

Aplicaciones analíticas de la reducción fotoquímica de la riboflavina por el ácido etilenodiaminotetraacético. Determinación de ioduro

POR

T. PEREZ RUIZ, C. MARTINEZ LOZANO y
V. TOMAS MARTINEZ

RESUMEN

Se ha estudiado la reacción fotoquímica entre la riboflavina y el ácido etilenodiaminotetraacético (en ausencia de oxígeno) con la finalidad de desarrollar un método cinético para la determinación de ioduro. La reacción es de primer orden con respecto a la riboflavina, AEDT e intensidad de la radiación absorbida. La velocidad del proceso fotoquímico depende del pH y es máxima a pH 7,2. La fotorreducción tiene lugar a través de estados excitados de larga vida de la vitamina B₂ y está muy afectada por la presencia de pequeñas cantidades de ioduro. Se propone un posible mecanismo y se han estudiado todas las variables con la finalidad de optimizar las condiciones del método analítico.

Se ha empleado el procedimiento del tiempo variable como el más apropiado para la determinación de ioduro. La sensibilidad es de 8 µg/ml y el coeficiente de variación del 3 %. Los iones bromuro y cloruro son compatibles hasta la relación 100/1. La interferencia de los iones metálicos se elimina añadiendo un exceso de AEDT.



SUMMARY

A kinetic study of the photochemical reaction of riboflavin and EDTA (in the absence of oxygen) has been made in connection with development of a new kinetic method for iodide. The reaction is first-order with respect to riboflavin, EDTA and absorbed light-intensity. The rate of photoreduction is strongly pH-dependent, and maximal at about pH 7.5. The photoreduction involves a long-lived excited state of the vitamin B₂ and is dramatically retarded by small amounts of iodide. A tentative mechanism is proposed, and the experimental conditions have been optimized. The variable time method appears to be the most suitable for determination of iodide. A detection limit of 8 µg/ml and a coefficient of variation about 3 % can be achieved. Chloride and bromide do not interfere at levels below 100-fold mole ratio to iodide. Metal ions do not interfere if enough excess of EDTA is used.

INTRODUCCION

La foto-oxidación del ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) por la riboflavina ha sido objeto de numerosas investigaciones (1-7). Estudios polarográficos han permitido determinar inequívocamente que el producto de reducción de la riboflavina es la 1,5-dihidrorriboflavina (1, 5, 8).

Por lo que respecta al AEDT, no se conocen con certeza todos los compuestos formados en su oxidación, se han identificado CO₂, formaldehído y ácido glioxílico (5-10).

El mecanismo de este proceso fotoquímico ha sido objeto de algunas controversias. Así, Straus y Nickerson (11) consideran que el AEDT actúa como un activador y forma un compuesto intermedio con la riboflavina y el agua, que disminuye la energía requerida para romper el enlace O-H de la molécula de agua. De los estudios realizados por Moore (12) en agua y en óxido de deuterio se ha podido establecer que el agua no debe de estar implicada en la etapa determinante de la velocidad.

Holmstron (13) ha demostrado la formación de semiquinonas como intermediarios, y considera que el proceso primario es la transferencia de un electrón desde el AEDT a la riboflavina produciendo la semiquinona. Sin embargo, estudios por fotólisis de flash han permitido establecer que la cantidad de riboflavina que se decolora por flash excede en mucho a la del radical formado, lo que evidencia que este camino no puede ser la reacción predominante.

Teniendo en cuenta la existencia de aductos (4a) entre el AEDT y varias flavinas (14), se ha considerado que la reacción fotoquímica transcurre a través del aducto (4a) intermediario no estable, con la consiguiente descarboxilación y liberación de CO_2 . Posteriormente, el intermediario se descompondría dando 1,5-dihidrorriboflavina, formaldehído y posiblemente etilenodiaminotriacético (15).

El estado excitado de la riboflavina a través del cual tiene lugar la fotooxidación del AEDT es el triplete (T_1). Esto ha sido demostrado empleando como sustratos no sólo el ácido etilenodiaminotetraacético, sino también otras aminas como la N-bencil-N,N'-dimetiletilenodiamina y la N,N'-dibencil-etilenodiamina (13, 16-19).

En este trabajo presentamos los estudios cinéticos de la foto-reducción de la riboflavina por el AEDT, y se ha encontrado que esta reacción es fuertemente inhibida por los iones yoduro. Hecho que nos ha permitido establecer un método analítico muy selectivo y sensible para la determinación de este anión.

PARTE EXPERIMENTAL

APARATOS UTILIZADOS

Fuente de radiación

Lámpara de halógeno Sylvania de 24 V y 150 W con un filtro de paso de banda con el que se obtiene una radiación con suficiente intensidad entre 415 y 475 nm.

Dispositivo de iluminación

En el dispositivo de iluminación la luz de la lámpara atraviesa una pequeña cámara por donde circula agua y en la que se colocan los diversos filtros neutros para obtener las distintas intensidades luminosas. El voltaje de entrada de la lámpara se mantiene fijo por medio de un estabilizador de tensión de alta precisión. La intensidad luminosa incidente sobre la célula se mide con un actinómetro de ferrioxalato potásico.

Espectrofotómetro Beckman DK2A, para el registro de la distribución espectral de la fuente de radiación.

Espectrofotómetro Philips SP-100, para el registro de los espectros.

Unidad para valoraciones fotométricas EEL.

DISOLUCIONES EMPLEADAS

Disoluciones acuosas de riboflavina 10^{-4} M.

Disoluciones de AEDT- H_2Na_2 10^{-1} M y 10^{-2} M.

Disolución contrastada de yoduro potásico 10^{-3} M.

Disoluciones reguladoras Britton-Robinson de diferentes pH, preparadas a partir de una disolución que es 0,2 M en los ácidos bórico, acético y fosfórico, a la que se le añaden la cantidad adecuada de disolución 1 M de NaOH. Los valores de pH se comprueban potenciométricamente con electrodo de vidrio.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las muestras contienen los reactivos siguientes: 10 ml de riboflavina 10^{-4} M, 5 ml de disolución reguladora Britton-Robinson de pH 3,5 (también se han realizado gráficas de calibrado a pH 5), 5 ml de AEDT M/10 y diferentes volúmenes de disolución contrastada de ioduro potásico M/1000, de forma que la concentración de ioduro esté comprendida entre 8 y 80 ppm y se completa a 30 ml con agua bidestilada.

Para eliminar el oxígeno de la disolución se hace burbujear nitrógeno a través de la misma durante 10-15 minutos. Esto es imprescindible ya que la 1,5-dihidrorriboflavina que se va formando se oxida con facilidad por el oxígeno del aire.

Seguidamente, se conecta la lámpara de halógeno y se mide, con el equipo de valoraciones fotométricas EEL, el tiempo necesario para que la absorbancia de la disolución se reduzca a 1/10 de su valor inicial.

Las líneas de calibrado se construyen representando la concentración de ioduro frente a la relación t_r/t_0 , siendo t_r el tiempo requerido para la fotorreducción de las muestras con distintas concentraciones de I^- y t_0 el tiempo correspondiente para una muestra exenta de ioduro.

La iluminación adecuada debe de ser escogida de forma que se obtengan valores de t_0 en un rango de 80-150 segundos.

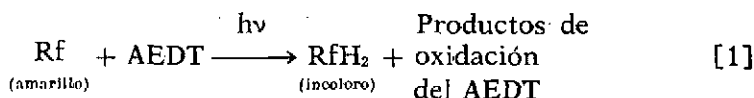
La determinación de I^- en muestras desconocidas se realiza de la misma forma, como es obvio, para obtener resultados exactos y reproducibles la concentración de los reactivos y la intensidad de la radiación deben ser los mismos que se han utilizado en la obtención de las curvas de calibrado.

En la Tabla V quedan reseñados los resultados numéricos obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

La fuente de excitación empleada ha sido una lámpara de halógeno a la que se acopla un filtro de paso de banda con el que se consigue que la radiación emitida esté comprendida entre 415 y 475 nm., frecuencias que corresponden al máximo de longitud de onda más larga del espectro de absorción de la riboflavina (figura 1).

Cuando una disolución conteniendo riboflavina (Rf) y ácido etileno-diaminotetraacético (AEDT), en ausencia de oxígeno, se somete a la acción de esta fuente de radiación, se produce la rápida desaparición del color amarillo al reducirse la vitamina B_2 a 1,5-dihidrorriboflavina (RfH_2). La reacción es:



Si ahora se pasa una corriente de aire o se añade peróxido de hidrógeno a la disolución decolorada inmediatamente se recupera el color amarillo. La figura 2 muestra que los espectros de absorción de la riboflavina antes de la reducción y los correspondientes a la oxidación de la

disolución fotodecolorada son coincidentes, poniendo de manifiesto que la vitamina B₂ no sufre ninguna degradación en la reacción fotoquímica con el AEDT.

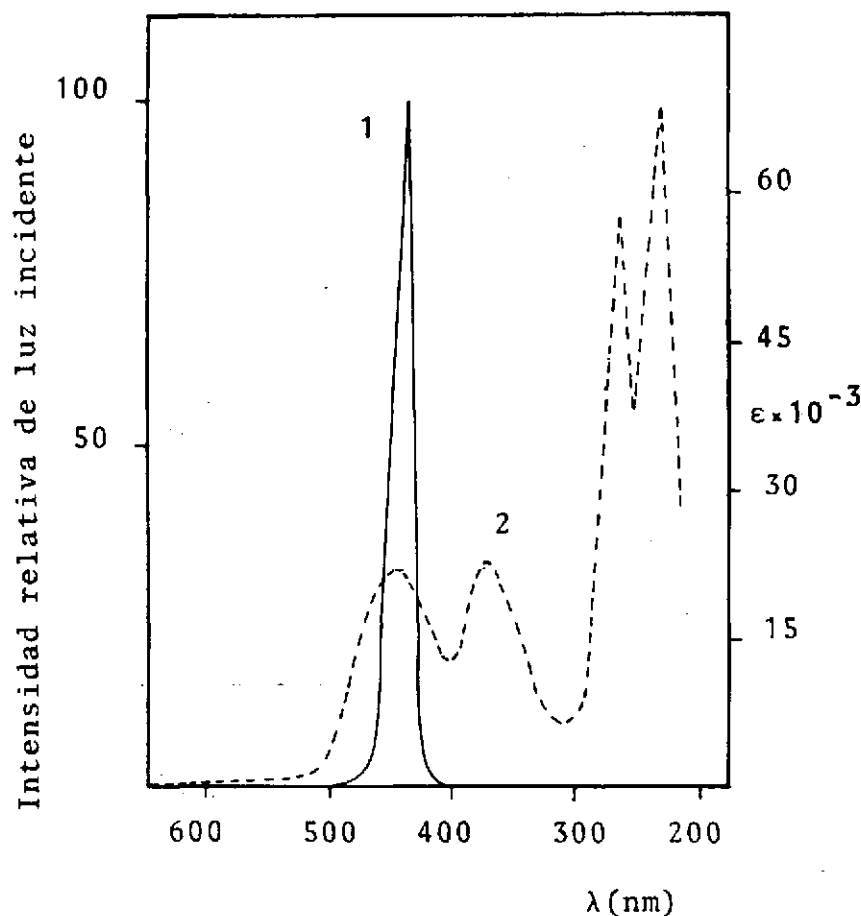


Fig. 1.—Curva 1: Distribución espectral de la fuente empleada. Curva 2: Espectro de absorción de la Riboflavina.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS REACCIONANTES

El orden de reacción con respecto a la riboflavina se ha determinado en presencia de un gran exceso de AEDT, empleando el método de integración. La propiedad escogida para seguir la variación que experimenta la concentración de riboflavina es la corriente de difusión medida con

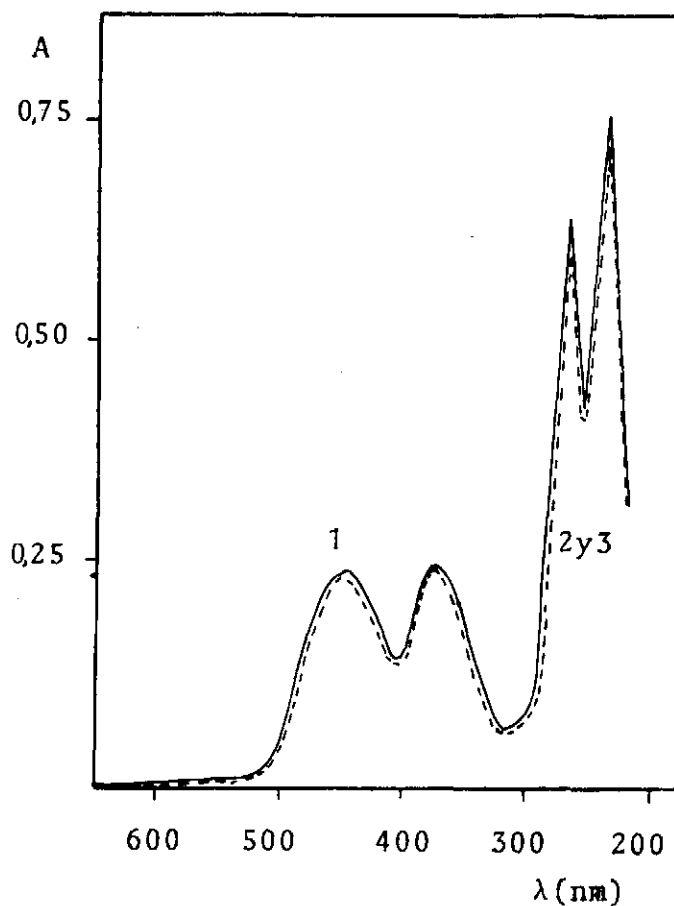


Fig. 2.—Espectro de absorción de la Riboflavina. Curva 1: Antes del proceso fotoquímico. Curvas 2 y 3: Después del proceso fotoquímico y reoxidada con oxígeno y peróxido de hidrógeno respectivamente.

un electrodo de gotas de mercurio (potencial aplicado $-0,70$ v vs ECS) (21). Los datos obtenidos (tabla I) demuestran una dependencia de primer orden con respecto a la riboflavina.

El orden global se ha determinado con el método de integración, siguiendo polarográficamente el curso de la reacción. Los resultados de la tabla II muestran una cinética de segundo orden, por lo tanto, con respecto al AEDT es también la unidad.

TABLA I

VALORES DE LA PSEUDO CONSTANTE DE PRIMER ORDEN PARA DISTINTA CONCENTRACION INICIAL RIBOFLAVINA

$[\text{Riboflavina}]$ μM	K, s^{-1}
30	1,6
46	1,5
60	1,7
66	1,6
80	1,8

$[\text{AEDT}] = 3,3 \times 10^{-2} \text{ M}$, reguladora acetato $\text{pH} = 5,0$, $T = 25^\circ \text{C}$.

TABLA II

VALORES DE LA CONSTANTE DE SEGUNDO ORDEN

Tiempo fotólisis (s)	Corriente μA	$[\text{Riboflavina}_{\text{res}}]$ μM	$K, \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0	1,15	0	49,4
15	0,88	7,6	52,1
45	0,55	17,3	45,2
75	0,39	22,0	58,6
105	0,26	25,8	53,3

$[\text{Riboflavina}]_0 = 3,3 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{AEDT}] = 3,0 \times 10^{-4} \text{ M}$.

INFLUENCIA DEL PH

La figura 3 representa la variación de la velocidad relativa de foto-reducción en función del pH. Como puede apreciarse, la velocidad del proceso fotoquímico es máxima a pH 7,2 y disminuye en medios ácidos y básicos.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA

La velocidad de la reacción fotoquímica no está afectada por la temperatura, como refleja la tabla III, que corresponde a los tiempos de decoloración para una serie de muestras iguales.

TABLA III

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL PROCESO FOTOQUIMICO

Temperatura $^\circ\text{C}$	20	25	30	35	40	50
Tiempo de fotorreducción (s)	135	134	132	126	124	120

$[\text{AEDT}] = 1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{Riboflavina}] = 3,3 \times 10^{-5} \text{ M}$, reguladora acetato $\text{pH} = 5,0$.

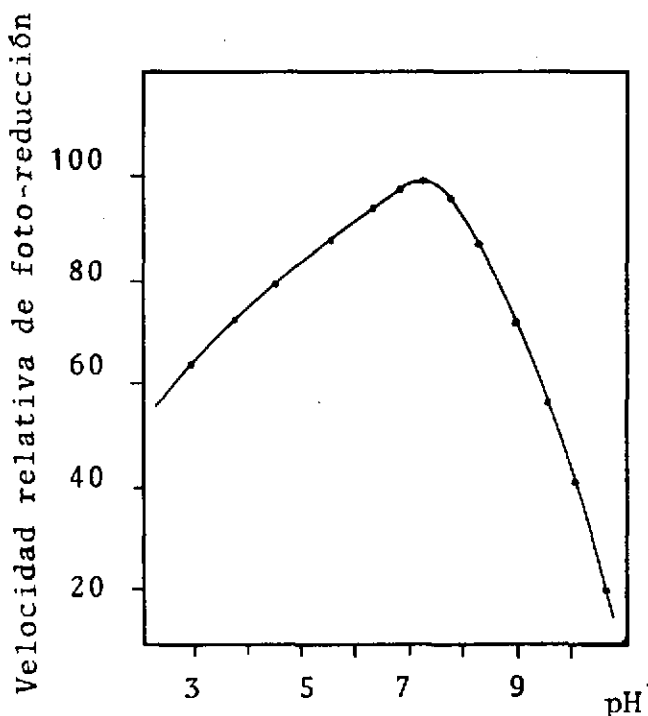


Fig. 3.—Velocidad de fotorreducción en función del pH.

INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD LUMINOSA Y RENDIMIENTO CUÁNTICO

El efecto de la intensidad de la radiación sobre la velocidad de la reacción fotoquímica viene dado por

$$V = - \frac{dC}{dt} = K I_a^n \quad [2]$$

donde n es el orden de reacción con respecto a la intensidad luminosa absorbida I_a (expresada en $\text{Einstein} \times \text{l} \times \text{s}^{-1}$), C la molaridad de la especie absorbente, la riboflavina y K la constante de proporcionalidad.

Teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer la ecuación [2] se puede escribir en la forma

$$- \frac{dC}{dt} = K I_0^n (1 - e^{-2.3 \epsilon l c})^n \quad [3]$$

donde I_0 es la intensidad luminosa incidente y ϵ la absorptividad molar de la riboflavina. La ecuación integrada es:

$$-\int_{c_0}^c \frac{dc}{(1 - e^{-2.3 \epsilon \cdot l \cdot c})} = K I_0^n \int_0^t dt \quad [4]$$

Si se representan gráficamente la integral en función de los tiempos para diferentes valores de n (por ejemplo, 1/2, 1, 3/2 y 2), la línea recta que satisface la ecuación [4] da el valor de n .

Como la radiación empleada no es monocromática (ver figura 1) es necesario calcular una absorptividad molar media $\bar{\epsilon}$, integrando sobre todas las longitudes de onda incidentes

$$\bar{\epsilon} = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \epsilon_{\lambda} I_{\lambda}^0 d\lambda}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I_{\lambda}^0 d\lambda} \quad [5]$$

donde ϵ_{λ} es la absorptividad molar y I_{λ}^0 la intensidad incidente a la longitud de onda λ .

La curva de ϵ_{λ} no se puede expresar en forma analítica, por lo que es necesario efectuar una integración numérica de los datos de la figura 1. Se obtiene un valor para $\bar{\epsilon}$ de $13.276 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

La decoloración de la riboflavina por el AEDT en ausencia de oxígeno y a diferentes valores de I_0 se seguía polarográficamente, midiendo la corriente de reducción de la vitamina B_2 . La resolución de la ecuación [4] muestra que la velocidad de la reacción fotoquímica es una función lineal de la intensidad luminosa, y al sustituir en [1] se obtiene:

$$K = \frac{-dc/dt}{I_0} \quad [6]$$

luego K es el rendimiento cuántico Φ , pues representa el número de moléculas transformadas por fotón absorbido durante un tiempo dado. En la tabla IV se incluyen los rendimientos cuánticos a tres valores de pH y para diferentes concentraciones de AEDT.

TABLA IV

VALORES DEL RENDIMIENTO CUANTICO (RIBOFLAVINA $3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$)

$[AEDT], \text{ M}$	pH 4,11	pH 5,05	pH 6,36
$3,33 \times 10^{-2}$	0,297	0,280	0,290
$2,66 \times 10^{-2}$	0,282	0,313	0,304
$2,00 \times 10^{-2}$	0,334	0,308	0,287

MECANISMO DE REACCIÓN

De las consideraciones anteriormente expuestas podemos establecer la hipótesis de que la reacción fotoquímica entre la riboflavina y el AEDT en ausencia de oxígeno tiene lugar a través de colisiones entre moléculas de la flavina que alcanzan el estado fotoactivo y las especies iónicas del AEDT susceptibles de ser oxidadas.

La gran influencia del pH sobre la velocidad de la reacción (figura 3) se puede explicar admitiendo la hipótesis de Haas y Hemmerich (10) de que los aniones de los aminoácidos reaccionan rápidamente por descarboxilación con preferencia a la deshidrogenación, mientras que la forma neutra es inerte en estado dipolar y solamente el tautómetro sin carga puede sufrir la ruptura C—H de forma extremadamente lenta. Si además tenemos en cuenta lo ya establecido para ciertos colorantes y ácidos aminopolicarboxílicos (22-28), queda patente que las especies del AEDT, que son fotooxidadas con más facilidad, son aquellas que posean al menos un átomo de nitrógeno no protonado.

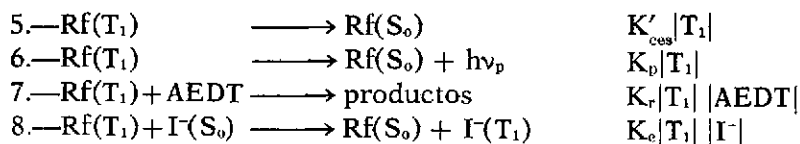
Evidentemente, el pH del medio también debe afectar a los centros activos del núcleo isoaloxacina (1), lo que hace que la relación velocidad de reacción—pH sea bastante compleja.

La riboflavina tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia relativamente bajo ($\Phi_f = 0,32$ en etanol (29)) y un cruce entre sistemas $S_1 \rightarrow T_1$ bastante eficaz ($\Phi > 0,5$ (30)). Teniendo en cuenta estos hechos y que el AEDT no extingue la fluorescencia de la riboflavina aunque sí que es fotooxidado por ella, es lógico considerar que el estado fotoactivo debe ser el triplete.

También se ha observado que la presencia de pequeñas cantidades de yoduro o de p-fenilendiamina no afectan a la fluorescencia de la vitamina B₂, pero hacen que disminuya notablemente la velocidad de la fotorreducción de la riboflavina por el AEDT. Esto se debe a un proceso de transferencia de energía entre la riboflavina en el estado triplete y el inhibidor.

De acuerdo con los resultados experimentales se puede proponer el siguiente esquema cinético:

Proceso		Velocidad	
1.—Rf(S ₀) + hν	→	Rf(S ₁)	K
2.—Rf(S ₁)	→	Rf(S ₀)	K _{ef} S ₁
3.—Rf(S ₁)	→	Rf(S ₀) + hν _r	K _r S ₁
4.—Rf(S ₁)	→	Rf(T ₁)	K _{ees} S ₁



donde S_0 , S_1 y T_1 son los estados singletes fundamental y excitado y triplete, respectivamente. Los sufijos ci, ces, f, p, r y e significan conversión interna, cruce entre sistemas, fluorescencia, fosforescencia, reacción química y transferencia de energía triplete-triplete.

DETERMINACIÓN DE IODURO

Teniendo en cuenta el esquema cinético propuesto y aplicando la hipótesis del estado estacionario para la concentración de la riboflavina en su estado triplete se obtiene:

$$|T_1| = \frac{K_{\text{ces}}|S_1|}{K_p + K'_{\text{ces}} + K_r|\text{AEDT}| + K_e|\text{I}^-|} \quad [7]$$

La velocidad de conversión de la riboflavina en su leucoforma está controlada por la velocidad de la reacción química. Esta es igual a $K_r|T_1| |\text{AEDT}|$, y la expresión del rendimiento cuántico para la reducción de la riboflavina es:

$$\Phi = \frac{K_r|T_1| |\text{AEDT}|}{K} \quad [8]$$

Sustituyendo $|T_1|$ de la ecuación [7] se obtiene:

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{K}{K_{\text{ces}}|S_1|} \left(1 + \frac{K_d}{K_r} \frac{1}{|\text{AEDT}|} + \frac{K_e}{K_r} \frac{|\text{I}^-|}{|\text{AEDT}|} \right) \quad [9]$$

donde K_d es igual a $K_p + K'_{\text{ces}}$.

En ausencia de ioduro, la ecuación [9] se reduce a:

$$\frac{1}{\Phi^0} = \frac{K}{K_{\text{ces}}|S_1|} \left(1 + \frac{K_d|\text{AEDT}|}{K_r} \right) \quad [10]$$

donde Φ^0 es el rendimiento cuántico para la fotorreducción de la riboflavina en ausencia de ioduro.

Dividiendo las ecuaciones [9] y [10], se obtiene:

$$\frac{\Phi^0}{\Phi} = 1 + \frac{K_e |\text{I}^-|}{K_d + K_r|\text{AEDT}|} \quad [11]$$

Si la intensidad de la radiación incidente se mantiene constante en las medidas realizadas con y sin ioduro, se obtiene:



$$\frac{V_o}{V_x} = \frac{\Phi^o}{\Phi} = 1 + \frac{K_e |\Gamma|}{K_d + K_r |\text{AEDT}|} \quad [12]$$

siendo V_x y V_o las velocidades de la reacción con y sin yoduro.

Si se emplea un gran exceso de AEDT de tal forma que su concentración pueda considerarse constante, se tiene:

$$\frac{V_o}{V_x} = 1 + \text{constante} |\Gamma| \quad [13]$$

Ecuación que permite determinar yoduro midiendo la velocidad del proceso fotoquímico en ausencia y presencia de dicho anión.

Para fijar las condiciones idóneas aplicables al método analítico, realizamos un estudio de los factores que afectan a la reacción fotoquímica entre la riboflavina y el AEDT, cuando se encuentra en el medio el anión yoduro.

La figura 4 muestra que la inhibición de la reacción fotoquímica depende del pH. El rango de pH entre 3, y 5,5 es muy adecuado, pues proporciona no sólo un alto grado de inhibición, sino que además la velocidad de fotorreducción de la riboflavina por el AEDT todavía es apreciable (figura 3).

El tiempo de decoloración disminuye cuando aumenta la concentración de AEDT y no se observan posteriores disminuciones para relaciones entre las concentraciones de AEDT y riboflavina superiores a 200.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE YODURO

La ecuación [13] muestra que el yoduro se puede determinar midiendo la velocidad de reducción de la riboflavina por el AEDT, si se controlan las variables que afectan al proceso fotoquímico.

El procedimiento seguido en este método cinético es el de «tiempo variable» y se mide el tiempo necesario para que la muestra problema alcance un valor fijo de absorbancia previamente elegido.

MÉTODO ANALÍTICO

Con objeto de conseguir una técnica sencilla para determinar yoduro, se realizaron experiencias empleando como fuente de excitación la lámpara de halógeno sin acoplar el filtro de paso de banda. Los resultados obtenidos son en todo concordantes con los descritos anteriormente.

El método es bastante preciso en las condiciones recomendadas, las máximas desviaciones son del 3 % como pone de manifiesto la tabla V.

El límite de detección es de 8 $\mu\text{g/ml}$. Para cantidades menores de yoduro, las diferencias entre los tiempos de decoloración entre el ensayo

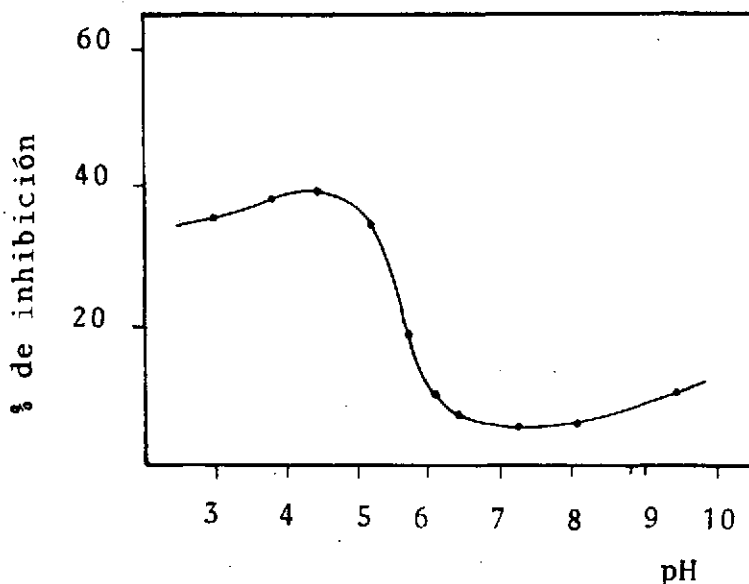


Fig. 4.—Efecto inhibitorio del yoduro en función del pH.

en blanco y la muestra problema son tan pequeñas que el error aumenta. Por otra parte, para concentraciones de I^- superiores a 80 ppm. los tiempos requeridos para conseguir la fotodecoloración de la riboflavina son demasiado elevados. En estos casos es conveniente diluir la muestra.

TABLA V
DETERMINACION DE YODURO

<i>Parámetros estadísticos</i>	
Cantidad de I^- puesta (mg)	1,142
Valor medio hallado (mg)	1,1760
Desviación típica	1,5052
Desviación media o error típico	0,5332
Límite de confianza	1,212/1,140
Error relativo	$\pm 3,0\%$
t_{exp}	0,023
t'_{exp}	0,072

Los valores de la Tabla han sido obtenidos a partir de series de diez determinaciones y para una probabilidad del 95 %.

INTERFERENCIAS

Los iones cloruro y bromuro no interfieren hasta la relación molar $|X^-| / |I^-|$ de 100/1.

En presencia de iones metálicos que forman complejos estables con el anión etilendiaminotetraacetato es preciso añadir AEDT en suficiente cantidad para que aquéllos queden complejados y exista el exceso conveniente de AEDT libre.

BIBLIOGRAFIA

1. W. MOORE, J. SPENCE, R. FLOYD y S. COLSON, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3367 (1963).
2. E. C. SMITH y D. E. METZLER, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3285 (1963).
3. B. HOLMSTROM y G. OSTER, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1867 (1961).
4. J. MERKEL y W. NICKERSON, *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 303 (1954).
5. V. MASSEY, M. STANKOVICH y P. HEMMERICH, *Biochemistry*, **17**, 1 (1978).
6. W. FRISSELL, C. CHUNG y C. MACKENZIE, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1297 (1959).
7. L. VERNON, *Biochim. Biophys. Acta*, **36**, 177 (1959).
8. K. ENNS y W. BURGESS, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1822 y 5766 (1965).
9. G. PENCER y G. RADDA, *Biochem. J.*, **109**, 259 (1968).
10. W. HAAS y P. HEMMERICH, *Z. Naturforsch.*, **27B**, 1035 (1972).
11. W. NICKERSON y G. STRAUS, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 507 (1960); **83**, 3187 (1961).
12. W. M. MOORE, *Utah University*.
13. B. HOLMSTROM, *Photochem. Photobiol.*, **3**, 97 (1964).
14. L. ELLIOT y T. BRUICE, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 7901 (1973).
15. V. MASSEY, M. STANKOVICH y P. HEMMERICH, *Biochem.*, **17**, 1 (1978).
16. G. OSTER, J. BELLIN y B. HOLMSTROM, *Experientia*, **18**, 249 (1962).
17. W. E. KURTIN, M. LATINO y P. SONG, *Photochem. Photobiol.*, **6**, 247 (1967).
18. G. PENCER y G. RADDA, *Quart. Rev.*, **21**, 43 (1967).
19. G. RADDA y M. KALVIN, *Biochemistry*, **3**, 384 (1964).
20. C. HATCHARD y C. PARKER, *Proc. Roy. Soc.*, **A235**, 518 (1956).
21. M. BREZINA y P. ZUMAN, *Polarography in Medicine Biochemistry and Pharmacy*, Interscience (1958), pág. 391.
22. G. OSTER y N. WOTHERSPOON, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4836 (1957).
23. J. FAURE y J. JOUSSOT-DUBIEN, *J. Chim. Phy.*, **63**, 621 (1966).
24. J. FAURE, R. BONNEAU y J. JOUSSOT-DUBIEN, *Photochem. Photobiol.*, **6**, 331 (1967).
25. M. NEMOTO, H. KOKUBUN y M. KOIZUMI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **42**, 2464 (1969).
26. F. SIERRA, C. SÁNCHEZ-PEDREÑO, T. PÉREZ RUIZ, M. MARTÍNEZ LOZANO y M. HERNÁNDEZ CÓRDOBA, *Anal. Chim. Acta*, **78**, 277 (1975).
27. F. SIERRA, C. SÁNCHEZ-PEDREÑO, T. PÉREZ RUIZ, C. MARTÍNEZ LOZANO y M. HERNÁNDEZ CÓRDOBA, *Anales de Química*, **72**, 538 (1976).
28. T. PÉREZ RUIZ, C. MARTÍNEZ LOZANO y J. OCHOTORENA, *Talanta*, **29**, 479 (1982).
29. M. SUN, T. MOORE y P. SONG, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1730 (1972).
30. P. SONG y T. MOORE, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6507 (1968).