

Determinación de selenio por su efecto catalítico en la reducción del azul de toluidina por el ion sulfuro

POR

T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano
y M. Hernández Lozano

RESUMEN

La reducción del azul de toluidina por el sulfuro es catalizada cuando se encuentran presentes pequeñas cantidades de selenio. Como consecuencia de esto aportamos un nuevo método cinético para la determinación de selenio. Las condiciones experimentales han sido optimizadas y el método cinético de tiempo variable se seleccionó como más conveniente para las determinaciones analíticas de selenio. El nuevo procedimiento es muy sensible (10 ng/ml) y presenta buena exactitud y precisión. La mayoría de las interferencias producidas por los iones metálicos se eliminan mediante la adición de un exceso de AEDT-Ba²⁺.

SUMMARY

The reduction of toluidine blue by sulphide is catalysed by small amounts of selenium. As a consequence a new kinetic method for the selenium determination is developed. The experimental conditions have been optimized and the variable time method appears to be the most suitable for the determination of selenium. The new method is very sensitive (10 ng/ml) showing good accuracy. Most of the interferences from diverse metallic ions are eliminated by the addition of an excess of Ba(II)-EDTA.



INTRODUCCION

La detección y determinación de selenio despierta en la actualidad gran interés debido, principalmente, tanto a los efectos tóxicos crónicos que puede producir (1), como a su papel fisiológico esencial para el hombre y los animales cuando se encuentra a niveles de trazas (2-4) y a que su deficiencia puede estar ligada a algunos tipos de degeneración muscular. Por todo ello, la Química Analítica del selenio ha sido objeto de varias revisiones, algunas relativamente recientes (5-6).

Los métodos más comunes para su determinación se basan en medidas espectrofotométricas y espectrofluorimétricas de los compuestos que forma el Se(IV) al reaccionar con *o*-diaminobencidina o 2,3-diaminonaftaleno (7-8), pero estos procedimientos son generalmente lentos y los reactivos requeridos tóxicos. En los últimos años han ganado aplicación las determinaciones de selenio como hidruro gaseoso, SeH_2 , por distintas técnicas de absorción atómica (9-10).

Teniendo en consideración que los métodos catalíticos son mucho más sensibles que los espectrofotométricos basados en reacciones estequiométricas, se han utilizado los efectos catalíticos que produce el selenio en algunas reacciones redox, para la determinación de trazas de este elemento con muy buenos resultados (9). Así, Feilg y West (10) propusieron un ensayo cualitativo muy sensible basado en la reducción del azul de metileno por el sulfuro sódico, reacción que aplicaron a la determinación de pequeñas cantidades de selenio (11-12) Kawasima y Tanaka (13) determinaron selenio (IV), basándose en su efecto catalítico sobre la reducción del 1,4,6,11-tetraazanaftaleno por el ácido hipofosforoso y esta reacción fue luego aplicada a la determinación de selenio en el agua del mar (14). Otros procesos catalizados por el selenio y de interés analítico son las oxidaciones de la 1-naftilamina o de la *m*-fenilendiamina por el clorato que producen con el ácido *p*-hidrazobencenosulfónico compuestos intensamente coloreados (15-16).

En el presente trabajo se estudia la aceleración catalítica que provoca el selenio sobre la reducción del colorante tiacínico azul de toluidina (cloruro de 3-amino-7-dimetilamino-2-metil-fenotiazonio) por el ión sulfuro. La decoloración del azul de toluidina a su forma leuco por acción de los sulfuros procede muy lentamente a temperatura ambiente, pero su velocidad aumenta notablemente, como hemos comprobado cuando se encuentran presentes selenio elemental o Se(IV) . Este proceso catalítico lo hemos aplicado a la detección y determinación de selenio. El método cinético seleccionado para seguir la evolución de la reacción ha sido el de tiempo variable, midiendo el tiempo necesario para que las absorbancias

de las muestras disminuyan hasta 1/10 de su valor inicial. El método propuesto es sensible y exacto, permitiendo determinar selenio en concentraciones a niveles de trazas.

PARTE EXPERIMENTAL

APARATOS UTILIZADOS

Unidad de valoraciones fotométricas EEL, acoplada a un galvanómetro de espejo UNIGALVO, para seguir la variación de la absorbancia a lo largo de la reacción. El filtro utilizado en las medidas ha sido el núm. 607, escogido teniendo en cuenta los espectros de absorción del azul de toluidina y el de transmisión de dicho filtro (ver figura 1).

Células de doble pared apropiadas para termostatar.

Ultratermostato Colora de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ de precisión.

Potenciómetro Radiometer PHM63 Digital con electrodo de vidrio combinado, también Radiometer, para las medidas de pH.

Cronómetro de precisión.

REACTIVOS EMPLEADOS

Disoluciones de selenito sódico de 0,50 mg/ml y de 0,50 $\mu\text{g/ml}$.

La disolución más concentrada se preparó disolviendo 50 mg de selenio metal puro en la cantidad mínima posible de ácido nítrico concentrado. Se hierve suavemente hasta expulsión de vapores nitrosos y se completa hasta 100 ml en matraz aforado con agua bidestilada. Las disoluciones diluidas se prepararon por dilución conveniente a partir de la de 0,50 mg/ml.

Disolución de sulfuro sódico 0,1 M con sulfito sódico.

Se prepara disolviendo la cantidad adecuada de sulfuro sódico en agua bidestilada y añadiendo un peso igual de sulfito sódico. Este reactivo debe renovarse con relativa frecuencia, aproximadamente cada dos días.

Disolución de formaldehído al 30 %.

Disoluciones de diversos iones, para el estudio de interferencias.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las muestras se preparan midiendo, en las células especiales para termostatar, el problema de selenio a determinar, 5 ml de formaldehído al 30 %, 1 ml de sulfuro sódico 0,1 M (preparado con sulfito sódico) y 5 ml de AEDT-Ba²⁺ 10^{-1} M completando hasta 18 ml con agua bidestilada. Se termostata a 25°C y se pasa nitrógeno a través de la disolución durante diez minutos para expulsar el oxígeno de la misma, agregando entonces 2 ml de azul de toluidina. La concentración del colorante adicionado será 2×10^{-3} M cuando el rango de concentración de selenio esté comprendido entre 0,03 y 0,2 $\mu\text{g/ml}$ y de 4×10^{-4} M cuando el selenio se encuentre entre 10 y 60 ng/ml.

El pH de las muestras así preparadas es aproximadamente 10,2 y en los casos en que sean muy ácidas se ajusta el pH al valor adecuado mediante la adición de hidróxido sódico.

A partir de ese momento, manteniendo la muestra en agitación, se sigue la evolución de la reacción, mediante la medida del tiempo necesario para que la absorbancia de la disolución sea 1/10 del valor inicial.

Previamente el aparato se debe calibrar, correspondiendo el valor 0 a una disolución conteniendo 5 ml de formaldehído, 5 ml de AEDT-Ba²⁺ 10⁻² M y 10 ml de agua bidestilada y el 100 a muestras preparadas como se ha indicado anteriormente, pero sin selenio.

A partir de los tiempos de decoloración obtenidos con distintas concentraciones de selenio, se construyen las gráficas de calibrado en las que se representan en el eje de ordenadas los valores de 1/t_x (siendo t_x el tiempo de decoloración correspondiente para cada concentración de problema) y en el de abscisas la concentración de Se(IV) puesta. Se obtienen así líneas rectas con las que se puede determinar con gran exactitud el contenido de selenio en una muestra desconocida.

La reproducibilidad del método es excelente como se refleja en los datos numéricos presentados en la Tabla I obtenida aplicando el método estadístico a dos series de diez muestras de selenito al nivel de 2 µg y de 0,5 µg.

TABLA I

DETERMINACION CATALITICA DE SELENIO

Parámetros estadísticos

Cantidad de selenio puesto (µg)	2,00	0,50
Valor medio hallado (µg)	1,969	0,501
Desviación típica	6,61.10 ⁻²	2,51.10 ⁻²
Desviación media o error típico	2,01.10 ⁻²	8.10 ⁻³
Límite de confianza	2,016/1,922	0,5189/0,4831
Error relativo %	± 2,39	± 3,58
t _{exp}	0,469	0,04
t' _{exp}	1,48	0,13
Nivel de significación	5 %	5 %

De los parámetros estadísticos t_{exp} y t'_{exp}, obtenidos para esta serie de diez valoraciones, se deduce que el procedimiento analítico es correcto y no presenta error sistemático.

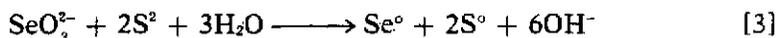
Determinación de selenio en un mineral

Se realizaron tres pesadas exactas de alrededor de 2 g de muestra problema (un mineral de aspecto negruzco de sulfuros complejos procedentes de Huelva, de elevado contenido en plomo) para realizar tres ataques independientes.

Al sólido se le añaden porciones sucesivas de 20 ml de ácido nítrico concentrado, calentando en baño de arena hasta reducir el volumen a unos 5 ml. Posteriormente se añaden 10 ml de SO₄H₂ 1:1, precipitando de esta forma gran parte del Pb(II) presente en la muestra. Se evapora hasta aparición de humos blancos, se añaden 20 ml de agua bidestilada y después de calentar un poco se filtra y se lava con ácido sulfúrico diluido, enrasando en matraz aforado hasta 100 ml.

Antes de aplicar nuestro método y para evitar la turbidez al agregar el AEDT-Ba-Na₂, se recomienda la previa adición de nitrato bórico y filtrar. Para disminuir el contenido en plomo a niveles tolerables se procedió a extraerlo con ditizona

Cuando el catalizador es el Se(IV) también se produce la especie activa $|\text{S} \dots \text{Se}^{\circ}|^{\ominus}$, ya que previamente tiene lugar el proceso redox:

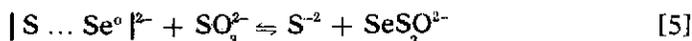


El azufre y el selenio elementales producidos se disuelven en exceso de sulfuro alcalino para producir polisulfuro y selenosulfuro, participando este último de nuevo en la reacción rápida [2], por lo que la actuación del selenio es la de catalizador.

El polisulfuro formado puede significar un inconveniente a la hora de aplicar la reacción a la detección o determinación de Se(IV), puesto que dicho ión polisulfuro presenta mayor reactividad frente al azul de toluidina que los iones sulfuro (aunque muy inferior a la de los iones selenosulfuro) y, por tanto, será conveniente transformar el polisulfuro en sulfuro. Este proceso se produce con facilidad simplemente por adición de sulfito sódico



Aunque el sulfito sódico también puede actuar frente al selenosulfuro, según:



esto no supone un inconveniente grave, puesto que la reacción [5], al contrario que la [4], es un equilibrio muy poco desplazado hacia la derecha incluso con un gran exceso de sulfito, por lo que el ión $|\text{S} \dots \text{Se}^{\circ}|^{\ominus}$ no desaparece y, por tanto, será efectivo como catalizador en la reducción del azul de toluidina.

La reacción catalítica objeto de estudio puede aplicarse desde el punto de vista analítico tanto a la detección de selenio (IV) como a su determinación.

Con el fin de establecer las condiciones más idóneas para el método analítico se han investigado las distintas variables que afectan al proceso catalítico, tales como concentración de reactivos, pH, temperatura, efectos de los iones extraños, influencia del oxígeno, etc.

Para seguir la evolución de la reacción de reducción del azul de toluidina por el sulfuro, en presencia y en ausencia de selenio se ha utilizado una unidad de valoraciones fotoquímicas con el filtro número 607, adecuado para seguir la evolución del color azul del colorante tiazínico.

En la figura 1 se representan los espectros de transmisión del azul de toluidina (curva 1) y el del filtro citado (curva 2), registrados en un espec-

trofotómetro Beckman DK2A. El filtro número 607 es el único de la unidad EEL que sólo transmite en la zona en que el colorante absorbe apreciablemente.

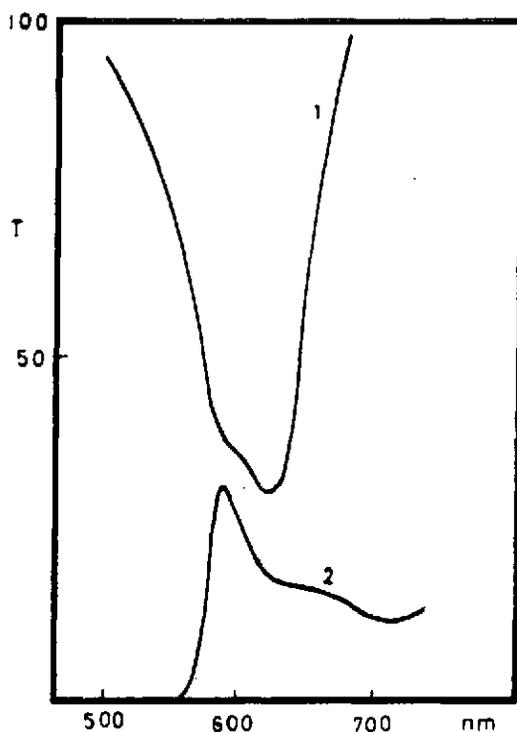


FIGURA 1.—Espectros de transmisión del azul de toluidina (curva 1) y del filtro utilizado para seguir la evolución de la reacción (curva 2).

La decoloración de la disolución se sigue midiendo el tiempo necesario para que la absorbancia de la muestra sea 1/10 del valor inicial, es decir, se utiliza la técnica cinética de tiempo variable, obteniéndose resultados mucho más exactos que con la simple observación visual de la disolución.

Previamente se intentó reducir en lo posible la velocidad de la reacción no catalizada por adición de diversas sustancias orgánicas miscibles con agua, sin perjudicar el efecto catalítico del selenio. Los disolventes utilizados fueron etanol, metanol, formaldehído y dioxano, los cuales se añadían a la mezcla de azul de toluidina y sulfuro y se llevaban siempre al mismo volumen final. De estas sustancias examinadas se encontró que el formaldehído conducía a resultados satisfactorios, pues inhibía la reacción no catalizada y, sin embargo, la velocidad de reducción del azul de toluidina por el sulfuro, en presencia de selenio, era suficiente. Después de preparar distintas muestras siguiendo el procedimiento recomendado

en la Parte Experimental que contenían 1 μg de selenio, pero con diversas concentraciones de disolvente orgánico, se comprobó que una concentración adecuada de formaldehído en la disolución es la de 7,5 % (5 ml de formaldehído del 30 % en un volumen final de 20 ml). No conviene elevar mucho la concentración de este último porque, si bien no se produce ningún efecto fondo, también se ve reducida significativamente la velocidad de la reacción catalizada.

EFFECTO DEL pH

La influencia del pH en la reacción catalítica se estableció con muestras conteniendo todas ellas 1 μg de selenio con las concentraciones de azul de toluidina y sulfuro recomendadas en la Parte Experimental, pero a las que se ha añadido distintas cantidades de hidróxido sódico 1 N o ClH 1 N para situarlas a diferentes pH, llevando siempre a un mismo volumen de 20 ml. El pH final se mide con electrodo de vidrio después de que la reacción ha transcurrido.

La figura 2 muestra el efecto del pH sobre la velocidad de reacción, y es evidente que ésta es constante a partir de un pH de 9,6. Hemos escogido para realizar las rectas de calibrado el valor 10,2.

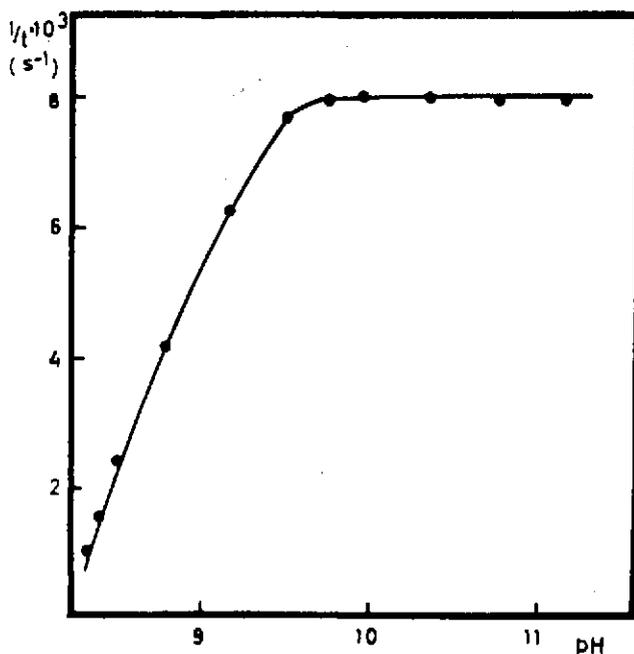


FIGURA 2.—Influencia del pH en la reacción de reducción del azul de toluidina por el sulfuro catalizado por el selenio.
 [azul de toluidina] = $2 \cdot 10^{-5}$ M; $[\text{S}^{2-}] = 5 \cdot 10^{-3}$ M
 [AEDT-Ba²⁺] = $2,5 \cdot 10^{-2}$ M; [Se(IV)] = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 7,5 % en formaldehído T = 25°,
 pH = 10,2

INFLUENCIA DEL OXÍGENO

El potencial redox del sistema azul de toluidina_{ox}/azul de toluidina_{red} es función del pH del medio (18), según muestra la figura 3, donde se observa que, al pH 10,2 en que se opera, tiene un potencial muy bajo y es oxidado por el oxígeno presente en la disolución.

Debido a este hecho, hemos comprobado que resultados reproducibles sólo pueden conseguirse trabajando en atmósfera inerte y es suficiente pasar nitrógeno a través de la disolución unos diez minutos antes de añadir el colorante, el cual se conserva, a su vez, exento de oxígeno. De esta forma se estabiliza completamente el leuco azul de toluidina formado en la reacción catalítica y, por tanto, es factible seguir con seguridad la evolución de la misma fotométricamente.

En la reducción catalizada del azul de metileno por los sulfuros, West y col. (11) encontraron que el AEDT-Fe (III) ejercía un efecto favorable en la reacción eliminando en parte el oxígeno presente en el medio. En nuestras experiencias, sin embargo, hemos comprobado que sólo se pueden obtener resultados totalmente reproducibles cuando se opera en atmósfera de nitrógeno. Por ello, en el método propuesto siempre se procede previamente al paso de gas inerte a través de la disolución problema.

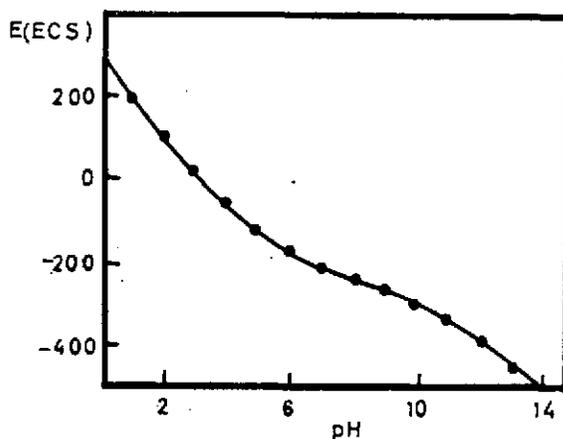


FIGURA 3.—Variación del potencial redox del azul de toluidina con el pH.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

El efecto que la temperatura ejerce sobre la reducción del azul de toluidina por los sulfuros, catalizada por el selenio, se muestra en la tabla III. La velocidad de reducción aumenta cuando se eleva la temperatura, pero hemos elegido trabajar termostataando las muestras a 25° C, porque al subir la temperatura también se observa una mayor rapidez en el proceso no catalizado.

TABLA III

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA REDUCCION DEL AZUL DE TOLUIDINA POR EL SULFURO

Temperatura °C	Tiempo de decoloración Reacción no catalizada t(s)	Reacción catalizada Tiempo de decoloración Se 50 ng/ml, t(s)
20	900	165
25	790	133
30	618	115
40	324	87
50	219	13
60	219	64

Todas las muestras eran 5×10^{-3} M en S^{2-} y 4×10^{-6} M en azul de toluidina a un pH 10,2 y $2,5 \times 10^{-2}$ M en AEDT-Ba (II) preparadas como se indica en la Parte Experimental. Los tiempos se toman cuando la absorbancia del problema se hace 1/10 de su valor inicial.

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE REACTIVOS

Como es obvio, puesto que la reducción del azul de toluidina se produce por acción del ión sulfuro, un aumento en la concentración de este último produce una mayor velocidad en la decoloración del colorante. Este efecto tiene lugar tanto en la reacción catalizada como en la no catalizada, de tal forma que si se utilizan concentraciones muy altas de sulfuro no existe una diferencia apreciable entre las velocidades de ambas reacciones y en esas condiciones no se podría aplicar el procedimiento analítico para determinar selenio.

Hemos buscado por esto unas condiciones en las que la diferencia de las velocidades de las reacciones en presencia y ausencia de selenio fuera máxima y se ha encontrado que una concentración en sulfuro 4×10^{-3} M es la aconsejable.

Teniendo en consideración la dificultad de preparar disoluciones de sulfuro de concentración exactamente conocida, condición que, por otro lado no es crítica, se ha comprobado que se obtiene suficiente reproducibilidad en los resultados cuando se utilizan disoluciones de sulfuro sódico preparadas por pesada sin que sea necesario el posterior contraste de las mismas, pero para mayor seguridad se recomienda comprobar de vez en cuando las rectas de calibrado.

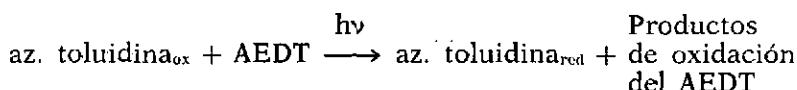
En presencia de exceso de sulfuro se ha estudiado la influencia de la concentración de azul de toluidina y a partir de los datos obtenidos trabajando con una concentración fija de selenio se deduce que la velocidad de la reacción catalizada es directamente proporcional a la concentración de colorante.

La elección de la concentración más adecuada de azul de toluidina a emplear en el procedimiento analítico está condicionada por los rangos de concentración de selenio a los que se va a aplicar, puesto que nos interesa obtener tiempos de reducción que se puedan medir con suficiente exactitud y que, por otro lado, no sean excesivamente largos. Por ello, para determinar selenio en el intervalo de concentración comprendido entre 0,03 y 0,2 $\mu\text{g/ml}$, es conveniente una concentración final de azul de toluidina 2×10^{-4} M y se recomienda emplear la 4×10^{-5} M cuando se determina entre 0,01 y 0,06 $\mu\text{g/ml}$ de selenio.

EFEECTO DE LOS IONES EXTRAÑOS

Debido a la gran reactividad que el ión sulfuro presenta con numerosos iones metálicos, es evidente que la presencia de estos últimos suponía una seria dificultad en el desarrollo del método analítico. Por ello se ha procedido a estudiar la reacción en un medio conteniendo AEDT- Ba^{2+} con el fin de poder eliminar, por formación de quelones metálicos, a los posibles interferentes.

La introducción del AEDT- BaNa_2 presenta una importante ventaja frente al empleo del AEDT- H_2Na_2 , puesto que bajo esta última forma el AEDT es capaz de producir con el azul de toluidina la siguiente reacción fotoquímica (19):



reacción que tiene lugar bajo la acción de un foco de luz blanca con velocidad considerable, pero que incluso con luz ambiental podría producir un efecto parásito que únicamente podríamos evitar operando bajo luz difusa.

Sin embargo, como ya es conocido, estas reacciones fotoquímicas entre los colorantes tiazínicos y el AEDT se ven inhibidas cuando el agente complejante se encuentra formando complejos con los iones metálicos suficientemente estables en las condiciones de pH del medio. Esto ocurre con el AEDT-Ba²⁺ al pH \approx 10 en que se trabaja para la determinación de selenio. Por otra parte, la mayoría de los iones metálicos presentes en la disolución que pueden reaccionar con el sulfuro son capaces de desplazar al Ba (II) de su complejo con el etilendiaminotetraacetato, puesto que sus constantes de formación de complejos con el AEDT van a ser superiores a los de Ba (II), y ya en forma de quelatos no precipitarán con el sulfuro bajo las condiciones recomendadas en la Parte Experimental.

Se han examinado las posibles interferencias que pueden producir gran número de iones, utilizando en las experiencias 1 μ g de Se y 50 μ g del interferente. Los iones estudiados han sido: Mn²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Al³⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, K⁺, Ba²⁺, Ag²⁺, Ce³⁺, Be²⁺, Zr⁴⁺, Bi³⁺, Sr²⁺, Cr³⁺, Li⁺, Fe³⁺, NH₄⁺, CH₃-COO⁻, NO₃⁻, ClO₄⁻, MoO₄²⁻, PO₄H₂⁻, Cl⁻, VO₃⁻, WO₄²⁻, TeO₃²⁻, CO₃²⁻, F⁻, B₄O₇²⁻ y de todos ellos en esta relación de concentraciones únicamente interfieren cobre, mercurio, plata y antimonio.

Los interferentes citados, a excepción del catión, plata y mercurio, pueden tolerarse cuando la relación Me/Se baja a 10. En el caso de que se encuentren en proporción superior una forma de eliminar la interferencia es recurrir al empleo de una resina de intercambio catiónico, realizando posteriormente el análisis en el eluido.

IDENTIFICACIÓN DE SELENIO

La reacción de reducción del azul de toluidina por el sulfuro puede utilizarse para detectar selenio tanto en placa de gotas como en tubo de ensayo y presenta una gran sensibilidad, pues su valor de pD es 5,3.

Como ya se ha señalado, los interferentes de la reacción cuando se opera en presencia de AEDT-Ba²⁺, son únicamente plata, mercurio, antimonio y cobre.

DETERMINACIÓN DE SELENIO

Siguiendo las condiciones descritas en la Parte Experimental y utilizando el procedimiento cinético de tiempo variable, se ha procedido a

realizar las gráficas de calibrado. Se han construido líneas rectas representando las inversas de los tiempos requeridos para alcanzar una absorbancia 1/10 del valor inicial, frente a las distintas concentraciones de selenio.

La línea 1 de la figura 4 corresponde a la recta de calibrado obtenida cuando la concentración de azul de toluidina es 2×10^{-4} M y la línea 2 de la misma figura se refiere a las experiencias realizadas con una concentración en colorante 4×10^{-5} M. Así, en el primer caso los resultados nos muestran que se puede aplicar para determinar selenio en el intervalo de concentración comprendido entre 0,03-0,2 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la recta 2 obtenida con menor concentración de azul de toluidina es más adecuada para poder evaluar contenidos de selenio incluidos en el rango entre 10 y 60 ng/ml .

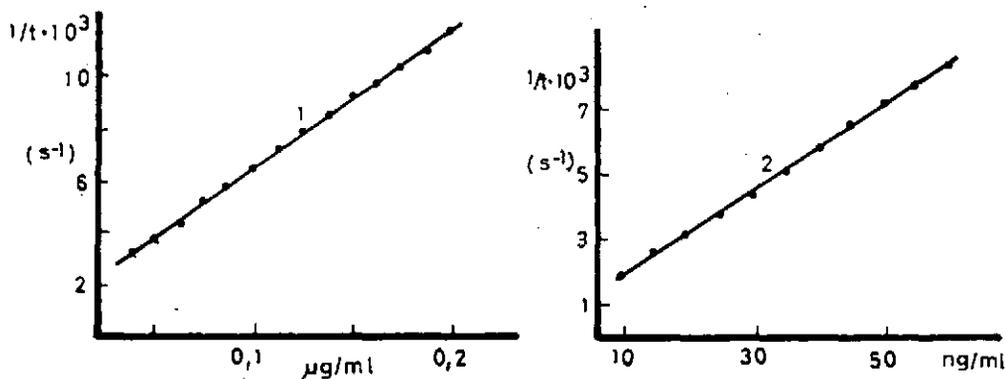


FIGURA 4.—Rectas de calibrado $[\text{S}^{2-}] = 5 \cdot 10^{-3}$ M; $[\text{AEDT-Ba}^{2-}] = 2,5 \cdot 10^{-2}$ M; 7,5 % de formaldehído; pH = 10,2, T = $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$
 Línea 1: azul de toluidina $2 \cdot 10^{-4}$ M
 Línea 2: azul de toluidina $4 \cdot 10^{-5}$ M

Los resultados analíticos obtenidos utilizando este método de determinación de selenio son bastante exactos, tal como muestra la tabla I, en que se reflejan los valores numéricos calculados aplicando el método estadístico sobre dos series de diez muestras con un contenido total en selenio de 2 μg y de 0,5 μg , respectivamente.

Nos ha parecido interesante emplear el método cinético propuesto para la determinación de pequeñas concentraciones de selenio en muestras reales, y así se ha determinado este elemento en un mineral, procedente de Huelva, correspondiente a una mezcla de sulfuros complejos con alto contenido en plomo. Los resultados encontrados (tabla II) han sido satisfactorios y comparables a los obtenidos aplicando el método de determinación con o-fenilendiamina (17).

BIBLIOGRAFIA

1. GLOVER, J.; LEVANDER, O.; PARICEK, J., y VOUK, V. B., en Briberg, L.; Norberg, G. F., y Vouk, V. B., *Hanbook on the Toxicology of Metals*, Elsevier, Amsterdam, 556 (1979).
2. LANSFORD, M. G., y CALABRESE, E. M., *Med. Hypotheses*, 5, 877 (1979).
3. JACOB, M., *Cancer*, 40, 2559 (1977).
4. WOLF, W. R., *Anal. Chem.*, 50, 190A (1978).
5. NAZARENKO, I. L., y ERMOKOV, A. N., *The Analytical Chemistry of Selenium and Tellurium*, Halstead Press-John Wiley, New York (1972).
6. OLSON, O. E.; PALMER, I. S., y WHITEHEAD, E. I., en *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. D. Glick), John Wiley, London, 21, 39 (1972).
7. HALL, R. J., y GUPTA, P. L., *Analyst*, 94, 292 (1969).
8. BROWN, M. W., y WATKINSON, J. H., *Anal. Chem. Acta*, 89, 29 (1977).
9. MICHAYLOVA, V.; EVTIOVA, B., y BONTCHEV, P. R., *Mikrochim. Acta*, 922 (1968).
10. FEIGL, F., y WEST, P. W., *Anal. Chem.*, 19, 351 (1947).
11. WEST, P. W., y RAMAKISHNA, M., *Anal. Chem.*, 40, 137 (1968).
12. MESMAN, B. B., y DOPPELMAYR, H. A., *Anal. Chem.*, 43, 1346 (1971).
13. KAMASHIMA, T., y TANAKA, M., *Anal. Chim. Acta*, 40, 137 (1968).
14. KAMASHIMA, T., y YOKOYAMA, K., *Busenki-Kiki (Anal. Instr.)*, 11, 784 (1973).
15. KAMASHIMA, T.; NAKANOS, S. y TANAKA, M., *Anal. Chim. Acta*, 49, 443 (1970).
16. KAMASHIMA, T.; KAI, S., y TARASHIMA, S., *Anal. Chim. Acta*, 89, 65 (1977).
17. SNELL, F., *Photometric and Fluorimetric Methods of Analysis*, Wiley Interscience, 514 (1981).
18. SIERRA, F.; SÁNCHEZ-PEDREÑO, C.; PÉREZ RUIZ, T.; MARTÍNEZ LOZANO, C., y HERNÁNDEZ CÓRDOBA, M., *Anal. Quím.*, 73, 410 (1977).
19. SIERRA, F.; SÁNCHEZ-PEDREÑO, C.; PÉREZ RUIZ, T., y MARTÍNEZ LOZANO, C., *Anal. Quím.*, 70, 595 (1974).