

ESTUDO COMPUTACIONAL DOS MECANISMOS DE MCCALDIN E LAMOTHE PARA A FORMAÇÃO DO ROXO DE RUHEMANN

Miguel Arcanjo Farias Leão Brasil de Medeiros; Eduardo de Castro Aguiar

(Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada,

miguelarc67@gmail.com)

Resumo do artigo: A Ninidrina (2,2-dihidroxi-indano-1,3-diona), frequentemente é empregada para identificação de impressões digitais latentes em cenas de crimes por meio do pigmento Roxo de Ruhemann (RR), esta reação acontece devido a liberação de diversos aminoácidos, pela glândula écrina, cujo o canal excretor está diretamente em poros da pele. Utilizada como reagente, pela primeira vez no ano de 1954, desde então, tornou-se uma técnica popular para a detecção de impressões digitais em superfícies porosas. Estando proposto em 3 diferentes formas, o real mecanismo dessa reação ainda não foi devidamente elucidado, e há discrepâncias entre as rotas de formação do RR, além do mais, o único trabalho computacional que aborda os mecanismos, não leva em consideração a importância das correções térmicas indispensáveis para dar suporte às suas próprias conclusões. Neste sentido, este trabalho faz um empenho computacional, para descrever a termodinâmica dos mecanismos de McCaldin e de Lamothe, a uma melhor compreensão e definição de caminhos mais favoráveis energeticamente. Os valores de variação de energia total (ΔE) e dos parâmetros termodinâmicos ΔG , ΔH e ΔS das etapas presentes nos mecanismos de McCaldin e Lamothe, foram calculados ao nível B3LYP e função de base 6-31++G(d,p) e comparados com os valores de ΔE obtidos na literatura, com um nível de cálculo *ab initio* e função de base HF/6-31G* e para efeitos de comparação, calculamos também com a mesma função *ab initio* e função de base HF/6-31G* todas as etapas dos mecanismos. Importante citar que os resultados HF e B3LYP do atual trabalho concordam em algumas etapas e discorda em outras, o que pode ser atribuído o uso de um método correlacionado B3LYP, e uma função mais completa 6-31++G(d,p). Neste sentido, os resultados obtidos neste trabalho, proporcionam uma maior confiabilidade por motivos das descrições mais completa das moléculas orgânicas presentes nos mecanismos. Mesmo assim, todos os níveis concordam ao indicar que, na etapa de formação do RR, em que a desidratação de um intermediário amina reagirá com outra molécula de ninidrina para a formação do produto desejado, sendo a etapa mais energética. Notamos também que o intermediário amina pode ser consumido para formar um outro subproduto, presente nos mecanismos de McCaldin e Lamothe. Nos dois casos o aumento da temperatura favorece o caminho de formação do RR. Os mecanismos mostraram-se endotérmicos e exergônicos nos níveis de cálculo utilizado neste trabalho, concordando com as observações experimentais. Incluir a correlação eletrônica se mostrou importante para o estudo computacional do mecanismo de formação do Roxo de Ruhemann, apresentando de forma mais completa para cada reação de um sistema orgânico e com grande número de elétrons deslocalizados.

Palavras-chave: Ninidrina, DFT, Roxo de Ruhemann, Mecanismo de reação, estado de transição.

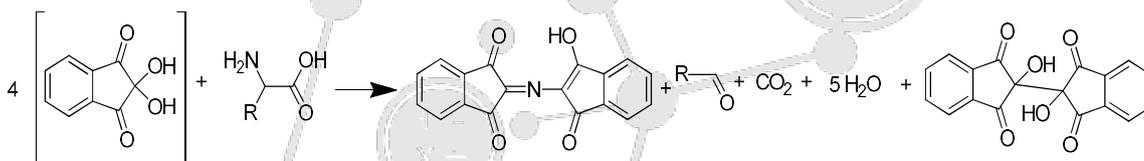
INTRODUÇÃO

A Ninidrina (2,2-dihidroxi-indano-1,3-diona) é um composto colorimétrico, utilizado em reações químicas para identificação de aminoácidos, proteínas e peptídeos (VIEIRA, 1995. YEMM, 1955). Reage com aminas primárias e secundárias livres no meio formando um composto com coloração característica conhecido por Roxo de Ruhemann (RR) (RUHEMANN, 1910).

Frequentemente é empregada para identificação de impressões digitais latentes em cenas de crimes, esta reação acontece devido a liberação de diversos aminoácidos, pela glândula écrina, cujo o canal excretor está diretamente em poros da pele. O uso da ninidrina como reagente, foi utilizado pela primeira vez no ano de 1954, desde então, tornou-se uma técnica popular para a detecção de impressões digitais em superfícies porosas (CHAMPOD, 2004).

A ninidrina é um reagente para caracterizar a presença de aminoácidos sem especificação, com isso, reage da mesma forma com qualquer aminoácido presente no meio de investigação, cada aminoácido presente irá contribuir para formação do Roxo de Ruhemann. Apesar disso, este mecanismo não foi absolutamente elucidado, havendo diversas alusões na literatura que são: McCaldin (1960), Lamothe (1972) e Friedman (1974).

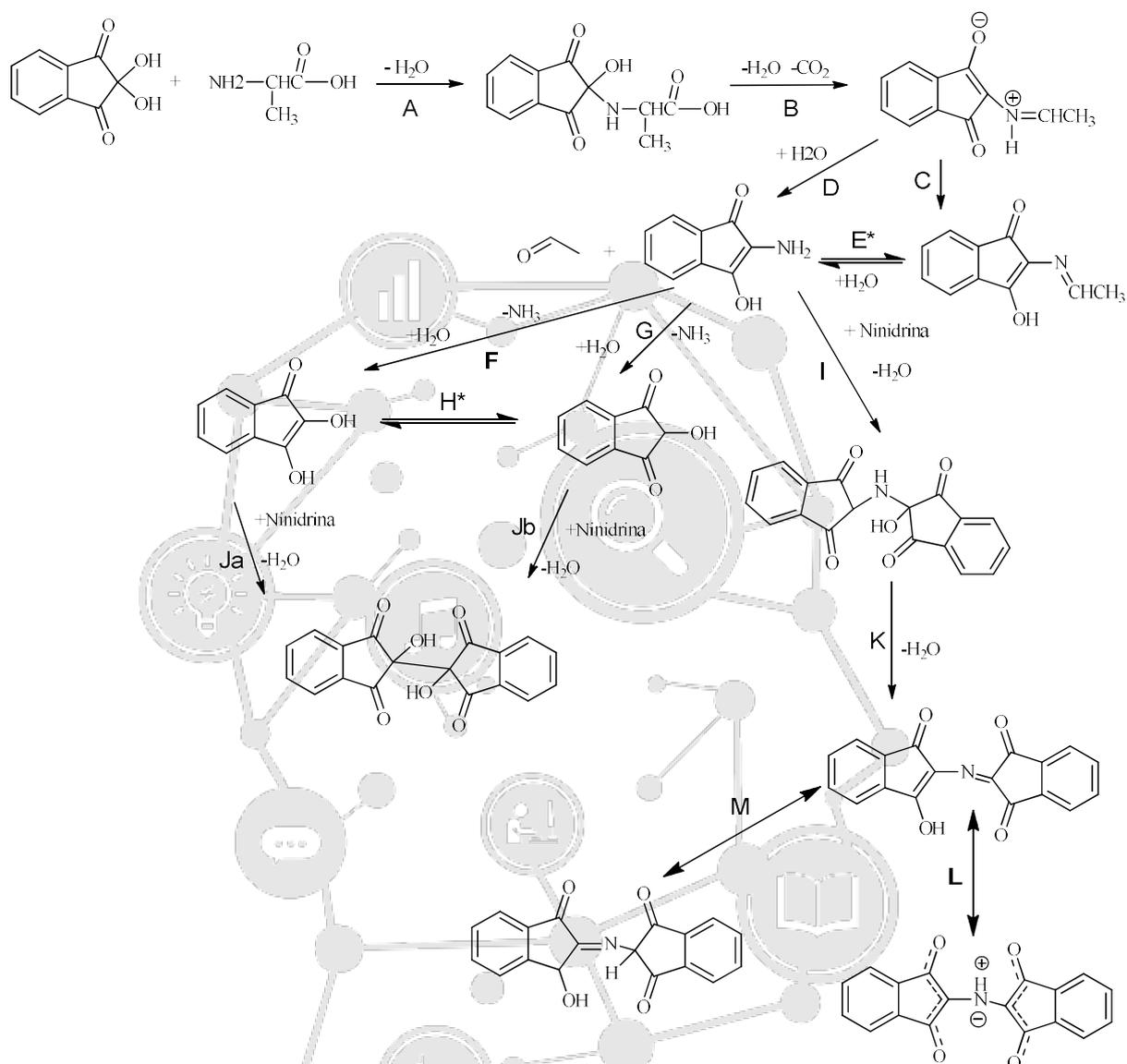
Esquema 1: Reação Global do mecanismo da Ninidrina



Fonte: Arquivo pessoal.

No século passado, diversas metodologias e técnicas para aquisição de parâmetros moleculares aplicando a química quântica a sistemas multi-eletrônicos foram desenvolvidos. Hoje, parâmetros como a energia de um sistema em uma dada geometria e frequências vibracionais podem auxiliar na resolução da estrutura e das propriedades químicas de intermediários e de possíveis estados de transição para um dado caminho de reação, além de ajudarem na obtenção de correlações entre as entalpias de reação e a temperatura, efeitos isotópicos e energias de dissociação (SCHLEGEL, 1989).

Esquema 2: Mecanismo de McCaldin (1960)

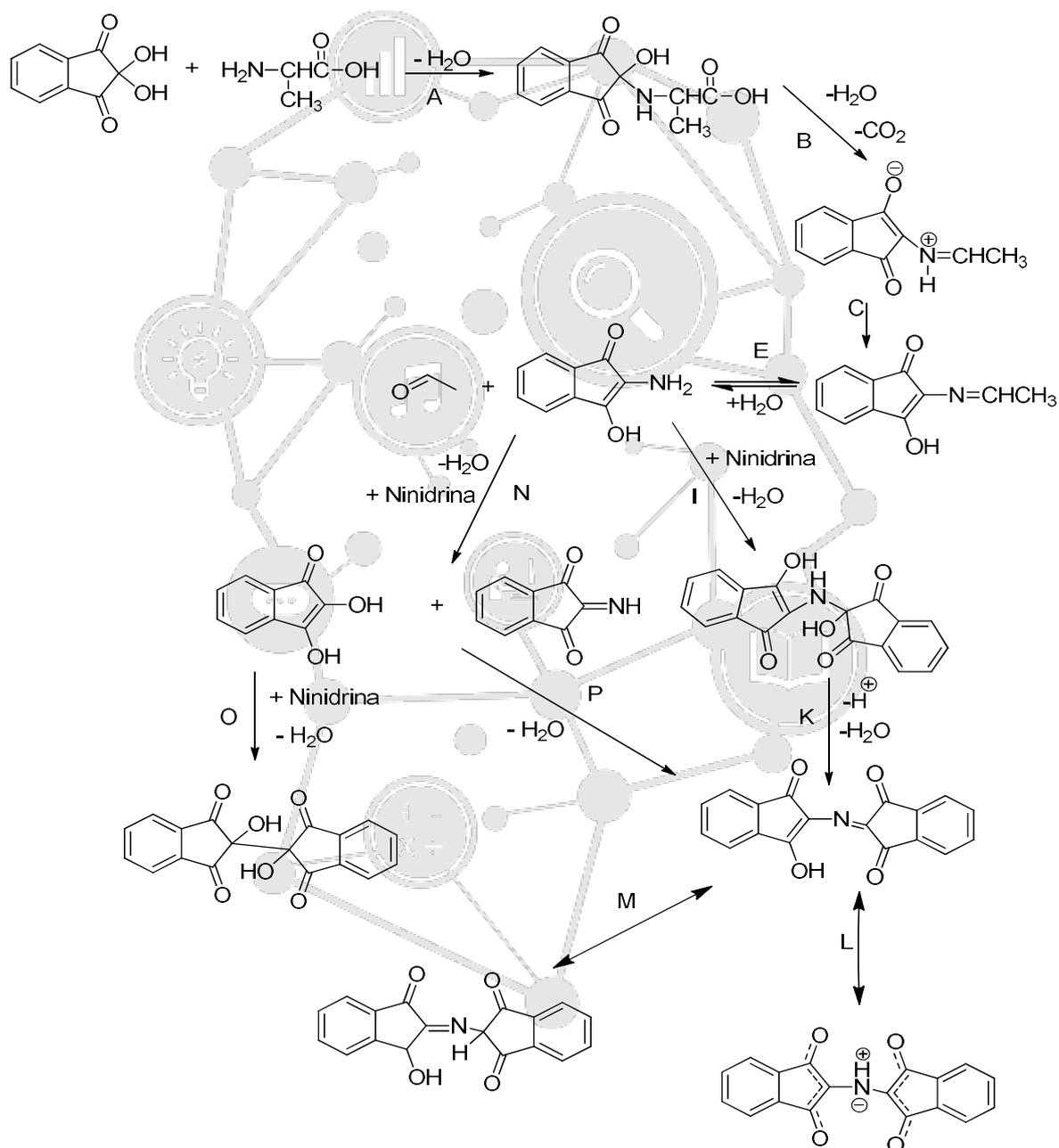


Fonte: Arquivo pessoal

Em publicações McCaldin (1960) indica uma das primeiras hipóteses (Esquema 2), fundamentado em uma degradação de Strecker, onde há a formação de uma ligação C–N e futura liberação de CO₂. O mesmo cita que há aguda evidência da presença de um intermediário, seguida da desidratação e descarboxilação para a formação do zwitterion (entre as etapas B e C do Esquema 3), o qual é hidratado, produzindo a 2-amino-3-hidróxi-1-idanona (Amina1) com a liberação do acetaldeído, subproduto da reação. Após a formação da Amina1 há a competição entre a formação da hidridantina (2,2'-Dihidróxi-2,2'-biindan-1,1',3,3'-tetrona), pelas etapas F, G, H e J, e do produto RR, pelas etapas I e K.

Posteriormente, Lamothe (1972), sugeriu algumas alterações no mecanismo de McCaldin, como mostra o Esquema 3, no qual define uma rota única para a formação da Aminal e sugere etapas, **N** e **P**, onde os intermediários da formação da hidrântina podem reagir entre si e, também, formar o produto RR.

Esquema 3: Mecanismo de Lamothe (1972)

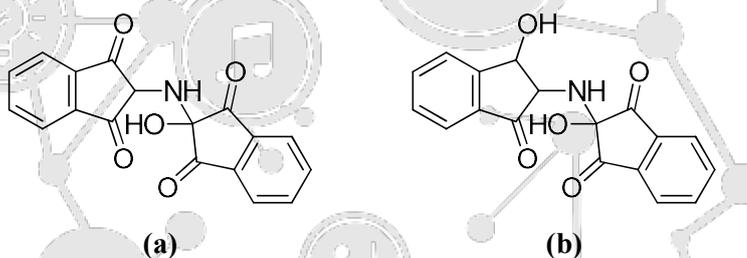


Fonte: Arquivo pessoal

Além destes dois mecanismos, deve-se destaque ao trabalho de Friedman e Sigel (1966), que sugeriram, entre outras alterações no mecanismo de McCaldin, um equilíbrio inicial entre a ninidrina e a 1,2,3-indanotriona, diminuindo o impedimento estérico para o ataque do aminoácido.

Petraco e Colaboradores (2006) calcularam as energias totais das espécies envolvidas nos mecanismos de McCaldin, Lamothe e Friedman ao nível HF/6-31G* concluiu que os três são igualmente favoráveis a, aproximadamente, 100°C, onde há energia suficiente. Os autores, baseados nos cálculos, concluíram, também, que a reação deve se dar pelo mecanismo de McCaldin, substituindo apenas o intermediário formador do RR (Figura 1a), por aquele proposto por Lamothe (Figura 1b).

Figura 1. Estrutura dos intermediários formados na etapa I dos mecanismos de McCaldin (a) e Lamothe (b).



Fonte: Arquivo Pessoal.

As discrepâncias entre as rotas de formação do RR não foram solucionadas até o presente momento, além disso, o único trabalho computacional que trata dos mecanismos, não leva em consideração as correções térmicas necessárias para dar suporte às suas próprias conclusões. Neste sentido, este trabalho faz um esforço computacional no sentido de descrever a termodinâmica dos mecanismos de McCaldin e de Lamothe para o seu melhor entendimento e definição de caminhos mais favoráveis energeticamente.

METODOLOGIA

As moléculas presentes nos mecanismos de McCaldin e Lamothe tiveram suas geometrias completamente otimizadas sem restrição de simetria e suas frequências harmônicas foram calculadas para a obtenção dos seus parâmetros termodinâmicos, à 298,15 K e 1 bar. Todas as propriedades foram computadas com o funcional híbrido B3LYP (BECKE, 1993), o conjunto de funções de base de Pople 6-31++G(d,p) e, para

comparação com os dados presentes na literatura (PETRACO, 2006), ao nível *ab initio* HF/6-31G*. Todos os cálculos foram realizados no programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009) alocado no Laboratório de Química Teórica e Computacional da UFPE. Foram utilizados os critérios padrão de convergência do programa.

O valor de entalpia para cada espécie foi calculado de acordo com a Equação 1, combinando a energia livre de Gibbs (G), a entalpia (H) e a temperatura (T).

$$S = \frac{G - H}{T}$$

Equação 1

Cada uma das etapas dos mecanismos foi tratada como reações isoladas e a variação dos parâmetros termodinâmicos nas etapas foi calculado conforme a Equação 2, onde P representa a propriedade em questão: energia total, energia livre, entalpia ou entropia. Os índices i e j representam as propriedades dos produtos e reagentes, respectivamente.

$$\Delta P = \sum_{\text{produtos}} P_i - \sum_{\text{reagentes}} P_j$$

Equação 2

As energias totais apresentadas ao nível B3LYP/6-31++G(d,p) incluem a correção de ponto zero (ZPE) (SZABO e OSTLUND, 1989) que inclui a contribuição da energia vibracional do nível fundamental de todos os modos vibracionais, conforme mostra a Equação 3, abaixo.

$$ZPE = \sum \left(n + \frac{1}{2} \right) h\nu$$

Equação 3

Aqui h é a constante de Planck, ν é a frequência do modo vibracional e n é um número inteiro que representa o nível vibracional do modo ν , para o nível fundamental $n = 0$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de variação de energia total (ΔE) e de parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) das etapas presentes nos mecanismos de McCaldin e Lamothe, ao nível B3LYP/6-31++G(d,p) obtido neste trabalho, são apresentados na Tabela 1, assim como o valor de ΔE obtido por Petraco (2006) ao nível HF/6-31G*. Para efeitos de comparação, apresentamos também os resultados obtidos com HF/6-31G*.

Tabela 1. Variação de energia total (ΔE), entalpia (ΔH), energia livre de Gibbs (ΔG), em $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e entropia (ΔS), em $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, para os mecanismos de McCaldin e Lamothe. Valores calculados com B3LYP/6-31++G(d,p) a 298,15 K.

Etapa	ΔE^1	ΔE^2	$\Delta E(\text{ZPE})$	ΔH	ΔG	ΔS
A^{3,4}	29,62	12,01	-7,05	-2,86	5,09	-26,68
B^{3,4}	9,28	48,96	-40,83	-32,93	-123,58	304,05
C^{3,4}	-18,19	19,42	38,92	40,47	36,00	15,01
D³	-39,94	-15,51	27,64	26,10	16,10	33,52
E^{3,4}	-21,75	-34,93	-11,28	-14,37	-19,89	18,52
F³	14,65	11,16	24,16	23,12	24,06	-3,13
G³	-36,64	-61,07	-1,26	-3,01	-2,26	-2,51
H³	-51,29	-72,23	-25,43	-26,13	-26,32	0,63
I³	-35,22	-59,65	-32,87	-30,15	-19,08	-37,13
I⁴	36,07	11,63	-1,46	2,42	13,36	-36,69
J_a³	-45,61	-36,89	-22,46	-17,66	-10,06	-25,48
J_b³	5,68	35,33	2,96	8,47	16,25	-26,10
K³	121,07	161,11	67,46	74,25	26,77	159,25
K⁴	49,79	89,83	36,05	41,69	-5,66	158,81
L^{3,4}	-40,50	-80,88	-31,16	-31,35	-36,98	18,91
M^{3,4}	11,94	-28,09	-66,59	-67,58	-66,00	-5,27
N⁴	17,63	22,68	56,60	61,21	16,33	150,52
O⁴	-45,61	-36,89	-22,46	-17,66	-10,06	-25,48
P⁴	16,37	11,90	-22,01	-17,11	-8,64	-28,41
Global	84,81	146,91	14,34	34,41	-94,69	433,01

¹(PETRACO, 2006); ²HF/6-31G*; ³McCaldin; ⁴Lamothe.

Fonte: Arquivo pessoal.

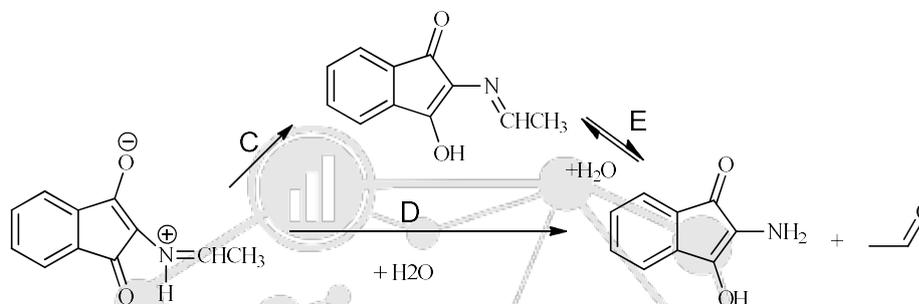
A variação global da energia livre de Gibbs teve valor $-94,69 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, indicando a espontaneidade desta reação cuja a principal força motriz é o grande aumento de entropia, calculado em $+433,01 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, o confere uma boa sensibilidade a variações de temperatura. A reação global se mostrou endotérmica, com valor de entalpia igual a $+34,41 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Esses resultados computacionais corroboram os dados experimentais reportados por Joullie, Thompson e Nemeroff (1991) que mostram maior rendimento para a formação do RR em 100°C em comparação à reação realizada em 30°C .

A partir da Tabela 1, comparando os cálculos HF/6-31G* e a literatura (PETRACO, 2006), ao mesmo nível, é possível perceber discrepâncias no ΔE de todas as etapas, inclusive com inversão de sinal para **C** e **M** e para as etapas **A**, **B**, **C**, **D**, **I'**, **M**, **O** e **P**, quando comparado com B3LYP/6-31++G(d,p). Estas diferenças podem ter origens diversas, dentre elas pode-se citar cálculos realizados em diferentes conformações, uma vez que várias destas moléculas apresentam grande número de graus de liberdade rotacionais, pode-se citar, também, a estruturas fora de sua geometria de equilíbrio, uma vez que Petraco (2006) não efetuou cálculos de frequências harmônicas para verificação da geometria de equilíbrio. Aqui é importante citar que os resultados HF e B3LYP do atual trabalho concordam em diversas etapas, exceto nas **A**, **B**, **D**, **I'**, **O** e **P**, o que pode ser atribuído à melhor descrição da estrutura eletrônica das moléculas pelo uso de um método correlacionado (B3LYP), uma função de onda mais completa (6-31++G(d,p)) e consideração das contribuições térmicas de correção de ZPE. Neste sentido, os resultados obtidos neste trabalho apresentam uma maior confiabilidade em razão da descrição mais completa das moléculas orgânicas presentes nos mecanismos. Mesmo assim, todos os níveis concordam indicando **K**, desidratação de um intermediário amina para a formação do RR, como a etapa mais energética.

A segunda etapa, **B**, presente em ambos mecanismos, há liberação de água e gás carbônico em um processo parecido com uma degradação tipo Strecker, sendo a etapa mais exergônica dos mecanismos, $\Delta G = -123,58 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ com B3LYP. Isto é observado devido, majoritariamente, à componente entrópica, $\Delta S = +304,05 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, o que confere uma alta sensibilidade desta etapa com a variação de temperatura, tornando-a mais espontânea com o aumento da temperatura. A partir da Tabela 1 é possível observar que esta etapa é a principal responsável pela espontaneidade da reação global.

Os resultados termodinâmicos não permitem definir o caminho de formação da Amina1 (Figura 2), a partir do zwitterion formado na etapa **B**, uma vez que as propriedades termodinâmicas estudadas são funções de estado e, portanto, independem do caminho seguido. Assim, para a resolução do caminho de formação da Amina1 é necessário um estudo cinético das etapas **C**, **D** e **E**, para avaliação das suas energias de ativação.

Figura 2. Etapas presentes nos mecanismos de McCaldin (C, D e E) e Lamothe (C e E) para a formação da Amina1 (C₉H₇O₂N).



Fonte: Arquivo Pessoal.

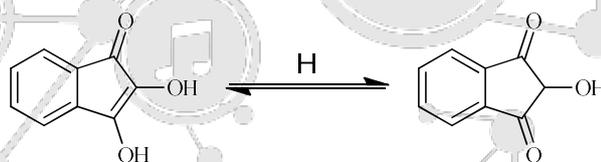
O roxo de Ruhemann é formado a partir da reação da Amina1 com outra molécula de ninidrina (etapa I) formando, inicialmente, um intermediário que pode se apresentar na forma cetônica ou enólica, como apresentado na Figura 1a e 1b respectivamente. O isômero enol se apresentou mais estável do que o cetônico em $-71.28 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ao nível HF/6-31G* tanto para as moléculas obtidas neste trabalho, quanto pelas reportadas por Petraco (2006), mostrando a concordância entre os cálculos. Ao nível B3LYP/6-31++G(d,p), o isômero enol foi mais estável em $-31.41 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. A energia livre de tautomerização foi igual a $-32.43 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $-69.77 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ calculada com B3LYP e HF, respectivamente. É importante destacar que este intermediário é desidratado na etapa K/K' para formar o RR, assim essa estabilização é anulada pela energia a mais necessária para retirada de H₂O do intermediário. Para ambos os mecanismos, os parâmetros termodinâmicos para a reação entre a Amina1 e a ninidrina para a formação de RR (etapas I+K, para McCaldin, e I'+K', para Lamothe) apresentaram valores iguais a $+44,10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $+7,70 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $122,11 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, para entalpia, energia livre e entropia, respectivamente. Deste modo, termodinamicamente, a formação do intermediário enólico é mais favorável como relatado no mecanismo de McCaldin e sugerido, com base na energia total, por Petraco (2006). No entanto, um estudo cinético também se mostra importante para avaliar as barreiras de ativação para estas etapas.

O consumo da Amina1 também está relacionado à formação do subproduto hidridantina pelas etapas F, G, H e J no mecanismo de McCaldin, com $\Delta H = +5,46 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta G = +13,99 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ao nível B3LYP, ou por N e O no mecanismo de Lamothe, com $\Delta H = +5,46 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta G = +13,99 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ao nível B3LYP. Onde no primeiro há a decomposição da Amina1 liberando NH₃ para

posterior reação com a ninidrida, enquanto que no segundo ocorre, inicialmente, a reação da Amina1 com a ninidrina gerando a 2,3-diol-indenona (Figura 3 a esquerda), que seguirá reagindo com outra molécula de ninidrina para formar a hidridantina, e outra espécie dicetona a qual reage com o *diol* para formar o intermediário precursor do RR (etapa P). A produção de RR por esta via, como esperado, apresenta os mesmos valores para os parâmetros termodinâmicos visto para as etapas I e K, por exemplo.

No mecanismo de McCaldin, as etapas F e G geram os dois tautômeros da 2,3-diol-indenona. O equilíbrio ceto-enólico é mostrado na etapa H (Figura 3), no qual o composto dicetônico é favorecido em $-26,13 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ na entalpia e $-26,32 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ na energia livre. Deste modo, termodinamicamente, a etapa G será preferencial à F.

Figura 3. Equilíbrio ceto-enólico, etapa H do mecanismo de McCaldin.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Em ambos os mecanismos, notamos que Amina1 pode ser consumida para formar o RR ou a hidrantina, havendo competição nas suas etapas iniciais, I e G para McCaldin e I' e N para Lamothe. Nos dois casos o aumento da temperatura favorece o caminho de formação do RR, sendo, a etapa I mais exotérmica e exergônica que a G. Nestas duas a variação de entropia apresentou negativa, assim a diminuição da temperatura irá favorecer a espontaneidade delas, mais fortemente da I, uma vez que sua entropia é quase 15 vezes mais negativa. Está mesma tendência de controle de temperatura é vista para o mecanismo de Lamothe, as etapas I' e N são endergônicas e endotérmicas, mas esta última é muito mais sensível à temperatura por possuir variação de entropia aproximadamente 4 vezes maior que a primeira e de sinal contrário, $+150,52 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ e $-36,69 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ respectivamente. Além disso, a etapa N caráter endotérmico mais forte que a I', $+61,21 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $+2,42 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivamente, então a diminuição de temperatura favorece entálpica e entropicamente a etapa de formação do RR.

CONCLUSÕES

Os mecanismos mostraram-se endotérmicos e exergônicos nos níveis de cálculo empregados neste trabalho, concordando com as observações experimentais (FRIEDMAN,1966). A inclusão de correlação eletrônica se mostrou importante para o estudo computacional do mecanismo de formação do Roxo de Ruhemann descrevendo mais completamente o sistema orgânico e com grande número de elétrons deslocalizados.

Ambos os mecanismos são factíveis termodinamicamente, havendo competição entre a formação de tautômeros ceto-enólicos, no mecanismo de McCaldin, onde as reações tendem a se proceder com o isômero mais energético.

O favorecimento da formação de RR ou hidridantina pode ser realizado pelo controle da temperatura, onde seu abaixamento direciona a reação para o caminho de produção de RR e o seu aumento leva para a produção do subproduto indesejado.

Foi observado que as etapas discrepantes entre os mecanismos requerem uma avaliação do perfil cinético para que, efetivamente, possa-se sugerir por qual rota de formação o RR ocorre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALCAMI, M.; MÓ, O.; YÁÑEZ, M.; **Mass Spectrom.** Rev. 2001, 20, 195.

CACACE, F.; **Pure Appl. Chem.** 1997, 69, 227.

CHAMPOD, C., LENNARD, C., MARGOT, P., & STOILOVIC, M. (2004). *Fingerprints and Other Ridge Skin Impressions. Igarss 2014* (Vol. 9). CRC Press.

D. BECKE, **Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange," J. Chem. Phys.**, **98** (1993) 5648-52.

FRIEDMAN, M.; SIGEL, C. W. A **Kinetic Study of the Ninhydrin Reaction.** *Biochemistry*, 1966.

FRIEDMAN, M.; WILLIAMS L. D. **Stoichiometry of Formation of Ruhemann's Purple in the Ninhydrin Reaction 1974,** *Bioorganic Chemistry*.

FRISCH, M. J., TRUCKS, G. W., SCHLEGEL, H. B., SCUSERIA, G. E., ROBB, M. A., CHEESEMAN, J. R., Pople, J. A. (2009). G09. In *Gaussian 09 (Revision D.2)*, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA.

HASE, W. L.; Koch, W.; *Int. J. Mass Spectrom.* 2000, 201.

JOULLIE, M. M., THOMPSON, T. R., NEMEROFF, N. H. (1991). **Ninhydrin and Ninhydrin Analogs. Syntheses and Applications.** *Tetrahedron*, 47(42), 8791–8830.

LENNARD, C.J.; MARGOT, P.A.; STOILOVIC, M.; WARRENER, R.N. **Synthesis and evaluation of ninhydrin analogues as reagents** for the development of latent fingerprints on paper surfaces. *J Forensic Sci Soc.* 1988

LENNARD, C.J.; MARGOT, P.A.; STOILOVIC, M.; WARRENER, R.N. **Synthesis and evaluation of ninhydrin analogues as reagents for the development of latent fingerprints on paper surfaces.** *J Forensic Sci Soc.* 1988.

LAMOTHE, P.J.; McCORMICK, P.G. **Influence of acidity on the reaction of ninhydrin with amino acids.** *Anal Chemical*, 1972.

McCALDIN, D. J. *Chem. Rev.* 1960, 60, 39;

PETRACO, N. D. K.; PRONI, G.; JACKIW, J. J.; SAPSE, A.-M. M. *J. Forensic Sci.* 2006, 51, 1267;

RANDOM, L.; **Organic Mass Spectrom.** 1991, 26, 359.

RUHEMANN, S. **Triketohydrindene hydrate.** *J Chem Soc, Trans*, 1910, p.2025-2031.

RUHEMANN, S. **Cyclic di- and tri-ketones.** *J Chem Soc, Trans.* 1910, p.1438-1449.

SCHLEGEL, H. B. **Em New Theoretical Concepts for Understanding Organic Chemistry Reactions;** Bertrán, J., ed.; *Kluwer Academic Pubs:* Netherlands, 1989, p. 33-35.

SZABO, A., OSTLUND, N. S. **Em: Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory.** 1^a ed.; *McGraw-Hill:* New York, 1989, p. 193.

THOMPSON, S. E.; PARTHASARATHY, S.; **Materials Today.** 2006, 9, 20; Sealy, C.; *Nano Today* 2006, 1, 20.

VIEIRA, C. F. **Determinação espectrofotométrica de aspartame em produtos dietéticos usando ninidrina como reagente.** *Quim Nova*, 1995.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C.; RICKETTS, R.E.; **The determination of amino-acids with ninhydrin.** *Analyst*, 1955.