX	1.644	F G H
A12-1 BRW	1.4795	F G H
A26 BIC CRIST	1.468	F G H
P25 UNISAS	1.34759	F G H
P21 TILIBRA	1.323	F G H
P2 BIC ECO	0.884	G H
A1 BIC ECO	0.2978	H

\* Fisher Test - Means that do not share a letter are significantly different

† The letter "P" represents "black pens", the letter "A" represents the "blue pens"; the subsequent number is the pen code number.

Even with the majority of the samples not presenting statistically difference, it was possible to group the pens in 2-PE concentration ranges, in a similar way that Koenig & Weyermann [12] grouped in their study, as showed below.

Class 1) 0-1.0  $\mu\text{g/mL}$

Class 2) 1.0-2.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Class 3) 2.8-4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Class 4) 4.0-7.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$

However, the 2-PE concentrations determined for some pens in Koenig & Weyermann study [12], reached the range from 130 to 180 ng/cm ( $\sim 8.6$  to  $12 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), even after 4 days of application in the paper. This could mean that for the pens in South America, the 2-PE concentration could be inferior to the 2-PE concentration of pens in Europe. A hypothesis for this could be different formulations for Brazilian pens, or the evaporation of 2-PE from the pen cartridge because of the hotter weather, although this last hypothesis have been refuted by some authors [23, 24].

In a recent study conducted in Spain, the authors observed elevated concentrations of 2-PE immediately after writing, being from  $6.34 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $17 \text{ mg.L}^{-1}$  for the pen “Sigma”, from  $13.8 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $26.3 \text{ mg.L}^{-1}$  for the pen “Inoxcrom” and impressive  $49.1 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $81.7 \text{ mg.L}^{-1}$  for “Monblanc” pen, showing that the solvent formulation in pens used in Europe could be quite different of the pens usually used in Brazil [19].

In order to compare the efficiency of extraction of 2-PE from pen ink adsorbed in different substrates, the concentration of 2-PE of recently applied samples was determined for blue and black pens also for the recycled paper (Paper 13,  $75 \text{ g}/\text{m}^2$ , Jandaia<sup>®</sup>). The ANOVA of the samples was significant (95% of confidence), with an *F-value* of 5.33 (*p-value* 0.000) for blue pens, and an *F-value* of 4.14 (*p-value* 0.000) for black pens, showing that there is statistical difference between the samples. The Fisher LSD test was performed to determine which samples differed statistically. The ANOVA results are presented in Table 07.

Table 5-7. Results of the ANOVA of 2-PE concentration in blue and black pens applied in white and recycled paper\*†.

Blue Pens	2-PE concentration Mean ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Black Pens	2-PE concentration
-----------	--	------------	-----------------------

			Mean ( $\mu\text{g/mL}$ )
A30 BIC ATLANT Paper13	7.72 A	P19 bic atlant Paper14	7.702 A
A29 PILOT Paper13	6.03 A B	P19 bic atlant Paper 13	7.077 A
A23 PAPERMAT Paper14	5.759 A B	P16 PAPER MAT Paper 14	5.69 A B
A30 BIC ATLANT Paper14	4.82 B C	P14 CIS Paper 14	5.33 A B C
A23 PAPERMAT Paper13	4.682 B C	P14 CIS Paper 13	4.12 B C D
A29 PILOT Paper14	4.53 B C D	P16 PAPER MAT Paper 13	4.057 B C D
A19 UNILAKN Paper13	4.091 B C D E	P20 PILOT Paper 13	3.022 C D E
A36 MOLIN Paper13	3.63 C D E F	P6 FABER Paper 14	2.937 C D E
A19 UNILAKNOK Paper14	3.556 C D E F G	P11 MOLIN Paper 13	2.92 C D E
A26 BIC CRIST Paper13	3.244 C D E F G H	P10 BRW Paper 13	2.898 D E
A17 PENTEL Paper14	3.218 C D E F G H	P12 UNILAK Paper 14	2.866 D E
A36 MOLIN Paper14	3.178 C D E F G H	P15 PENTEL Paper 13	2.864 D E
A17 PENTEL Paper13	2.838 C D E F G H	P15 PENTEL Paper 14	2.73 D E
A4 FABER Paper14	2.494 D E F G H	P20 PILOT Paper 14	2.59 D E
A4 FABER Paper13	2.424 E F G H	P10 BRW Paper 14	2.551 D E
A32 UNISAS Paper13	2.326 E F G H I	P11.1 MOLIN Paper 14	2.535 D E
A32 UNISAS Paper14	2.277 E F G H I	P6 FABER Paper 13	2.535 D E
A35 STABILO Paper14	2.274 E F G H I	P26 STABILO Paper 14	2.095 D E
A16 CIS Paper13	2.178 E F G H I J	P5 INJEX Paper 14	2.020 D E
A31 TILIBRA Paper14	2.162 E F G H I J	P5 INJEX Paper 13	1.90 D E
A31 TILIBRA Paper13	2.147 E F G H I J	P1 BIC CRIST Paper 14	1.888 D E
A35 STABILO Paper13	2.033 E F G H I J	P26 STABILO Paper 13	1.860 D E
A16 CIS Paper14	1.938 F G H I J	P12 UNILAK Paper 13	1.815 D E
A12 BRW Paper13	1.8882 F G H I J	P2 BIC ECO Paper 13	1.3553 E
A11 INJEX Paper13	1.788 F G H I J	P25 UNISAS Paper14	1.34759 E
A11 INJEX Paper14	1.644 F G H I J	P21 TILIBRA Paper 14	1.323 E
A12 BRW Paper14	1.4795 G H I J	P21 TILIBRA Paper13	1.161 E
A26 BIC CRIST Paper14	1.468 H I J	P1 BIC CRIST Paper13	1.000 E
A1 BIC ECOPaper14	0.2978 I J	P25 UNISAS Paper13	0.970 E
A1 BIC ECOPaper13	0.1841 J	P2 BIC ECO Paper14	0.884 E

\* Fisher test -Means that do not share a letter are significantly different

† The letter "P" represents "black pens", the letter "A" represents the "blue pens"; the subsequent number is the pen code number.

In a previous study performed by our research group (data not published yet), in which 2-PE of blue and black Bic Crystal pen lines was determined for white and recycled Paper, it was verified that the recycled paper had a tendency to provide a higher concentration of 2-PE in relation to the samples applied in white paper. Because of this, the present research included these two kind of papers, to confirm the hypothesis raised by the preliminary results.

However, the 2-PE concentrations observed for the majority of the pens (irrespective the color) in the present study contradicted the previous ones, not presenting statistical

difference between white and recycled paper. The only pens that showed a tendency to a higher amount of 2-PE detected in recycled paper were the blue pens “Bic Atlantis”, “Pilot” and the pen already tested, “Bic Crystal”. The behavior of these pens could be explained by the higher amount of 2-PE and/or by some formulation component that facilitates the absorption of solvents in the recycled paper bulk, because of the fiber composition of the paper. Once the paper absorbs the solvents, they are less exposed to evaporate, resulting in a higher concentration detected.

### 3.2. Concentration of 2-PE in blue and black ballpoint pen ink lines with 4 months age

After 4 months, the samples of blue and black pens applied in white paper (Paper 14), were analyzed to determine the 2-PE concentration. Despite some blue pens recently applied presented 2-PE concentrations statistically diverse, after 4 months, it was not observed statistically difference between the blue pens 2-PE concentration. The same occurred for the black pens.

Although the 2-PE concentration in the pens after 4 months lowered down in relation to the samples recently applied, almost 50% of the pens (blue and black) presented 2-PE levels over the quantities observed for pens with 138 days (4 months and 16 days) in the study of Koenig and Weyermann (2018) [12].

The results in terms of concentration of 2-PE for blue and black pens are presented in Table 08.

Table 5-8. 2-PE concentration in blue and black pens after 4 months of ageing†.

Blue Pens – 4 months	2-PE concentration Mean (µg/mL)	SD (±µg/mL)	Black Pens – 4 months	2-PE concentration Mean (µg/mL)	SD (±µg/mL)
A11-INJEX	1.242	0.876	P10 BRW	2.2883	0.0331
A12 BRW	1.242	1.241	P11 MOLIN	1.478	1.133
A16 CIS	1.8704	0.0157	P12 UNILAKNOK	1.9205	0.0482
A17 PENTEL	0.970	1.087 (-	P14 CIS	2.23637	0.01106
A19 UNILAKNOK	1.163	1.188	P15 PENTEL	2.1083	0.1152

A1 BIC ECOL	1.157	0.924	P16 PAPERMAT	1.119	1.313
A23 PAPERMAT	1.287	1.196	P19 BIC ATLANT	2.1202	0.1101
A26 BIC CRIST	1.092	1.211	P1 BIC CRIST	1.060	1.264
A29 PILOT	1.253	1.315	P20 PILOT	1.266	1.050
A30 BIC ATLANT	2.0863	0.0929	P21 TILIBRA	2.2338	0.0423
A31 TILIBRA	1.188	1.367	P25 UNISAS	1.089	1.238
A32 UNISAS	2.0067	0.0413	P26 STABILO	1.9561	0.1272
A35 STABILO	1.9131	0.0289	P2 BIC ECOL	1.236	1.266
A36 MOLIN	1.278	1.276	P5 INJEX	2.07991	0.00292
A4 FABER	1.9150	0.0379	P6 FABER	2.2420	0.1086

† The letter “P” represents “black pens”, the letter “A” represents the “blue pens”; the subsequent number is the pen code number.

SD = Standard deviation

### 3.3. Concentration of 2-PE in blue and black ballpoint pen ink lines with 1 year and 6 months of ageing (18 months)

After 18 months, the majority of the blue pens still remained with 2-PE concentrations with no statistically significant difference between the samples, except the sample from the pen “Pentel”, which was the sample with the higher amount of 2-PE detected, irrespective if it has not been the pen with higher initial concentration. Because of this unique sample, the ANOVA was significant (95% of confidence), with an *F-value* of 2.92 (*p-value* 0.024) for blue pens (Table 9).

For the black pens, the results were different, the ANOVA was significant (95% of confidence), with an *F-value* of 24.82 (*p-value* 0.000). Although with four months the black pens did not showed statistical difference, after 18 months, the black pen “Cis” was the one that presented the highest level of 2-PE, followed by the black version of the “Pentel”, that also had the highest concentration in blue version (Table 09).

These results are in accordance with an observation that pens with higher initial amounts of 2-PE would present a faster decay of the solvents concentration in relation to the pens with lower quantities [20]. However, Koenig & Weyermann [12] observed recently that for the pens analyzed in their study, inks containing little 2-PE aged faster than the most concentrated inks.

Table 5-9. Results of the ANOVA of 2-PE concentration in blue and black pens after 18 months of ageing\*†.

Blue Pens – 18 months	2-PE concentration Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Black Pens – 18 months	2-PE concentration Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )
A17	0.769 $\pm$ 0.374 A	P14	0.7814 $\pm$ 0.0645 A
A31	0.4201 $\pm$ 0.0567 B	P15	0.5397 $\pm$ 0.0682 B
A11	0.4134 $\pm$ 0.0952 B	P11	0.4591 $\pm$ 0.1270 B C
A26	0.4023 $\pm$ 0.0267 B	P16	0.4075 $\pm$ 0.0410 C
A16	0.3908 $\pm$ 0.0567 B	P2	0.3737 $\pm$ 0.0256 C D
A12	0.3505 $\pm$ 0.0873 B	P6	0.36724 $\pm$ 0.00780 C D
A29	0.3408 $\pm$ 0.0142 B	P21	0.3613 $\pm$ 0.0412 C D
A23	0.3325 $\pm$ 0.0657 B	P26	0.29837 $\pm$ 0.01334 D E
A35	0.2979 $\pm$ 0.0552 B	P5	0.25703 $\pm$ 0.00774 E F
A36a	0.2862 $\pm$ 0.0498 B	P1	0.2437 $\pm$ 0.0204 E F
A4	0.2543 $\pm$ 0.0751 B	P19	0.2372 $\pm$ 0.0308 E F
A32	0.2515 $\pm$ 0.0852 B	P12	0.1923 $\pm$ 0.0608 F G
A30	0.2439 $\pm$ 0.0296 B	P10	0.1856 $\pm$ 0.0144 F G
A1	0.22942 $\pm$ 0.00669 B	P25	0.17017 $\pm$ 0.00392 F G
A19	0.2247 $\pm$ 0.0290 B	P20	0.1289 $\pm$ 0.0144 G

\* Fisher Test Means that do not share a letter are significantly different

† The letter "P" represents "black pens", the letter "A" represents the "blue pens"; the subsequent number is the pen code number.

SD = Standard Deviation

Koenig et Weyermann [12] determined an averaged quantity of  $\sim 15 \text{ ng.cm}^{-1}$  (approximately  $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) for all pens tested, at the age of 304 days (less than one year), while in the present study, the majority of the pens presented an averaged concentration of  $0.34 \mu\text{g.mL}^{-1}$  after 18 months of ageing, that is, much lower concentrations than the previous one.

### 3.4. Concentration of 2-PE in blue and black ballpoint pen ink lines with 2 year and 3 months age (27 months)

In relation to the blue pens, even after 27 months, some pens maintained the difference from other pens, so the ANOVA was significant (95% of confidence), with an *F-value* of 4.29 (*p-value* 0.004). The pen “Pentel”, that was the one with the higher amount of 2-PE at 18 months of age, showed a strong decay in the solvent levels, after 27 months, and the pen “Bic Crystal” slowed the ageing, being the pen after 27 months with the higher level of solvent, having statistical significant difference from 50% of the pens. “Unilaknok” was a pen which at the beginning had a high concentration of 2-PE and after 27 months aged quickly, being between the pens with the lowest level of solvents (together with BIC Ecolutions and Cis).

For the black pens, the pens tended to have more statistical significant differences than the blue pens, and showed a bigger variation of 2-PE content. The ANOVA was significant, with an *F-value* of 9.35 (*p-value* 0.000). Surprisingly, the pen “Bic Ecolutions”, that showed a low content of initial 2-PE, was the black pen that aged less, with the higher content of solvents after 27 months, followed by “Cis” and “Molin”. This inhomogeneity between different brands/models of pens after 27 months, even if a great number of pens did not show statistical significant difference in the 2-PE, turn on the warning light: comparisons between pens whose formulation is not known to be the same should be avoided, even after more than two years.

The results of 2-PE concentration for blue and black pens can be seen in Table 10.



Blue Pens – 18 months	2-PE concentration Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Black Pens – 18 months	2-PE concentration Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )
A26	0.13752 $\pm$ 0.01058 A	P2	0.2211 $\pm$ 0.0620 A
A11	0.1360 $\pm$ 0.0345 A B	P14	0.19260 $\pm$ 0.00333 A B
A4	0.13012 $\pm$ 0.00606 A B C	P11	0.17183 $\pm$ 0.01007 A B C
A12	0.11695 $\pm$ 0.00456 A B C D	P15	0.1546 $\pm$ 0.0178 A B C D
A29	0.113364 $\pm$ 0.000168 A B C D	P6	0.122596 $\pm$ 0.000632 B C D E
A23	0.1073 $\pm$ 0.0193 A B C D E	P26	0.1103 $\pm$ 0.0160 B C D E
A36	0.10668 $\pm$ 0.00936 A B C D E	P5	0.1073 $\pm$ 0.0250 B C D E
A17	0.10516 $\pm$ 0.00746 B C D E	P20	0.0986 $\pm$ 0.0205 C D E
A31	0.104172 $\pm$ 0.000851 B C D E	P21	0.0921 $\pm$ 0.0182 C D E
A35	0.102988 $\pm$ 0.000963 C D E	P16	0.09094 $\pm$ 0.01136 C D E
A32	0.0978 $\pm$ 0.0258 D E F	P1	0.0878 $\pm$ 0.0427 C D E
A30	0.0936 $\pm$ 0.0164 D E F G	P12	0.08073 $\pm$ 0.01267 C D E
A1	0.08050 $\pm$ 0.01413 E F G	P19	0.067257 $\pm$ 0.000666 D E
A19	0.06965 $\pm$ 0.00819 F G	P25	0.062665 $\pm$ 0.000274 D E
A16	0.0623 $\pm$ 0.0167 G	P10	0.04742 $\pm$ 0.00275 E

\* Fisher Test Means that do not share a letter are significantly different

† The letter "P" represents "black pens", the letter "A" represents the "blue pens"; the subsequent number is the pen code number.

SD = Standard Deviation

#### 3.4.1. Comparison of the concentration of 2-PE in blue and black ballpoint pen ink lines aged 27 months in controlled temperature and humidity with the same samples aged 27 months in conditions of natural luminosity, heat and humidity

In order to compare the behavior of the ballpoint pen strokes ageing in the darkness and controlled temperature with the ageing of these samples in natural conditions of an office room, the 2-PE of the samples with 27 months of age was quantified also for the samples stored in real life environment.

The results were as expected by the researchers, and coincided with the results obtained in the literature for samples stored in conditions of light, heat, air movement and higher humidity [8].

For both blue and black pens, the ink strokes stored in office room conditions aged faster than the ink stored in the darkness and controlled fresh temperature of the laboratory. The ANOVA of the samples was significant, with an *F-value* of 19.0 (*p-value* 0.000) for both colors of pens.

The samples stored in office room conditions tended to have lower levels of solvents, in comparison with the samples stored in the lab. The levels of 2-PE were in

average 42% lower in the samples stored in real life environmental conditions. The results for blue and black pens are resumed in Table 11.

This observation lead us to conclude that the methods for 2-PE detection with the objective to date manuscripts should have low Limits of Quantification, especially if the real samples are older than two years.

Koenig *et al.* [9] also observed a strong effect of storage conditions in their study. They concluded that the strong air flux of the climatic chamber where some samples were stored accelerated the drying processes in relation to the “normal air conditioning” conditions where other samples were maintained.

Table 5-11. Results of the ANOVA of 2-PE concentration in blue and black pens stored in controlled conditions and in office room conditions, after 27 months \*†. The samples with a letter “L” are the ones stored in office room.

Blue Pens	2-PE concentration Mean (µg/mL)	Black Pens	2-PE concentration Mean (µg/mL)
A26	0.13752 A	P2	0.2211 A
A11	0.1360 A	P14	0.19260 A B
A4	0.13012 A B	P11	0.17183 B
A12	0.11695 A B C	P15	0.1546 B C
A29a	0.11336 A B C	P6	0.122596 C D
A23	0.1073 B C D	P26	0.1103 D E
A36	0.10668 B C D	P5	0.1073 D E
A17	0.10516 B C D	P20	0.0986 D E F
A31	0.104172 B C D	P21	0.0921 D E F
A35	0.102988 B C D E	P16	0.09094 D E F
A32	0.0978 C D E	P1	0.0878 D E F G
A30	0.0936 C D E F	LP11	0.08104 E F G H
A1	0.08050 D E F G	P12	0.08073 E F G H
LA17	0.0756 E F G	P19	0.067257 F G H I
A19	0.06965 F G H	P25	0.062665 F G H I J
A16	0.0623 G H I	LP14	0.0508 G H I J K
LA23	0.05442 G H I J	P10	0.04742 H I J K L
LA11	0.04395 H I J K	LP12	0.0377 I J K L M
LA12	0.04028 I J K L	LP16	0.03467 I J K L M
LA4	0.03631 I J K L M	LP5	0.0339 I J K L M
LA19	0.0357 I J K L M	LP6	0.02575 J K L M
LA16	0.03523 I J K L M N	LP15	0.023327 K L M
LA1	0.03086 J K L M N	LP25	0.02047 K L M
LA26	0.03028 J K L M N	LP26	0.01633 K L M
LA35	0.029504 J K L M N	LP2	0.015494 K L M
LA31	0.0174 K L M N O	LP19	0.0125 K L M
LA30	0.015874 L M N O	LP21	0.01138 L M
LA36	0.01181 M N O	LP1	0.00802 M
LA29	0.00757 N O	LP20	0.00755 M
LA32	0.000408 O	LP10	0.001710 M

\* Fisher Test Means that do not share a letter are significantly different

† The letter “P” represents “black pens”, the letter “A” represents the “blue pens”; the subsequent number is the pen code number

### *3.4.2. Comparison of the concentration of 2-PE after 27 months, in blue and black ballpoint pen ink strokes applied in different kind of paper*

Previously we observed that the characteristics of the paper (white paper or recycled paper pulp) did not influence in the extraction of 2-PE of the majority of ballpoint pen ink strokes recently applied.

Then we concerned to investigate if the ageing of different kinds of paper could influence in the ageing and/or the efficiency of extraction of the solvents from ink strokes aged more than two years. Until now, it was not pointed a study evaluating the influence of the paper characteristics on the ageing of pen inks longer than one year. In view of this, it was performed the quantification of 2-PE for the 27 months aged samples applied in white paper (Paper 14, 75 g/m<sup>2</sup>) and in recycled paper (Paper 13, 75 g/m<sup>2</sup>), stored in laboratory controlled conditions and in office room natural conditions. Contrary to the results obtained for the samples of ink recently applied, for pen strokes with more than two years of age, the recycled paper provided higher concentrations of 2-PE for many pens analyzed. This effect may be caused by the porosity and different physical properties of the recycled paper fibers that would absorb the ink and provide a higher retention of solvents after the polymerization of the ink resins. The influence of recycled paper in the retention of 2-PE was more pronounced in black pens than in blue pens, for both storage conditions.

For the blue pens, the kind of paper influenced much less than in black pens, for both storage conditions. For the blue pens stored in controlled conditions, only five pen samples showed higher levels of 2-PE in recycled paper in relation to the white paper: “Stabilo”, “Cis”, “Unilaknok”, “Papermate” and “Pentel” of the laboratory presented higher 2-PE content in recycled paper than in white paper. Interestingly, the blue pens stored in office room conditions only presented influence of recycled paper in provide a higher level of 2-PE for three pen samples: “UniSas”, “Molin” and “Pilot”.

For the other pens, it was not observed statistical difference between the two kinds of papers. The Tables 12 and 13 present the ANOVA results for all treatments.

Table 5-12. Results of the ANOVA of 2-PE concentration in blue and black pens stored in office room conditions, after 27 months, comparing white paper and recycled paper <sup>\*†∞</sup>.

Black Pens	2-PE concentration Mean (µg/mL)	Blue Pens	2-PE concentration Mean (µg/mL)
LP13 P12	0.11160 A	LP14 A17	0.0756 A
LP13 P5	0.096306 A B	LP13 A17	0.0712 A B
LP13 P14	0.0887 A B	LP14 A23	0.05442 A B C
LP13 P25	0.0839 A B C	LP13 A16	0.0542 A B C
LP13 P6	0.0835 A B C	LP13 A32	0.05413 A B C
LP14 P11	0.08104 B C D	LP13 A23	0.050372 A B C
LP13 P2	0.0703 B C D E	LP13 A11	0.0459 B C D
LP13 P15	0.06995 B C D E	LP13 A36	0.04401 B C D E
LP13 P16	0.05763 C D E F	LP14 A11	0.04395 B C D E
LP13 P21	0.05365 D E F G	LP13 A26	0.04304 B C D E
LP14 P14	0.0508 E F G H	LP13 A35	0.04252 B C D E
LP13 P26	0.04894 E F G H I	LP13 A4	0.04129 C D E
LP13 P11	0.04843 E F G H I	LP14 A12	0.04028 C D E F
LP14 P12	0.0377 F G H I J	LP13 A12	0.04 C D E F
LP13 P20	0.03479 F G H I J K	LP13 A29	0.03986 C D E F
LP14 P16	0.03467 F G H I J K	LP13 A31	0.03968 C D E F
LP14 P5	0.0339 F G H I J K	LP13 A30	0.038431 C D E F G
LP14 P6	0.02575 G H I J K L	LP13 A19	0.0381 C D E F G
LP13 P1	0.02569 G H I J K L	LP14 A4	0.03631 C D E F G H
LP13 P10	0.02538 G H I J K L	LP14 A19	0.0357 C D E F G H
LP14 P15	0.023327 H I J K L	LP14 A16	0.03523 C D E F G H
LP13 P19	0.0231 H I J K L	LP14 A1	0.03086 C D E F G H
LP14 P25	0.02047 I J K L	LP14 A26	0.03028 C D E F G H
LP14 P26	0.01633 J K L	LP14 A35	0.029504 C D E F G H
LP14 P2	0.015494 J K L	LP14 A31	0.0174 D E F G H I
LP14 P19	0.0125 J K L	LP14 A30	0.015874 E F G H I
LP14 P21	0.01138 J K L	LP14 A36	0.01181 F G H I
LP14 P1	0.00802 K L	LP13 A1	0.01019 G H I
LP14 P20	0.00755 K L	LP14 A29	0.00757 H I
LP14 P10	0.001710 L	LP14 A32	0.000408 I

\* Fisher Test Means that do not share a letter are significantly different

† The letter "P" represents "black pens", the letter "A" represents the "blue pens"; the subsequent number is the pen code number

∞ The code LP13 means "Paper 13 stored in natural room conditions"; the code LP14 means "Paper 14 stored in natural room conditions".

Table 5-13. Results of the ANOVA of 2-PE concentration in blue and black pens stored in controlled laboratory conditions, after 27 months, comparing white paper and recycled paper <sup>\*†∞</sup>.

Black Pens	2-PE concentration Mean ( $\mu\text{g/mL}$ )	Blue Pens	2-PE concentration Mean ( $\mu\text{g/mL}$ )
P13P12a	0.2908 A	P13A35a	0.1904 A
P13P6a	0.26669 A B	P13A16a	0.1811 A B
P13P15a	0.24468 A B C	P13A19a	0.1789 A B C
P13P21a	0.2382 A B C D	P13A23a	0.1783 A B C
P13P20a	0.2322 A B C D E	P13A11a	0.175 A B C D
P13P5a	0.22546 B C D E	P13A17a	0.16412 A B C D E
P14P2a	0.2211 B C D E	P13A12a	0.1499 A B C D E F
P13P14a	0.2157 B C D E F	P13A29a	0.14524 B C D E F G
P13P25a	0.2081 B C D E F G	P13A36a	0.1444 B C D E F G H
P13P11a	0.2023 C D E F G	P13A4a	0.1402 B C D E F G H I
P13P19a	0.1997 C D E F G	P14A26a	0.13752 B C D E F G H I
P13P26a	0.1969 C D E F G	P14A11a	0.136 C D E F G H I J
P14P14a	0.1926 C D E F G	P13A32a	0.1345 D E F G H I J
P13P16a	0.1916 C D E F G	P14A4a	0.13012 E F G H I J
P13P2a	0.1848 C D E F G	P13A30a	0.1251 E F G H I J
P13P10a	0.1772 D E F G H	P13A31a	0.1234 E F G H I J K
P14P11a	0.17183 E F G H	P13A26a	0.12225 E F G H I J K
P14P15a	0.1546 F G H I	P14A12a	0.11695 F G H I J K
P13P1a	0.1534 G H I	P14A29a	0.113364 F G H I J K
P14P6a	0.122596 H I J	P14A23a	0.1073 F G H I J K L
P14P26a	0.1103 I J	P14A36a	0.10668 F G H I J K L
P14P5a	0.1073 I J K	P14A17a	0.10516 G H I J K L M
P14P20a	0.0986 I J K	P14A31a	0.104172 G H I J K L M
P14P21a	0.0921 J K	P14A35a	0.102988 G H I J K L M
P14P16a	0.09094 J K	P13A1a	0.10121 H I J K L M
P14P1a	0.0878 J K	P14A32a	0.0978 I J K L M
P14P12a	0.08073 J K	P14A30a	0.0936 J K L M
P14P19a	0.067257 J K	P14A1a	0.0805 K L M
P14P25a	0.062665 J K	P14A19a	0.06965 L M
P14P10a	0.04742 K	P14A16a	0.0623 M

\* Fisher Test Means that do not share a letter are significantly different

† The letter "P" represents "black pens", the letter "A" represents the "blue pens"; the subsequent number is the pen code number

∞ The code P13 means "Paper 13"; the code P14 means "Paper 14".

Koenig *et al.* [9]) tested two kinds of white paper (both with 80 g/m<sup>2</sup>), in laboratory conditions, and concluded that one of the papers influenced slightly the ageing of the samples (providing more 2-PE content) for some sample age (until 100 days). However, the white papers have less variation in physical and chemical properties between different brands, than when comparing white paper with recycled

paper, which is a paper with a fiber and additive composition quite different of the white paper.

### *3.5. Concentration of 2-PE in blue and black ballpoint pen ink lines with 3 years of ageing (36 months)*

For the blue pens, even after 3 years, there is still a statistical difference between the pen samples, resulting in a significant ANOVA with an *F-value* of 9.18 (*p-value* 0.000). The samples from “Tilibra”, “Injex” and “Papermate” showed the higher amounts of 2-PE, followed by a great group of pens without significant statistical difference, and the pens that had the lower amounts of solvent were “Unilaknok”, “Pilot” and “Bic Crystal”.

For the black pens, the results were more homogenous, with less statistical significant difference between the samples, with a significant ANOVA with an *F-value* of 4.66 (*p-value* 0.003).

However, some pen strokes presented statistical difference in the content of 2-PE, for example, the “Cis” pen line was the one that presented the higher amount of 2-PE and differentiated from almost all pens, except “Molin”. The pen “Molin” resulted statistically diverse from more than 50% of the samples, except, “Injex”, “Pentel”, “Bic Cristal”, “Papermate” and “Tilibra”. Coincidentally, the black color of pens “Injex”, “Tilibra” and “Papermate” did not differ statistically in the same way that the blue color of these pens.

The results for 2-PE concentration for pen strokes with 3 years old are resumed at Table 14.

Table 5-14. Results for 2-PE concentration for pen strokes with 3 years old\*†.

Blue Pens 36 months	2-PE concentration Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )		Black Pens 36 months	2-PE concentration Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	
A31	0.2821 $\pm$ 0.0434	A	P14	0.4185	A
A11	0.251045 $\pm$ 0.00034	A	P11a	0.3511	A B
A23	0.2389 $\pm$ 0.0253	A B	P5a	0.3168	B C
A4	0.1977 $\pm$ 0.0263	B C	P15a	0.31	B C
A30	0.194062 $\pm$ 0.0005	B C	P1a	0.2932	B C D
A17	0.19092 $\pm$ 0.01009	C	P16a	0.2932	B C D
A12	0.1883 $\pm$ 0.0176	C	P21a	0.2618	B C D E
A36	0.1843 $\pm$ 0.0185	C D	P6a	0.23878	C D E
A32	0.183587 $\pm$ 0.00010	C D	P10a	0.2382	C D E
A16	0.1685 $\pm$ 0.0198	C D E	P2a	0.2354	C D E
A35	0.1509 $\pm$ 0.0178	C D E F	P19a	0.2203	C D E
A1	0.14033 $\pm$ 0.00258	D E F	P12a	0.2016	D E
A19	0.1362 $\pm$ 0.0172	E F	P20a	0.1936	E
A29	0.133 $\pm$ 0.0472	E F	P26a	0.1805	E
A26	0.1104 $\pm$ 0.00600	F	P25a	0.16759	E

\* Fisher Test Means that do not share a letter are significantly different

† The letter "P" represents "black pens", the letter "A" represents the "blue pens"; the subsequent number is the pen code number.

SD = "standard deviation".

### 3.5.1. Comparison of the concentration of 2-PE after 36 months, in blue and black ballpoint pen ink strokes applied in different kind of paper

Evaluating the influence of white or recycled paper in the quantities of solvents in the pen strokes with 3 years age, it was observed that if there was a considerably effect of the recycled paper in a higher amount of 2-PE for samples with 27 months, as older the samples, higher the influence of recycled paper. Almost all the blue pen lines wrote in recycled paper (except for "Tilibra") presented more 2-PE than the ones in white paper.

For black pens, the behavior was the same that for the blue pens, and almost all black pen lines wrote in recycled paper presented more 2-PE than the ones in white paper, except "Injex", "Molin", "Bic Cristal", "Bic Atlantis" and "BRW".

It is important to emphasize that these results were for pens strokes stored in controlled laboratory conditions of low temperature and in the darkness.

It is interesting to note that the status at 36 months inverted in relation to the status at 27 months, once with 27 months, the black pens showed more influence of the recycled paper than the blue pens, and after 36 months, the blue pens showed the more pronounced effect of the kind of paper.

### 3.6. Regression curves of 2-PE concentration versus ageing of blue and black pens

In order to evaluate the general behavior of the ballpoint pen strokes aged until 36 months (3 years), regression curves of 2-PE concentration versus time of age were constructed to modelling the decrease rates of this solvent to each brand/model of pen analyzed.

The ageing rates of the pen strokes were expressed by the exponential factor  $(-\tau x)$  of the regression equation (1), as:

$$y = i. e^{-\tau x} \quad (1)$$

Where  $i =$  the intercept coefficient

$\tau =$  the coefficient of time

The greater this exponential factor, the faster is the ageing of the pen stroke, in terms of 2 – PE concentration.

The regression equations for the blue and black pen ink strokes followed through 36 months are presented in Table 15.

Table 5-15. Regression Equations for the curves constructed from 0 to 3 years of ageing of blue and black ink strokes in white paper†.

Blue Pens	Regression equation	Black Pens	Regression equation
-----------	---------------------	------------	---------------------



A1 Bic ecol	$y = 0.2835e^{-0.028x}$	P2 Bic ecol	$y = 1.13e^{-0.052x}$
A31 Tilibra	$y = 2.16e^{-0.064x}$	P25 Unisas	$y = 1.34e^{-0.063x}$
A11 Injex	$y = 1.64e^{-0.068x}$	P11 Molin	$y = 2.53e^{-0.063x}$
A16 Cis	$y = 1.8649e^{-0.07x}$	P1 Bic crystal	$y = 1.88e^{-0.064x}$
A12 BRW	$y = 1.47e^{-0.071x}$	P15 Pentel	$y = 2.73e^{-0.064x}$
A26 Bic Crystal	$y = 1.4078e^{-0.076x}$	P5 Injex	$y = 2.39e^{-0.065x}$
A17 Pentel	$y = 2.84e^{-0.076x}$	P21 Tilibra	$y = 2.6e^{-0.073x}$
A4 Faber	$y = 2.49e^{-0.088x}$	P10 BRW	$y = 2.55e^{-0.078x}$
A32 Unisas	$y = 2.27e^{-0.091x}$	P14 Cis	$y = 5.3e^{-0.078x}$
A35 Stabilo	$y = 2.273e^{-0.091x}$	P6 Faber	$y = 2.93e^{-0.08x}$
A19 Unilaknok	$y = 3.55e^{-0.092x}$	P12 Unilaknok	$y = 2.86e^{-0.081x}$
A36 Molin	$y = 3.178e^{-0.099x}$	P26 Molin	$y = 2.09e^{-0.085x}$
A23 Papermate	$y = 5.75e^{-0.104x}$	P16 Papermate	$y = 5.68e^{-0.095x}$
A29 Pilot	$y = 4.5e^{-0.115x}$	P20 Pilot	$y = 2.58e^{-0.101x}$
A30 Bic Atlant	$y = 4.81e^{-0.118x}$	P19 Bic Atlantis	$y = 7.7e^{-0.114x}$

† The letter "P" represents "black pens", the letter "A" represents the "blue pens"; the subsequent number is the pen code number.

Comparing the exponential factor of the blue pens regression equations, and also the intercept, it could be concluded that higher the initial content of 2-PE, higher will be the rate of ageing, that is, the solvents will evaporate faster from the bulk of the ink.

In relation of the black pens, the behavior of the ageing did not follow exactly the same default. For example, the samples from pen P14 (Cis) and pens P16 (Papermate) had higher initial concentration of 2-PE, however, the rate of ageing were not superior to 0.095; the pen P20 (Pilot) even with an intercept of 2.58, showed a rate of ageing of 0.101.

In view of the concept introduced by Locicero *et al.* and Bügler *et al* [14, 18], in which the pens would be classified in faster, medium and slow ageing, the pens of the present study could be allocated in the same classes, based on the exponential factor of the ageing curve, as follows:

- 1) Slow ageing: samples having the exponential factor until “- 0.054”.
- 2) Medium ageing: samples having the exponential factor between “- 0.055” and “- 0,089”.
- 3) Fast ageing: samples having the exponential factor higher than “-0,09”.

Looking at the results for the pens of the present study, it could be observed that the blue pens have more samples classified as “fast ageing” than the black pens. Some authors applied a statistical approach based on a double exponential scale for a better representation of the decrease of the solvents in the ink entries with time. This approach allows to express a regression equation where it could be identified an inflexion point where the evaporation of 2-PE changes to a fast mode to a slow mode [25, 14, 15, 8, 12].

However, the simple exponential regression used in the present study also fitted in an appropriate manner the ageing behavior of the pens, and it is an easy available statistical tool to model the ageing process.

Performing the ANOVA, for the last points of age, in the ageing curves, it was observed that some samples did not presented statistical significant difference between the 2-PE concentration in 18 months, 27 months and 36 months. Some samples did not presented statistical difference in the 2-PE concentration after 27 and 36 months. Other samples presented statistical significant difference between the 2-PE concentration in the three ages and were still ageing. Some samples (mainly the black pens: P25, P1, P5 and P12) presented a result out of the default; in these

samples, the 2-PE concentration at 18 months was lower and statistically different from the results at 27 months, and at the same time, statistically equal to the 2-PE concentration at 36 months. This behavior could have a reason in the ageing and degradation/polymerization of the resins and other additives of the pen composition, that could affect the delivery of 2-PE depending on the age of these additives or resins.

From the samples classified as medium ageing, the pens A11, A12, A26 did not show statistical difference between 27 and 36 months; the pens A17 and A4 did not show statistical difference between 18, 27 and 36 months, that is, stopped the ageing, while the pen A31 paused the ageing between 18 and 27 months and restarted the evaporation at 36 months. The black pens that did not show statistical difference between 27 and 36 months were only P10 and P26; the pens P15, P21 and P6 paused the ageing between 18 and 27 months and restarted the evaporation at 36 months. The black pens P11 and P14 stopped the ageing at 18 months.

From the samples classified as fast ageing, the blue pens A35, A36, A29 and A30 (coincidentally the three last cited, the ones with higher initial amounts of 2-PE) stopped the ageing at 27 months. The samples A32, A19 and A23 stopped the ageing at 18 months (the two last cited had higher initial amounts of 2-PE). For the fast ageing black pens, all the samples (P16, P20 and P19) stopped the ageing at 18 months.

The Figures 1 and 2 present the overview of pen ageing by a graph plot of 2-PE concentration in blue and black pen strokes through time.

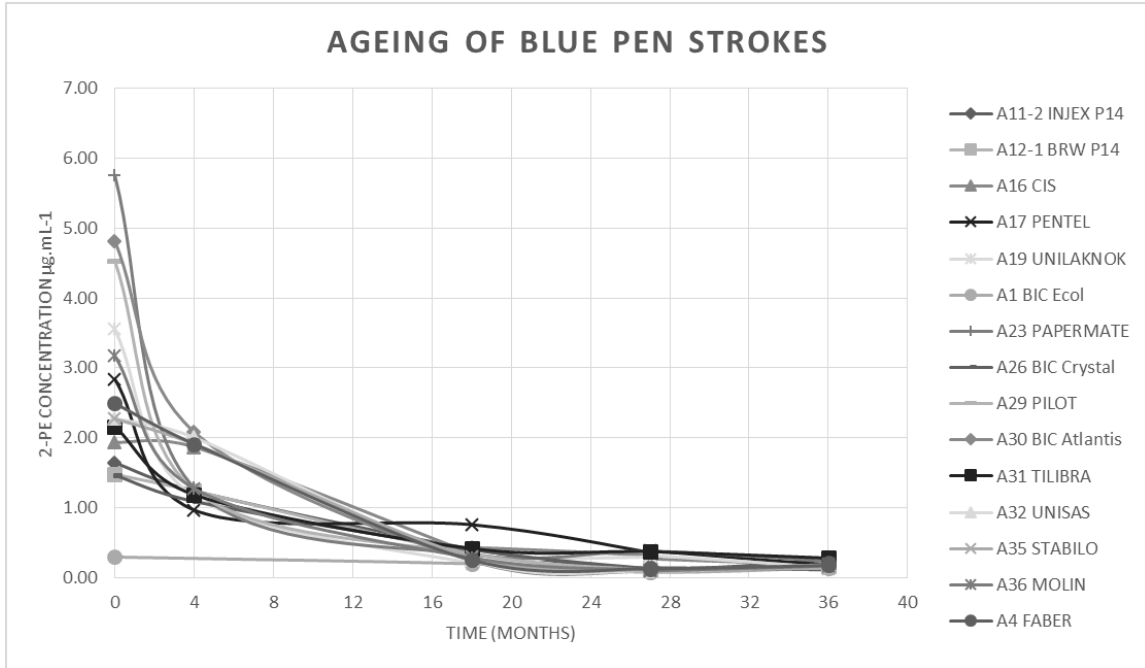


Figure 5-1. Ageing overview of blue pen strokes.

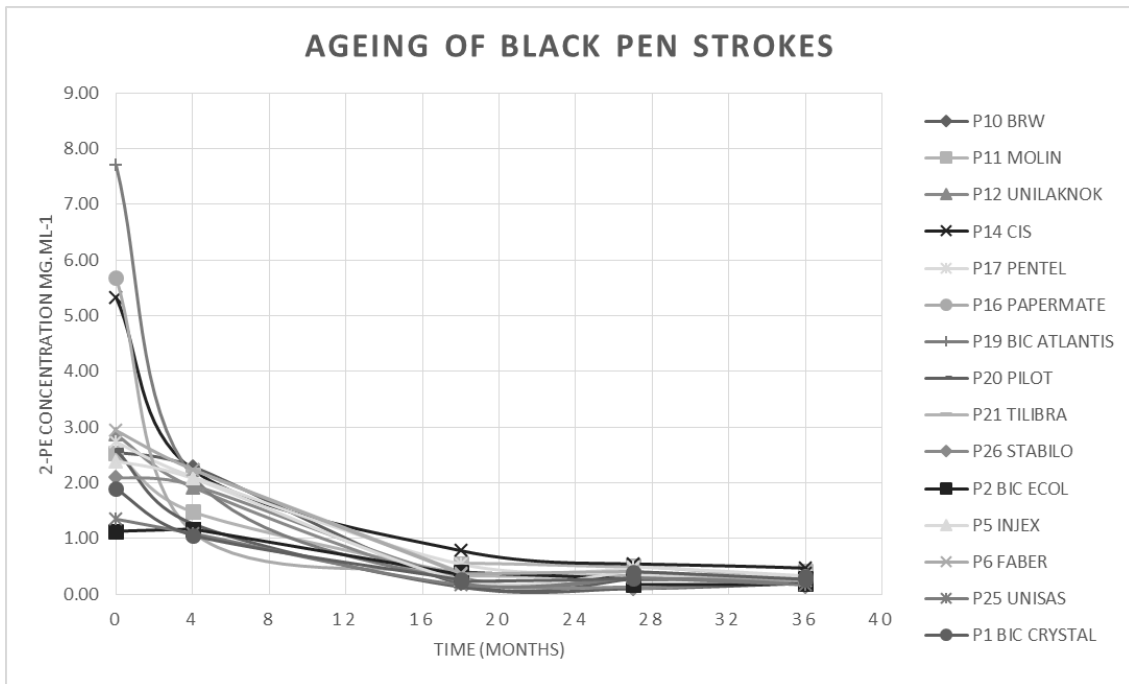


Figure 5-2. Ageing overview of black pen strokes

#### 4. Conclusions

Based on all the experiments results, we could conclude that the Brazilian ballpoint pen strokes have lower initial concentration of solvents than ballpoint pens in Europe, however, the ageing profile is similar. The great majority of the brands did not differed statistically in the 2-PE initial amounts for blue and black pens.

Looking at the results for different kind of papers, it could be concluded that the paper did not influence in the 2-PE concentration in recently applied strokes, but do influence the quantity determined for strokes aged 27 and 36 months. The environmental conditions also influenced the ageing process, where the samples stored in light, higher relative humidity and under temperature oscillations aged faster than the samples stored in darkness and controlled conditions of the laboratory.

The profile of ageing of the pens in laboratory conditions showed that the majority of the pens presented statistical difference between 2-PE concentration determined at the initial, after 4 months and 18 months, but the concentration at 27 and 36 months did not differ in many pens. The ageing profile showed that the pens could be classified on three classes: slow ageing, medium ageing and fast ageing. The samples that were fast ageing, in the majority were the ones with the highest initial concentration of 2-PE, and tended to stop ageing at 27 months, in relation to the medium ageing pens.

All the results of this paper make up an overview of the behavior of pen strokes ageing in Brazilian samples. Further studies should be conducted aiming to improve the statistical analysis in view of an appropriate application to real forensic cases.

## 6. References

- [1] J. ANDRASKO, Changes in composition of ballpoint pen inks on aging in darkness. *Journal of Forensic Sciences*, 47 (2), (2001), 324-327.
- [2] D.M. GRIM; J. SIEGEL; J. ALLISON, Evaluation of laser desorption mass spectrometry and UV accelerated aging of dyes on paper as tools for the evaluation of a questioned document. *Journal of Forensic Sciences*, 47 (6), (2002), 1-9.
- [3] WEYERMANN, C.; KIRSCH, D.; VERA, C.C.; SPENGLER, B. Photofading of ballpoint dyes studied on paper by LDI and MALDI MS. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 17 (2006), 297-306.
- [4] WEYERMANN, C.; SPENGLER, B. The potential of artificial aging for modeling of natural aging processes of ballpoint ink. *Forensic Science International*, 180 (2008), 23-31.
- [5] WEYERMANN, C.; KIRSCH, D.; VERA, C.C.; SPENGLER, B. Evaluation of the photodegradation of crystal violet upon light exposure by mass spectrometric and spectroscopic methods. *Forensic Science International*, 54 (2) (2009), 339-45.
- [6] LALLI, P.M.; SANVIDO, G.B.; GARCIA, J.S.; COSSO, R.G.; MAIA, D.R.J.; ZACCA, J.J.; MALDANER, A.O.; EBERLIN, M.N. Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 135 (2010) 745-750.
- [7] AGINSKY, V.N. Measuring ink extractability as a function of age – why the relative aging approach is unreliable and why it is more correct to measure ink volatile components than dyes. *International Journal of Forensic Document Examiners*, 4 (3), (1998) 214-230.
- [8] KOENIG, A.; MAGNOLON, S.; WEYERMANN, C. A comparative study of ballpoint ink aging parameters using GC/MS. *Forensic Science International*, 252 (2015), 93-106.
- [9] KOENIG, A.; BÜGLER, J.; KIRSCH, D.; KÖHLER, F.; WEYERMANN, C. Ink dating using thermal desorption and gas chromatography/mass spectrometry: comparison of results obtained in two laboratories. *Journal of Forensic Sciences*, 60 (S1), (2015) jan. 152-61.
- [10] SAN ROMÁN, I.; BARTOLOMÉ, L.; ALONSO, M.L.; ALONSO, R.M.; EZCURRA, M. DATINK pilot study: An effective methodology for ballpoint pen ink dating in questioned documents. *Analitica Chimica Acta*, 892, (2015), Sep 10, 105-14.
- [11] DIAZ-SANTANA, O.; VEGA-MORENO, D.; CONDE-HARDISSON, F. Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-diode array detection for dating of paper ink. *Journal of Chromatography A.*, 1515, (2017), 187-195.
- [12] KOENIG, A.; WEYERMANN, C. Ink dating, part I: Statistical distribution of selected ageing parameters in a ballpoint inks reference population. *Science Justice*, 58 (1), (2018), 17-30.
- [13] STEWART, L.F. Ballpoint ink age determination by volatile component comparison – a preliminary study. *Journal of Forensic Sciences*, 30 (2), (1985) 405-411.
- [14] LOCICIRO, S.; DUJOURDY, L.; MAZZELLA, W.; MARGOT, P. Dynamic of the ageing of ballpoint pen inks: quantification of phenoxyethanol by GC-MS. *Science Justice*, 44 (3), (2004), 165-171.
- [15] WEYERMANN, C.; KIRSCH, D.; VERA, C.C.; SPENGLER, B. A GC/MS study of the drying of ballpoint pen ink on paper. *Forensic Science International*, 168 (2007), 119-127.
- [16] BRAZEAU, L.; GAUDREAU, M. Ballpoint Pen Inks: The Quantitative Analysis of Ink Solvents on Paper by Solid-Phase Microextraction. *Journal of Forensic Sciences*, 52 (1), (2007), 209-15.
- [17] BERGER-KARIN, C.; HENDRIKS, U.; GEYER-LIPPMANN, J. Comparison of natural and artificial aging of ballpoint inks. *Journal of Forensic Sciences*, 53 (4), (2008) 989-992.
- [18] BÜGLER, J.H.; BUCHNER, H.; DALLMAYER, A. Age determination of ballpoint pen ink by thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Forensic Sciences*, 53 (4), (2008), 982-88.
- [19] DIAZ-SANTANA, O.; CONDE-HARDISSON, F. VEGA-MORENO, D.; Comparison of the main dating methods for six ball-point pen inks. *Microchemical Journal*, 138, (2018), 550-551.
- [20] WEYERMANN, C.; ALMOG, J.; BÜGLER, J.; CANTU, A.A. Minimum requirements for application of ink dating methods based on solvent analysis casework. *Forensic Science International*, 210, (2011), 52-62.

- [21] CARVALHO, C.M.B. Analisis of the initial concentration of solventes from ballpoint pen ink. *Revista Brasileira de Ciências Policiais*, 5 (1), (2014), 65-96.
- [22] WEYERMANN, C.; SCHIFFER, B.; MARGOT, P.; A logical framework to ballpoint ink dating interpretation. *Science and Justice*, 48, (2008), 118-125.
- [23] J. ANDRASKO; M. KUNICKI, Inhomogeneity and Aging of Ballpoint Pen Inks Inside of Pen Cartridges. *Journal of Forensic Sciences*, 50 (3), (2005), 1-6.
- [24] GRIM, D.M.; SIEGEL, J.; ALLISON, J. Does ink age inside of a pen cartridge? *Journal of Forensic Sciences*, 47 (6), (2002) Technical Note.
- [25] CANTU, A.A. A study of the evaporation of a solvent from a solution – application to writing ink aging. *Forensic Science International*, 219, (2012): 119-128.





---

## 9. DISCUSSÃO GERAL



No dia a dia da perícia criminal, as questões envolvendo fraudes em documentos são as mais diversas, considerando tanto o papel de suporte, o tipo de caneta utilizado, a presença ou não de adulterações (rasuras, sobreposições, obliterações), a simulação de elementos de segurança em documentos oficiais, e ainda o envelhecimento artificial ou simulação pictórica de um documento antigo. Algumas fraudes são facilmente identificáveis pela descoberta de anacronismos, ou seja, um recibo impresso por uma gráfica que ainda não havia sido fundada no ano que o documento se encontra datado, por exemplo, ou até mesmo o uso de tecnologias de impressão não inventadas ou facilmente encontradas no ano em que o documento foi datado. Esta seria uma datação estática.

Entretanto, quando a questão envolvendo a autenticidade de data de um documento passa somente pela análise das tintas de canetas dos manuscritos presentes no mesmo, se destaca a expertise em química forense do Perito em Documentoscopia, que precisa realizar análises químicas das canetas visando uma datação chamada dinâmica. Nos anos 70, nos Estados Unidos da América, as cortes aceitavam um exame pericial se ele usasse métodos válidos cientificamente, entretanto, quem decidia sobre a validade era o próprio juiz. Entretanto, em 1993, a Suprema Corte reiterou a necessidade da competência e qualificação do perito e afirmou que os métodos e procedimentos deveriam ser confiáveis de acordo com o critério *Daubert*: verificação de uma teoria ou técnica através de testes; publicações com revisão por pares; níveis de erro experimental conhecidos e aceitação pela comunidade científica (WEYERMANN *et al.*, 2008b). Estes critérios também são aplicáveis para exames envolvendo datação de tintas de caneta. Diversos autores têm trabalhado no desenvolvimento de métodos de datação de tintas, entretanto nem todos têm se preocupado com a validação destes métodos e com os possíveis fatores de variabilidade intrínsecos, como as condições ambientais de armazenamento (calor, umidade, exposição a luz), a composição inicial e formulação das tintas das canetas, e as características físico-químicas do tipo de papel usado.

Um dos objetivos alcançados na elaboração do presente estudo foi a realização de estudos de validação do método de quantificação do 2-FE, um solvente da composição das canetas que evapora com o tempo após a aplicação do traço no papel e pode ser um indicativo cronológico deste traço, por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas. A conclusão obtida de que o método pode ser reproduzido, é linear, possui um Limite de Quantificação baixo, é sensível e específico é de extrema

importância para a rotina do perito criminal. De acordo com Koenig e Weyermann (2018), o desenvolvimento de métodos de datação de tinta requer uma quantidade importante de trabalho para ser confiável na prática. As principais tarefas incluem a definição de parâmetros de envelhecimento para monitorar o envelhecimento da tinta. Um parâmetro adequado deve idealmente preencher os seguintes critérios: ele deve evoluir em função do tempo de forma monotônica, ser mensurável na maioria dos lançamentos de tinta, ser tão preciso e reproduzível quanto possível e, finalmente, não deve ser demasiadamente influenciado por condições de transferência e armazenamento.

A análise de diferentes tipos de papel suporte mostrou que o papel é um fator de variabilidade na quantificação de solventes com o fim de datar um documento. O experimento fatorial conduzido com dois tipos de papel, um branco alvejado, e um papel reciclado não alvejado, ambos com alta e baixa gramatura, mostrou que a característica físico-química do papel de suporte pode influenciar na quantidade extraída de 2-FE. Tanto Cantu (1996) quanto Aginsky (1998) citam a importância da influência do papel na datação dos documentos, entretanto referem-se à alteração na quantidade extraída de corantes das tintas, e não aos solventes. O raciocínio no caso dos solventes seria semelhante ao tido para os corantes, entretanto, Aginsky (1998) afirma, em uma nota de rodapé de seu estudo, que como o método usado por ele para análise de solventes não é de datação relativa (comparação entre padrões de envelhecimento e o documento questionado) o estudo comparando diferentes papéis não foi realizado por ele.

Bügler e colaboradores (2008), embora estivessem analisando solventes, não levaram em consideração o efeito do papel pelo fato de usarem o método de extração sequencial de solventes, que compararia a amostra com ela mesma, realizando uma razão da quantidade de compostos voláteis dessorvidos à baixa temperatura (70 °C por 20 min) pela proporção de compostos voláteis dessorvidos em alta temperatura (200 °C por 5 min). Neste caso o efeito do papel, segundo eles, seria negligenciável, mas nas conclusões estes autores acabam concluindo que o efeito do papel foi importante no resultado final. Usando o mesmo método da extração sequencial, Koenig e colaboradores (2015b) verificaram que o papel influenciou na quantidade de solventes extraída. Desta forma, completando a lacuna deixada por Aginsky, a presente Tese vem de encontro ao já observado por Koenig e colaboradores (2015b), comprovando que mesmo realizando-se a datação focando na quantificação de

solventes, o papel influencia na extração e também no processo de evaporação dos mesmos com o passar do tempo.

Ao mesmo tempo em que a tinta da caneta envelhece, o papel também sofre degradação, mas em uma velocidade muito menor que a da tinta da caneta (CANTU, 1996). Alguns parâmetros que alteram-se, indicando o envelhecimento do papel são a “resistência a dobra”, “resistência a tensão”, “refletância óptica”, “amarelamento” e “fluorescência”. Em uma temperatura elevada, a resistência a dobra diminui não-linearmente (exponencialmente), com a idade. Na temperatura ambiente de um escritório, por exemplo, um papel demoraria 10 anos para começar a diminuir a resistência a dobra (CANTU, 1996).

Os mecanismos que causam a degradação física e química do papel, seja por envelhecimento natural ou artificial, são a hidrólise, a oxidação, a formação de ligações cruzadas, a degradação térmica e fotoquímica. Estas reações podem ser afetadas pela temperatura, umidade, nível de radiação, poluentes, entre outros. Apesar das modificações no papel ocorrerem a nível molecular, o resultado pode ser monitorado pelas alterações nas características físicas do papel, como coloração, resistência das ligações entre as fibras do papel e comportamento viscoelástico (WATERHOUSE, 1988).

Documentos forjados para parecerem antigos muitas vezes são produzidos utilizando-se calor para acelerar o envelhecimento do papel. Entretanto, papéis realmente antigos apresentam a emissão de compostos orgânicos voláteis provenientes das reações químicas ocorridas com a celulose, durante o processo de envelhecimento (LATTUATI-DERIEUX *et.al.*, 2006). Um envelhecimento artificial acelerado com calor pode produzir um efeito pictórico de papel antigo, sem essencialmente causar esta degradação na celulose.

No estudo de caso descrito no artigo presente no capítulo 1 da presente Tese, diversos recibos apresentados a exame se mostravam amarelados e com as bordas um tanto retorcidas, como por efeito de umidade. Artesanalmente, o efeito amarelado com bordas retorcidas pode ser obtido aplicando café ou chá preto em um papel branco. Durante os exames de amostras do papel do recibo extraídas, os Peritos se depararam com a presença da substância cafeína, comprovando a presença de envelhecimento artificial. Foi a primeira vez que se conseguiu identificar o método de falsificação por uso de café ou chá.

Nem sempre os peritos têm as condições técnicas de testar as propriedades dos papéis para inferir a sua idade, entretanto, a detecção de cafeína em um papel com aspecto envelhecido pode ser indicativa de uma fraude. Assim, o aprimoramento das condições do método de análise da cafeína aplicado a simulação de envelhecimento de papéis se torna muito importante para garantir a correta extração e detecção desta substância, evitando falsos negativos.

Uma constatação interessante, observando o exame da influência do papel na datação de um documento a partir da extração do solvente 2-FE, em conjunto com o planejamento fatorial visando otimizar a detecção de cafeína em documentos com simulação de envelhecimento, é que nos dois experimentos, o papel reciclado com gramatura alta apresentou o maior teor da substância alvo, mais uma vez confirmando que a composição de fibras do papel, sua porosidade e a espessura da lâmina de papel são fatores decisivos na análise de substâncias adsorvidas.

Carvalho (2014) e outros autores (WEYERMANN *et al.*, 2007a) observaram que diversas canetas esferográficas contêm diferentes concentrações iniciais de 2-FE em suas formulações. Um dos objetivos da presente Tese foi estudar o comportamento de evaporação do 2-FE de diversas marcas de canetas para verificar se mesmo com concentrações iniciais diferentes de 2-FE, esta diferença se torna insignificante com o envelhecimento. Embora a composição química de uma caneta esferográfica seja composta de uma maioria de substâncias comuns entre as diversas marcas, não se tem a confirmação ainda se alguma substância diferente usada na formulação possa influenciar de forma diferente o processo de evaporação dos solventes.

Por este motivo, o estudo realizado no artigo do Capítulo 4, procurou identificar os diferentes perfis químicos da composição de diversas canetas esferográficas, utilizando a ferramenta de Espectrometria de Massas Orbitrap, a qual através de captura de íons de alta resolução de massa, é capaz de diferenciar com precisão mesmo substâncias com mesma fórmula molecular, mas com massas exatas diferentes. Isto é de grande interesse quando se trata de corantes relacionados em famílias de substâncias, como por exemplo, a chamada “cascata do cristal violeta” (formada pela perda de uma partícula com 14 unidades de massa: metil violeta, tetrametilpararosanilina,  $m/z$  330,  $m/z$  316, e pararosanilina ( $m/z$  288)). Outras famílias de corantes também são muito utilizadas nas formulações de canetas, como a família do Azul Vitória, e do Azul Vitória BO (ou azul básico 7).

A possibilidade de verificação da formulação de tinta de dois traços de canetas em comparação, provenientes de um documento suspeito de falsificação, se torna importante no momento em que esclarece ao perito se a caneta supostamente falsa é de formulação igual a caneta original do documento. Para se chegar a esse resultado, a aplicação da Estatística Multivariada é útil no momento em que possibilita a análise de diversas variáveis formando grupos de canetas de formulações semelhantes.

De forma interessante, na presente Tese, os resultados obtidos na Análise de Grupamentos Hierárquicos (HCA) mostraram certa distância euclidiana até mesmo para canetas de mesma marca, mas de modelos diferentes, comprovando que os fabricantes variam bastante as formulações. A Análise de Componentes Principais (PCA) apontou quais substâncias mais se destacaram da diferenciação ou agrupamento de canetas. Algumas formulações de canetas mostraram-se bastante relacionadas, contendo em sua formulação substâncias iguais em sua maioria, enquanto outras se diferenciaram substancialmente.

A vantagem do Orbitrap é a facilidade de introdução da amostra, que necessita somente de uma extração simples, sem muito preparo, diferente de técnicas como MALDI-TOF, que requer um preparo mais trabalhoso de amostra (SIEGEL *et al.* 2005). Além disto, a inserção da amostra no Orbitrap pode ser direta ou passar por uma separação cromatográfica, entretanto, ao se utilizar a estatística multivariada levando em consideração a intensidade relativa dos picos das massas exatas, a separação cromatográfica se torna dispensável.

Sun e colaboradores (2016) além de desenvolver o método de análise de tintas de canetas com o Orbitrap, realizaram a validação do método, verificando que os sinais do espectro de massas de nove corantes de referência mostraram boa linearidade nas variações de concentração, bem como a repetitividade do método foi adequada. Entretanto, estes autores não aplicaram a ferramenta de estatística multivariada nos espectros obtidos para as amostras estudadas.

De forma diversa do estudo realizado na presente Tese, Sun e colaboradores (2016), dentre as canetas analisadas por eles, não encontraram corantes ácidos nas formulações. Portanto, a presença dos corantes ácidos tanto quanto básicos, aliada a presença também de massas de outras substâncias como aditivos, resinas, diluentes, pigmentos, detectados pelo Orbitrap, e submetidos a análise estatística multivariada, proporciona um poder de discriminação muito maior.

Entretanto, a forma de ionização por ESI (electrospray ionization) do Orbitrap é mais suave, e neste caso, observou-se que a ionização dos corantes (cuja formulação é composta por aminas quaternárias, no caso dos corantes básicos e por sulfatos no caso dos corantes ácidos) é preferencial à ionização do 2-FE. A detecção da massa exata do 2-FE ( $m/z$  138,0608), durante os experimentos realizados no Orbitrap, já demonstrados no Capítulo 5 desta Tese, foi suprimida pela ionização preferencial dos corantes. O desenvolvimento de uma metodologia que supere esta limitação da técnica poderá ser interessante para o estabelecimento de um método multi-analítico.

O Orbitrap é uma ferramenta avançada de análise da fórmula completa das canetas para a diferenciação e/ou agrupamento, aplicando-se a Análise Estatística Multivariada. Entretanto, apesar desta eficiência em termos de resolução de massa, esta técnica não deixa de ser uma técnica destrutiva, pois um pedaço do manuscrito necessita ser retirado do documento para extração e inserção do extrato no Espectrômetro de Massas.

Na esfera forense, a alteração de um documento questionado através da retirada de uma amostra para análises de tintas de canetas dos manuscritos, não é um procedimento desejável, mas muitas vezes impossível de ser evitado. Assim, o desenvolvimento de métodos não destrutivos como análise dos traços de caneta utilizando o Acessório de Refletância Total Atenuado acoplado ao Espectrômetro de Infravermelho (ATR-IV), se torna uma alternativa interessante.

No presente estudo, os resultados obtidos com a obtenção dos espectros das tintas de diversas marcas e modelos de canetas azuis e pretas, utilizando o ATR-IV, mostraram que o alcance do feixe vai a uma profundidade suficiente para que somente se analise a tinta da caneta, não havendo influência do papel. Alguns autores não conseguiram evitar a influência do papel em seus experimentos, o qual praticamente impediu a aplicação da técnica (CHEN *et al.*, 2002; HARRIS, 2016). O uso da ferramenta estatística multivariada, como PCA e HCA foi muito importante na diferenciação das canetas, demonstrando que mesmo canetas da mesma marca puderam ser diferenciadas pela HCA, mantendo-se próximas, mas com certa distância euclidiana, demonstrando que as amostras não eram provenientes da mesma origem. A efetividade da técnica de ATR-IV foi comprovada ao se compararem os resultados da HCA para as tintas coletadas diretamente do cartucho com as coletadas do papel. Os grupamentos hierárquicos mantiveram-se agrupando as mesmas canetas, inclusive as canetas que possuíam representantes do mesmo modelo, porém



provenientes de dois lotes diferentes, agruparam juntas independentemente do método utilizado.

Muitos autores buscaram diferenciar as canetas por IV, usando ou não ATR, e aplicaram PCA e HCA com resultados efetivos de diferenciação, mesmo com alguma dificuldade de interpretação ( KHER *et. al.* 2006; SENIOR *et. al.* 2012; SILVA *et. al.* 2013; SHARMA e KUMAR, 2017). Senior e colaboradores (2012) haviam sido os únicos até o momento que buscaram efetuar a datação das tintas de canetas utilizando IV, entretanto, a análise destes autores baseou-se em análise direta da tinta extraída, sem o suporte de papel, e a diferenciação por data não aparece apresentada de forma clara no artigo. Por este motivo, o resultado mais importante do estudo das canetas por ATR-IV realizado na presente Tese, foi a identificação dentre os *loadings* que influenciam no posicionamento das amostras nas PCs, absorções relativas ao 2-fenoxietanol, pesando nas PCs onde se localizavam as amostras recentemente aplicadas.

A maioria das amostras mostrou estas absorções contando de forma importante nos traços recentemente aplicados, mas também foi possível identificar estas absorções nos *loadings* de amostras com 14 dias, 7 meses e para algumas, até mesmo com 1 ano de aplicadas. Nos *loadings* das PCs onde as amostras com mais de dois anos ficaram alocadas, não foi possível observar como importante a absorção do 2-FE.

Esta observação pode, associada a análise quantitativa do 2-FE por CG/EM, dar um indicativo da idade do lançamento manuscrito, em análises de comparação entre manuscritos dentro de um mesmo documento. É importante que mais estudos envolvendo outras coleções de canetas, levando em conta diferentes condições de armazenamento, sejam feitos, para a confirmação destes achados, com o objetivo de simular as condições empíricas o mais próximo possível das condições reais dos casos forenses.

O agrupamento das canetas de espectros de infravermelho semelhantes forneceu subsídios para que dentre o número total de canetas, se pudesse escolher algumas representativas de cada agrupamento da HCA, para se acompanhar a evaporação de 2-FE através do tempo. Neste estudo de acompanhamento da evaporação de 2-FE e envelhecimento dos traços de canetas, que compõe o capítulo 8 da presente Tese, alguns resultados já eram esperados, entretanto outros surpreenderam por serem diversos da maioria relatada na literatura.

As concentrações iniciais de 2-FE determinadas nas canetas brasileiras foram notadamente menores do que as mencionadas em trabalhos realizados na Europa (KOENIG *et al.* 2015a; KOENIG e WEYERMANN, 2018; DIAZ-SANTANA *et al.* 2018). Talvez o clima mais quente existente no Brasil leve as indústrias desenvolverem produtos com formulações que possuam menos solventes.

Um aspecto importante é que mesmo muitas canetas possuindo teores de 2-FE iniciais sem diferença estatística, alguns exemplares se destacaram por conter muito altas ou muito baixas concentrações. Esta heterogeneidade entre os teores de 2-FE se mantém mesmo em canetas com 3 anos de envelhecimento, ou seja, mesmo com concentrações muito menores do que as iniciais (a maioria se apresentando na faixa de  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), diversas canetas ainda apresentaram diferença estatística entre si, demonstrando que mesmo após o envelhecimento, a confirmação da identidade de formulação de dois traços de caneta em comparação é fundamental prioritariamente a análise de solventes, visando a datação. Neste ponto entra a utilidade da espectrometria no Infravermelho associada a estatística multivariada, que consegue dar um indicativo se as formulações são semelhantes ou muito diferentes.

A ação do tipo de papel na extração do 2-FE dos traços de canetas envelhecidos, não apresentada nos traços de canetas recentes, demonstra que talvez o envelhecimento do papel também exerça influência no “aprisionamento” dos solventes, uma vez que o papel mais fibroso (no caso, o papel reciclado) apresenta uma capacidade de adsorção e absorção dos solventes, associada a polimerização das resinas que também mantém o 2-FE a níveis constantes no traço envelhecido. No caso das canetas brasileiras, as que tiveram teores iniciais de 2-FE apresentaram a tendência a evaporação do solvente mais rapidamente, em consonância com o observado por Weyermann e colaboradores (2011) mas em contrapartida, diverso do observado por Koenig e Weyermann em 2018.

Assim como nos bancos de dados europeus (BÜGLER *et al.*, 2008; KOENIG *et al.*, 2015b), onde os cientistas forenses classificam as canetas em envelhecedoras rápidas ou envelhecedoras lentas, o fator exponencial do decaimento da concentração de 2-FE para as canetas brasileiras permite que as mesmas também possam ser classificadas conforme a velocidade de evaporação dos solventes. Essa velocidade depende de diversos fatores, mas no estudo empírico em questão, como a maioria dos fatores foram mantidos constantes, na comparação entre as canetas o que contou

para as diferenças de decaimento foram componentes da própria formulação individual das tintas.

O perfil de envelhecimento, em relação aos teores decrescentes de 2-FE, foi semelhante entre as canetas azuis e pretas. Entretanto, o estudo demonstrou que, até em torno de 18 meses, a maioria das canetas ainda apresenta evaporação dos solventes, e esta evaporação sofre uma pausa, mantendo os níveis de solventes constantes para a maioria das canetas estudadas, por volta de 27 meses, e mantendo-se assim até 36 meses (3 anos). A maioria dos estudos tem o seguimento empírico do envelhecimento até um ano, alguns até dois anos, mas San Román e colaboradores (2015) propõem um método que possibilita a datação de documentos com até 5 anos de envelhecimento. Este método se baseia na determinação de um fator  $\beta$ , que corresponde a uma fração de 2-FE extraída do traço da caneta após uma primeira extração por *headspace-SPME*, e esse fator  $\beta$  seria diferente de acordo com a idade do traço de caneta, gerando uma curva de envelhecimento. Neste trabalho, San Román e colaboradores (2015) também afirmam que os efeitos do tipo de papel não podem ser ignorados. Uma sequência interessante do presente estudo, seria o acompanhamento das amostras até 5 anos de envelhecimento, realizando a quantificação dos solventes e se possível buscando reproduzir o método de San Róman e colaboradores (2015).

A abordagem usada na presente Tese, para a datação de um lançamento de tinta de caneta, foi a quantificação direta do 2-FE presente na amostra do traço coletada, expressa em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Koenig e colaboradores (2015), e também recentemente Koenig e Weyermann (2018) testaram outros parâmetros que poderiam ser utilizados para expressar a evaporação do 2-FE, a fim de verificar qual teria melhor reprodutibilidade. Um dos parâmetros seria o RPA (relative peak área), como a fração entre a área do pico do 2-FE pela área de algum composto estável na formulação. Outro parâmetro seria a razão R%, que consistiria na área do pico do 2-FE, diminuída da área do pico do 2-FE extraído de uma mesma amostra a qual teria sido envelhecida artificialmente, dividido pela área de 2-PE e multiplicado por 100. Uma abordagem finalística seria o parâmetro NR%, onde em vez da área do 2-FE de amostra envelhecida artificialmente, seria utilizada de uma amostra envelhecida naturalmente por um mês. Após todas as análises estatísticas, estes autores concluíram que de um jeito ou de outro, a abordagem que forneceu os resultados mais confiáveis ainda foi a determinação direta da concentração de 2-FE.

Além da questão do melhor parâmetro de datação, abordagens estatísticas foram propostas por Koenig e Weyermann (2018b), de forma a aproximar os resultados empíricos da realidade da perícia criminal e das cortes. Uma destas abordagens se baseia na comparação dos resultados obtidos para as amostras questionadas com valores limites tabulados, obtidos a partir da análise de diversas amostras em condições padronizadas, permitindo a inferência da máxima idade um traço de caneta (*threshold test*). Outra abordagem, menos comum, seria a aplicação de modelos de teste de tendência (*trend test*), que consistiria na verificação se a tinta questionada estaria ainda em envelhecimento ou se o envelhecimento já teria cessado.

E um último método, cujos fundamentos são utilizados em diversas áreas das ciências forenses, seria a aplicação de razões de verossimilhança (*likelihood ratio*), onde a força de uma observação seria avaliada em relação a duas diferentes hipóteses. Destas três abordagens, Koenig e Weyermann (2018b) concluíram que a aplicação de razão de verossimilhança demonstrou ser um modelo de interpretação muito promissor.

Assim, em relação aos resultados obtidos na presente Tese, estudos subsequentes poderiam ser realizados visando testar diferentes parâmetros e diferentes abordagens estatísticas, com o objetivo de também obter interpretações confiáveis e inequívocas dos resultados.

---

## **10. CONCLUSÕES**



Até o momento, os experimentos realizados no escopo da presente Tese chegaram a conclusões bastante importantes para guiar o trabalho rotineiro da perícia criminal na área de fraudes em documentos, se constituindo em um estudo exploratório, um *screening* dos métodos aplicáveis e do comportamento de envelhecimento dos documentos e das tintas de canetas no Brasil. As ferramentas cromatográficas e espectrométricas como CG/EM e Infravermelho mostraram-se úteis na análise de 2-FE com o intuito de datar documentos questionados, bem como para diferenciação entre canetas de formulações diferentes, bem como foram efetivas na identificação de cafeína em documentos falsamente envelhecidos.

A otimização dos parâmetros para extração de cafeína em documentos com simulação de envelhecimento, usando bebidas cafeinadas como chá ou café, oportunizou o conhecimento do comportamento desta substância quando adsorvida em diferentes tipos de papéis. O papel reciclado, uma realidade cada vez mais frequente nos escritórios do Brasil, se mostrou diferente do papel branco alvejado, no sentido de retenção de substâncias de interesse, não somente a cafeína, mas também o 2-FE, solvente presente nas formulações de canetas, cujo teor no traço de caneta tem sido utilizado como indicativo da idade do lançamento manuscrito.

Tendo em vista que a concentração de 2-FE determinada nos lançamentos de caneta mais antigos, foi maior no papel reciclado do que no papel branco, a preocupação com a comparação de manuscritos documentos com o mesmo tipo de papel é imprescindível para um resultado confiável.

A validação do método de quantificação de 2-FE por GC/MS demonstrou que o método apresenta linearidade, sensibilidade, especificidade, precisão intra-experimentos e precisão entre experimentos, além de ser robusto. Como último teste, ainda se faz necessária a realização de experimentos em laboratórios diferentes, para avaliar a reprodutibilidade do método.

O método de análise de extratos de tintas de canetas com inserção direta em espectrômetro de massas de alta resolução, Orbitrap, proporcionou um perfil químico de cada formulação, o qual, analisado usando a ferramenta de Estatística Multivariada, através da Análise de Grupamentos Hierárquicos (HCA), foi capaz identificar e diferenciar fórmulas de canetas de forma precisa, separando grupos de canetas diferentes; e ao mesmo tempo foi capaz de agrupar canetas de composição semelhante ou igual. O Poder de Discriminação deste método foi muito alto, diferenciando mesmo canetas de mesma marca, mas de modelos diferentes. A

Análise dos Componentes Principais (PCA) foi útil para mostrar as substâncias que influenciam na semelhança ou diferença entre as amostras, dando uma visão mais complexa da formação dos grupos.

Como as diversas formulações de canetas possuem quantidade iniciais de solventes diferentes entre si, e a diversidade de aditivos, corantes, resinas e outras substâncias da composição podem provocar comportamento de envelhecimento diferente entre dois traços de canetas em um documento, a diferenciação e caracterização das fórmulas das canetas é um meio importante de eliminar um fator de variabilidade no exame de datação de documentos.

O método de análise por IV-ATR se mostrou muito promissor, principalmente por não promover a destruição do documento questionado. Além de, através da obtenção dos espectros de cada tinta de caneta, possibilitar uma eficiente diferenciação das diferentes formulações de tintas, novamente aplicando a estatística multivariada, mostrou-se útil para a datação de lançamentos de canetas com até 18 meses de envelhecimento. Estudos sequenciais, com outras coleções de canetas e também com material mais antigo do que três anos, são necessários para a confirmação deste método como uma técnica adequada a ser utilizada na rotina forense.

O acompanhamento do envelhecimento de traços de canetas comercializadas no Brasil, durante 3 anos, demonstrou que a porosidade e a composição de fibras do papel de suporte do traço influenciam no teor de solventes determinado, e que as condições climáticas de armazenamento também são decisivas para uma maior evaporação dos solventes, quando sob luz, calor e umidade. O papel reciclado, mais poroso, reteve mais 2-FE no traço da caneta, nas amostras com 27 e 36 meses, levando à conclusão de que se deve ter cuidado para comparar amostras coletadas de papéis físico-quimicamente semelhantes, pois poderá se incorrer em conclusões errôneas.

A concentração inicial do 2-FE nas canetas demonstrou ser menor que as concentrações normalmente encontradas em outros estudos, e a cinética de evaporação mostrou algumas diferenças em relação a cinética descrita por outros estudos, apesar do perfil geral ter sido bastante compatível. A heterogeneidade entre as concentrações de 2-FE entre diferentes canetas, mesmo após 3 anos de envelhecimento mostrou que a identificação da formulação das canetas em comparação merece atenção, mesmo após 3 anos, pois canetas de fabricantes



diferentes poderão ter teores de solventes diferentes, levando novamente a uma conclusão equivocada em termos de datação do manuscrito.



---

## **11. PERSPECTIVAS FUTURAS**



O presente estudo tratou-se de um estudo exploratório, visando obter conhecimento dentro de uma área das ciências forenses pouco estudada no Brasil, mas com enorme demanda jurídica. Os resultados obtidos foram muito promissores para a aplicação na prática forense, entretanto ainda se fazem necessários estudos mais aprofundados para a apresentação de resultados inequívocos, considerando-se a quantidade de variáveis que podem influenciar nos resultados de datação de tintas.

Nesse contexto, a análise da tentativa de envelhecimento artificial das tintas de canetas também é importante para verificar se as tintas de canetas submetidas a condições artificialmente forçadas de aumento de luminosidade, umidade e calor se comportam da mesma maneira que tintas de canetas envelhecidas naturalmente em condições padrões. Ainda, da mesma forma que diferentes canetas possuem diferentes concentrações iniciais de 2-PE, é possível que diferentes punhos escritores, considerando a pressão e a velocidade aplicadas no instrumento escritor, também proporcionem diferentes quantidades iniciais de 2-PE.

Face ao exposto, o presente trabalho terá continuidade no Projeto de Doutorado da aluna Roberta Petry Gorziza, que incluirá a análise de possíveis interferentes físico-químicos na detecção de 2-PE e de corantes para datação de tintas, tais como aumento de temperatura, exposição à luminosidade e à umidade, e também a influência da presença de cafeína no papel, no caso de simulações de papéis antigos usando bebidas cafeinadas. Ainda, será avaliado se a análise de datação de tintas por meio da quantificação de 2-PE se altera considerando diferentes punhos escritores. Por fim, as técnicas já utilizadas e padronizadas neste trabalho (CG/EM, FTIR e ESI-Orbitrap) serão utilizadas para análise de documentos de idade antiga conhecida, e também para o contínuo acompanhamento do padrão de envelhecimento das tintas de canetas já estudadas, até a idade de pelo menos 5 anos.



---

## **12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





- AGINSKY, V.N. Comparative examination of inks by using instrumental thin-layer chromatography and microspectrophotometry. **Journal of Forensic Sciences**, v.38, n. 5, p. 1111-1130, 1993.
- AGINSKY, V.N. Some new ideas for dating ballpoint inks – a feasibility study. **Journal of Forensic Sciences**, v.38, n. 5, p. 1134-1150, 1993.
- AGINSKY, V.N. Dating and characterizing Writing, Stamp Pad and Jet Printer Inks by Gas Chromatography Mass/Spectrometry. **International Journal of Forensic Document Examiners**, v.2, n. 2, abril/junho, p. 103-115, 1996.
- AGINSKY, V.N. Measuring ink extractability as a function of age – why the relative aging approach is unreliable and why it is more correct to measure ink volatile components than dyes. **International Journal of Forensic Document Examiners**, v.4, n. 3, julho/setembro, p. 214-230, 1998.
- ANDRASKO, J. Changes in composition of ballpoint pen inks on aging in darkness. **Journal of Forensic Sciences**, v.47, n. 2, p. 324-327, 2001.
- ANDRASKO, J.; KUNICKI, M. Inhomogeneity and Aging of Ballpoint Pen Inks Inside of Pen Cartridges **Journal of Forensic Sciences**, v.50, n. 3, 2005.
- ANDRASKO, J. A simple microthermal desorption device. **Journal of Forensic Sciences**, v.51, n. 4, p. 925-928, 2006.
- ANDRASKO, J. Some examples of applications of a microthermal desorption device in the forensic laboratory. **Journal of Forensic Sciences**, v.54, n. 5, p. 1055-1058, 2009.
- ANZANELLO, MICHEL J. ; ORTIZ, R. S. ; LIMBERGER, R. P. ; MARIOTTI, K. C. . A framework for selecting analytical techniques in profiling authentic and counterfeit Viagra and Cialis. **Forensic Science International**, v. 235, p. 1-7, 2014a.
- ANZANELLO, MICHEL J.; ORTIZ, R. S.; MARIOTTI, KRISTIANE C.; LIMBERGER, R. P.. Performance of some supervised and unsupervised multivariate techniques for grouping authentic and unauthentic Viagra and Cialis. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 4, p. 83-89, 2014b.
- BERGER-KARIN, C.; HENDRIKS, U.; GEYER-LIPPMANN, J. Comparison of natural and artificial aging of ballpoint inks. **Journal of Forensic Sciences**, v.53, n. 4, p. 989-992, 2008.
- BRAZEAU, L.; GAUDREAU, M. Ballpoint Pen Inks: The Quantitative Anaysis of Ink Solvents on Paper by Solid-Phase Microextraction. **Journal of Forensic Sciences**, v.52, n. 1, jan., 2007.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do guia de validação de métodos analíticos. Acesso em 01/02/2018. Disponível no endereço eletrônico [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE\\_899\\_2003\\_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b).
- BRAZ, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, M.; GARCÍA-RUIZ, C. Raman spectroscopy for forensic analysis of inks in questioned documents. **Forensic Science International**, v. 232, p. 206-212, 2013.
- BRUNELLE, R. L.; CRAWFORD, B. A. **Advances in the Forensic Analysis and Dating of Writing Ink**. Springfield: Editora Charles C Thomas, 2003.
- BÜGLER, J.H.; BUCHNER, H.; DALLMAYER, A. Characterization of ballpoint pen inks by thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Forensic Sciences**, v.50, p. 1209-1214, 2005.
- BÜGLER, J.H.; BUCHNER, H.; DALLMAYER, A. Age determination of ballpoint pen ink by thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Forensic Sciences**, v.53, n. 4, jul., 2008.
- CANTU, A.A.A sketch of analytical methods for document dating part II. The dynamic approach: determining age dependent analytical profiles. **International Journal of Forensic Document Examiners**, v.2, n. 3, jul/set, 1996.
- CANTU, A.A.A study of the evaporation of a solvent from a solution – application to writing ink aging. **Forensic Science International**, v.219, p. 119-128, 2012.
- CARVALHO, C.M.B.; SOUZA, D.Z. **Laudo nº 936/2014**, Setor Técnico Científico, Superintendência Regional de Polícia Federal no Rio Grande do Sul. Banco de dados Sistema de Criminalística. <<https://ditec.dpf.gov.br/sistemas/criminalistica>>. Acessado em 16/07/2015.

- CARVALHO, C.M.B. Análise da concentração basal dos solventes de tintas de canetas esferográficas. **Revista Brasileira de Ciências Policiais**, v. 5, n.1, p.65-96, 2014.
- CHEN, H.; MENG, H.; CHENG, K. A survey of methods used for the identification and characterization of inks. **Forensic Science Journal**, v. 1, p.1-14, 2002.
- CONFORTIN, D.; BRUSTOLON, M.; FRANCO, L.; NEEVEL, H.; BOMMEL, M.R. Crystal violet: study of the photo-fading of an early synthetic dye in aqueous solution and on paper with HPLC-PDA, LCMS and FORS. **Journal of Physics. Conference Series**, v. 231, p. 012011, 2010.
- COUMBAROS, J.; KIRKBRIDE, K.P.; KLASS, G.; SKINNER, W. Application of time of flight secondary ion mass spectrometry to the in situ analysis of ballpoint pen inks on paper. **Forensic Science International**, v.193, p. 42-46, 2009.
- DEPARTAMENTO DE POLÍCIA FEDERAL. Diretoria Técnico-Científica. Banco de dados Sistema de Criminalística. Disponível em <<https://ditec.dpf.gov.br/sistemas/criminalistica>>. Acessado em 10/02/2014.
- DENMAN J.A.; SKINNER, W.M.; KIRKBRIDE, K.P.; KEMPSON, I.M. Organic and inorganic discrimination of ballpoint pen inks by ToF-SIMS and multivariate statistics **Applied Surface Science**, v. 256, p. 2155-2163, 2010.
- DIAZ-SANTANA, O.; VEGA-MORENO, D.; CONDE-HARDISSON, F. Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-diode array detection for dating of paper ink. **Journal of Chromatography A**, v.1515, p. 187-195, 2017.
- DIAZ-SANTANA, O.; CONDE-HARDISSON, F.; VEGA-MORENO, D. Comparison of the main dating methods for six ball-point pen inks. **Microchemical Journal**, v.138, p. 550-561, 2018.
- ELLEN, D. **Scientific Examination of Documents: Methods and Techniques**. 3ª Ed. Boca Raton (Florida): Editora CRC Press, 2006.
- EZCURRA M.; GÓNGORA, J.M.G.; MAGUREGUI, I.; ALONSO, R. Analytical methods for dating modern writing instrument inks on paper. **Forensic Science International**, v. 197, p.1-20, 2010.
- EZCURRA Magdalena; GRÁVALOS, Goyo R. . **Análise Forense de Documentos – Instrumentos de Escrita Manual e suas Tintas**. Volume I. 1 ed. Série Tratado de perícias criminalísticas/organizador Domingos Tochetto. Campinas: Millenium Editora, 2012. 216 p.
- FAZENDA, Jorge M. R. **Tintas e Vernizes: Ciência e Tecnologia**. 3 ed. Associação Brasileira dos Fabricantes de Tintas (ABRAFATI). São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2005. 1044 p.
- FERREIRA, P.S.; SILVA, D.F.A.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. **Analyst**, v.140, p. 811-819, 2015.
- FORD, M.J.; KERTESZ, V.; VAN BERKEL, G.J. Thin-layer chromatography/electrospray ionization triple-quadrupole linear ion trap mass spectrometry system: analysis of rhodamine dyes separated on reversed-phase C8 plates. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 7, p. 866-875, julho, 2005.
- FURLAN, Natalie Seguro. **Estudos sobre a Recentidade de Documentos Utilizando-se a Técnica de Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS)**. São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (USP).
- FREIDENFELDS, V.; MEKSS, P. The possibilities of determination of the relative age of ballpoint ink entries by high performance Liquid Chromatography. **Latvian Journal of Chemistry**, v. 3 p. 242–248, 2012.
- GALLIDABINO, M.; WEYERMANN, C.; MARQUIS, R. (2011) Differentiation of blue ballpoint pen inks by positive and negative mode LDI-MS **Forensic Science International**, v. 204, n. 1-3, p.169-178.
- GRIM, D.M.; SIEGEL, J.; ALLISON, J. Evaluation of laser desorption mass spectrometry and UV accelerated aging of dyes on paper as tools for the evaluation of a questioned document. **Journal of Forensic Sciences**, v.47, n. 6, p. 1-9, 2002a.
- GRIM, D.M.; SIEGEL, J.; ALLISON, J. Does ink age inside of a pen cartridge? **Journal of Forensic Sciences**, v.47, n. 6, Technical Note, 2002b.

- GRUND, B.; MARVIN, L. ROCHAT, B.; Quantitative performance of a quadrupole-orbitrap-MS in targeted LC-MS determinations of small molecules. **Journal of Pharmaceutical e Biomedical Analysis**, v. 124, p.48-56, 2016.
- HARRIS, J. A Preliminary Report on the Nondestructive Examination of Ballpoint Pen Ink on Questioned Documents by FT-IR Spectroscopy. **Canadian Society of Forensic Science Journal**, v.24, n. 1, p. 5-21, 2016.
- HOFER, R. Dating of Ballpoint Pen Ink. **Journal of Forensic Sciences**, v.49, n. 6, set., 2004.
- HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**, 3rd Edition, John Wiley and sons, 2007, 502 pp.
- IFA, D.R.; GUMAELIUS, L.S.; EBERLIN, L.S.; MANICKE, N.E.; COOKS, R.G. Forensic analysis of inks by imaging desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. **Analyst**, v.132, p. 461-467, 2007.
- JONES, R.W.; CODY, R.B.; MCCLELLAND, J.F. Differentiating writing inks using Direct Analysis in Real Time mass spectrometry. **Journal of Forensic Sciences**, v.51, n. 4, julho, 2006.
- KHER, A.; GREEN E.V.; MULHOLLAND M.I. Forensic classification of ballpoint pen inks using high performance liquid chromatography and infrared spectroscopy with principal components analysis and linear discriminant analysis **Vibrational Spectroscopy**, v. 40, p. 270-277, 2006.
- KOENIG, A.; MAGNOLON, S.; WEYERMANN, C. A comparative study of ballpoint ink aging parameters using GC/MS. **Forensic Science International**, v.252, p. 93-106, 2015a.
- KOENIG, A.; BÜGLER, J.; KIRSCH, D.; KÖHLER, F.; WEYERMANN, C. Ink dating using thermal desorption and gas chromatography/mass spectrometry: comparison of results obtained in two laboratories. **Journal of Forensic Sciences**, v.60, n. S1, janeiro, 2015b.
- KOENIG, A.; WEYERMANN, C. Ink dating, part I: Statistical distribution of selected ageing parameters in a ballpoint inks reference population. **Science Justice**, v.58, n. 1, p. 17-30, 2018.
- KOENIG, A.; WEYERMANN, C. Ink dating, part II: Interpretation of results in a legal perspective. **Science Justice**, v.58, n. 1, p. 31-46, 2018b.
- LALLI, P.M.; SANVIDO, G.B.; GARCIA, J.S.; COSSO, R.G.; MAIA, D.R.J.; ZACCA, J.J.; MALDANER, A.O.; EBERLIN, M.N. Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v.135, p. 745-750, 2010.
- LAPORTE, G.M.; WILSON, J.D.; CANTU, A.A.; MANCKE, A.; FORTUNATO, S.L. The identification of 2-phenoxyethanol in ballpoint inks using Gas Chromatography/Mass Spectrometry – Relevance to ink dating. **Journal of Forensic Sciences**, v.49, n. 1, p. 155-159, 2004.
- LEE, J.; NAM, Y.S.; MIN, J.; LEE, K.B.; LEE, Y. TOF-SIMS Analysis of Red Color Inks of Writing and Printing Tools on Questioned Documents. **Journal of Forensic Sciences**, V. 61, p. 815-822, 2016.
- LIU, Y.; YU, J.; XIE, M.X.; LIU, Y.; JING, T.T. Classification and dating of black gel pen ink by ion-pairing high-performance liquid chromatography.. **Journal of Chromatography A**. v. 1135, p. 57-64, 2006.
- LOCICIRO, S.; DUJOURDY, L.; MAZZELLA, W.; MARGOT, P. Dynamic of the ageing of ballpoint pen inks: quantification of phenoxyethanol by GC-MS. **Science and Justice**, v.44, n. 3, p. 165-171, 2004.
- MARIOTTI, K. D. C. ; SCHUH, R. S. ; FERRANTI, P. ; ORTIZ, R. S. ; SOUZA, D. Z. ; PECHANSKY, F. ; FROEHLICH, P. E. ; Limberger, R. P. . Simultaneous Analysis of Amphetamine-type Stimulants in Plasma by Solid-phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 2014, p. 1-6, 2014.
- NAM, Y.S.; PARK, J.S.; LEE, Y., LEE., K. Application of Micro-Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Ink Examination in Signatures Written with Ballpoint Pen on Questioned Documents. **Journal of Forensic Sciences**, v. 59, n. 3, p. 800-805, 2014.
- NG, L.; LAFONTAINE, P.; BRAZEAU, L. Ballpoint Pen Inks: Characterization by Positive and Negative Ion-Electrosprey Ionization Mass Spectrometry for the Forensic Examination of Writing Inks. **Journal of Forensic Sciences**, v. 47, n. 6, p. 1238-1247, 2002.

- ORTIZ, R. S.; MARIOTTI, K. C.; FANK, B.; LIMBERGER, R. P.; ANZANELLO, M. J.; MAYORGA, P. Counterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines? **Forensic Science International**, **226**, 282-289, 2013.
- PAPSON, K.; STACHURA, S.; BORALSKY, L.; ALLISON, J. Identification of colorants in pigmented pen inks by Laser Desorption mass spectrometry. **Journal of Forensic Sciences**, **v.53**, n. 1, janeiro, 2008.
- PAYNE, G.; WALLACE, C.; REEDY, B.; LENNARD, C.; SCHULER, R.; EXLINE, D.; ROUX, C. Visible and near-infrared chemical imaging methods for the analysis of selected forensic samples. **Talanta**, **v. 67**, p.334-344, 2005.
- ROMÃO, W.; VAZ, B.G.; LALLI, P.M.; BUENO, M.I.M.S.; CORREA, D.N.; TELLES, V.L.C.N.; CASTRO, E.V.R.; EBERLIN, M.N. Analyzing Brazilian Vehicle Documents for Authenticity by Easy Ambient Sonic-Spray ionization Mass Spectrometry. **Journal of Forensic Sciences**, **v.57**, n. 2, p. 539-43, março, 2011.
- SAN ROMÁN, I.; BARTOLOMÉ, L.; ALONSO, M.L.; ALONSO, R.M.; EZCURRA, M. DATINK pilot study: An effective methodology for ballpoint pen ink dating in questioned documents. **Analítica Chimica Acta**, n. 892, p. 105-14, sep 10, 2015.
- SENIOR, S.; HAMED, E.; MASOUD, M.; SHEHATA, E. Characterization and dating of blue ballpoint pen inks using principal component analysis of UV-Vis absorption spectra, IR spectroscopy, and HPTLC. **Journal of Forensic Sciences**, **v. 57**, n. 4, 2012.
- SHARMA, V., KUMAR, R.; Fourier transform infrared spectroscopy and high performance thin layer chromatography for characterization and multivariate discrimination of blue ballpoint pen ink for forensic applications. **Vibrational Spectroscopy**, **v. 92**, p. 96-104, 2017.
- SIEGEL, J.; ALLISON, J.; MOHR, D.; DUNN, J. The use of laser desorption/ionization mass spectrometry in the analysis of inks in questioned documents. **Talanta**, **v.67**, p. 425-429, 2005.
- SILVA, R.L. **Análise de tinta de caneta esferográfica azul por VSC 5000 e CG/EM**. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização em Ciências Policiais e Documentoscopia. Brasília:Departamento de Polícia Federal, Academia Nacional de Polícia, 2012.
- SILVA, C.S.; BORBA, F.S.L.; PIMENTEL, M.F.; PONTES, M.J.C.; HONORATO, R.S.; PASQUINI, C. Classification of blue pen ink using infrared spectroscopy and linear discriminant analysis. **Microchemical Journal**, **v. 109**, p. 122-127, 2013.
- SILVA, C.S.; PIMENTEL, M.F.; HONORATO, R.S.; PASQUINI, C.; PRATS-MONTALBÁN, J.M.; FERRER, A. Nera infrared hyperspectral imaging for forensic analysis of document forgery. **Analyst**, **v. 139**, p. 5176, 2014.
- SOLTZBERG, L.J.; HAGAR, A.; KRIDARATIKORN, S.; MASTTSON, A.; NEWMAN, R. MALDI-TOF Mass spectrometric identification of dyes and pigments. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, **v. 18**, p. 2001-2006, 2007.
- SUN, Q.; LUO, Y.; YANG, X.; XIANG, P.; SHEN, M.; Detection and identification of dyes in blue writing inks by LC-DAD-orbitrap MS. **Forensic Science International**, **v. 261**, p. 71-81, 2016.
- STEWART, L.F. Ballpoint ink age determination by volatile component comparison – a preliminary study. **Journal of Forensic Sciences**, **v.30**, n. 2, p. 405-411, abril, 1985.
- WANG J, LUO G, SUN S, WANG Z, WANG Y. Systematic analysis of bulk blue ballpoint pen ink by FTIR spectrometry. **Journal of Forensic Sciences**, **v.46**, n. 5, p. 1093–1097, 2001.
- WANG, Y.; YAO L.; ZHAO, P.; WANG, J.; WANG, Y. Determining the relative age of blue ballpoint ink by gas chromatography. **Front. Chem. China**, **v.2**, p. 223-226, 2006.
- LATTUATI-DERIEUX, A.; BONNASSIES-TERMES, S.; LAVÉDRINE, B. Characterization of compounds emitted during natural and artificial ageing of a book. Use of headspace-solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. **Journal Cultural Heritage** **v. 7**, p. 123-133, 2006.
- WATERHOUSE, J. F. **Monitoring the Aging of paper**. IPC Technical Paper Series, The Institute of Paper Chemistry: Wisconsin. 1988, 297p.
- WEYERMANN, C.; KIRSCH, D.; VERA, C.C.; SPENGLER, B. Photofading of ballpoint dyes studied on paper by LDI and MALDI MS. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, **v. 17**, p.297-306, 2006.

- WEYERMANN, C.; KIRSCH, D.; VERA, C.C.; SPENGLER, B. A GC/MS study of the drying of ballpoint pen ink on paper. **Forensic Science International**, v. 168, p.119-127, 2007a.
- WEYERMANN, C.; MARQUIS, R.; MAZZELLA, W.; SPENGLER, B. Differentiation of blue ballpoint pen inks by laser desorption ionization mass spectrometry and high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Forensic Sciences**, v. 52, n.1, p.216-220, 2007b.
- WEYERMANN, C.; SPENGLER, B. The potential of artificial aging for modeling of natural aging processes of ballpoint ink. **Forensic Science International**, v. 180, p.23-31, 2008.
- WEYERMANN, C.; SCHIFFER, B.; MARGOT, P.; A logical framework to ballpoint ink dating interpretation. **Science and Justice**, v. 48, p.118-125, 2008b.
- WEYERMANN, C.; KIRSCH, D.; VERA, C.C.; SPENGLER, B. Evaluation of the Photodegradation of Crystal Violet upon Light Exposure by Mass Spectrometric and Spectroscopic Methods. **Journal of Forensic Sciences**, v. 54, n.2, p.339-345, 2009.
- WEYERMANN, C.; ALMOG, J.; BÜGLER, J.; CANTU, A.A. Minimum requirements for application of ink dating methods based on solvent analysis casework. **Forensic Science International**, v. 210, p.52-62, 2011.
- WILLIAMS, M.R.; MOODY, C.; ARCENOUX, L.; RINKE, C.; WHITE, K.; SIGMAN, M.E. Analysis of black writing ink by electrospray ionization mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 191, p. 97-103, 2009.
- ZIEBA-PALUS, J.; KUNICKI, M. Application of the micro-FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy and XRF method examination of inks. **Forensic Science International**, v. 158, p. 164-172, 2006.
- ZLOTNICK, J.A.; SMITH, F.P. Chromatographic and electrophoretic approaches in ink analysis. **Journal of Chromatography B.**, v.733, n. 1, p. 265-272, 1999.