

TRABAJOS DE REVISION

CATEDRA DE ANALISIS QUIMICO, BROMATOLOGIA Y
TOXICOLOGIA

Prof. Dr. RAFAEL GARCIA-VILLANOVA

APLICACIONES ANALITICAS DE LOS FENOMENOS DE FLUORESCENCIA

por

R. GARCIA-VILLANOVA (*)

Ars Pharm. XII, 271 (1971).

En 1570 se observa por vez primera el cambio de color de las radiaciones solares cuando atraviesan una disolución de clorofila y otros extractos del *LIGNUM NEPHRITICUM*

300 años, estas observaciones se consideran como simples fenómenos de dispersión.

Es hacia el año 1800 cuando los mineralogistas utilizan los fenómenos de fluorescencia para la detección de depósitos de minerales hasta el punto de que la "United States Geological Survey" calculó que un 10 por ciento de las 1.500 especies minerales conocidas pueden ser determinadas por fluorescencia, aunque el conocimiento de las tierras raras ha hecho que este porcentaje se eleve.

Stokes demostró en 1852 la unicidad del fenómeno ligado a la emisión de una radiación de longitud de onda mayor que la incidente. Como el espato de fluor manifiesta el fenómeno, Stokes lo denomina **FLUORESCENCIA**.

Los progresos realizados en el campo del análisis por fluorescencia han sido posibles gracias a una mayor y mejor comprensión del problema. El estudio de los niveles de excitación y su retorno al estado fundamental ha abierto un campo enorme para el conocimiento de numerosas especies fluorescentes. Un rápido progreso se hace actualmente en el campo de conocimientos de estructuras, configuraciones electrónicas, asignaciones de niveles energéticos y un volumen considerable del trabajo actual se realiza en medicamentos y sustancias organometálicas. Es evidente que un instrumental de alta calidad se

de estos principios básicos: monocromadores, detectores de alta sensibilidad, sistemas de registro, circuitos estables, etc. Es tal actualmente el desarrollo de los métodos fluorométricos que muchos espectrofotómetros están acondicionados para adaptarles un equipo fluorescente.

* * *

(*) Conferencia pronunciada en la Sesión plenaria del VIII Congreso Peruano de Química, Cuzco (Perú) en Octubre de 1968.

Antes de entrar en el tema netamente analítico parece oportuno recordar algunos

Existe una distinción entre los términos "estado electrónico" y "orbital electrónica", que se confunden con relativa frecuencia.

Un orbital se define como ese volumen del espacio en el que existe una alta probabilidad (99,9 %) de encontrar un electrón. El cálculo del orbital se hace por la función de onda que describe y se admite que es independiente del resto de los electrones de la molécula. Esta función de onda se calcula por la ecuación de SCHRÖDINGER, de resolución matemática muy difícil, aunque se ha aplicado con éxito a casos sencillos. SCHRÖDINGER se basó en las consideraciones de D'ALEMBERT y De BROGLIE.

Los estados electrónicos, por otra parte, están implicados con las propiedades de todos los electrones en todos los orbitales, lo que equivale a decir que la función de onda para un estado electrónico es una combinación de las funciones de onda de cada uno de los electrones en cada uno de los orbitales de la molécula. Cuando un electrón en una molécula se traslada de un orbital

de la molécula cambia y hay por consiguiente que considerar los estados de la molécula afectados por ese tránsito más bien que considerar solo los orbitales implicados en el cambio. La razón estriba en que las interacciones electrónicas son profundamente significativas y requieren una corrección al ser aplicadas a las energías de orbitales calculadas desde las simples funciones de onda de cada uno de los electrones.

Este concepto es aplicable para su comprensión al comportamiento del individuo cuando actúa con absoluta libertad, tal como él es, a cuando sus movimientos, ideas y actuaciones las realiza en el seno de una colectividad.

Los estados electrónicos de las moléculas orgánicas se pueden agrupar en dos categorías: estados *singuletes* y estados *tripletes*.

El estado singulete es aquel en el que todos los electrones de la molécula tienen sus spines apareados. El estado fundamental de la mayoría de las moléculas orgánicas serán estados singuletes.

Los estados tripletes son aquellos en los que un par de electrones de la molécula tiene sus spines desapareados, es decir, todos los electrones de la molécula, excepto dos, tienen los spines apareados.

Las nomenclaturas singulete y triplete se desprenden de múltiples consideraciones de la espectroscopia atómica. Los radicales libres, que contienen un electrón desapareado, no tienen un estado fundamental singulete, aunque bien pudiera ser el estado fundamental un doblete, ya que un spin está desapareado y el correspondiente estado superior del spin sería un cuadruplete por existir tres electrones con spines desapareados.

No obstante lo anterior, los estados de más importancia en las moléculas orgánicas son estados singulete y estados triplete.

El estado singulete excitado tiene segundos y la fluorescencia aparece con igual rapidez. La fosforescencia puede ser mucho más lenta y puede persistir algún tiempo después de finalizar la excitación. En ese caso, la fosforescencia será detectada visualmente pero cuando la fosforescencia es rápida del orden de 10^{-3} segundos, no podrá ser diferenciada por el ojo humano de la fluorescencia.

Clásicamente se considera a la fluorescencia como el fenómeno instantáneo y a la fosforescencia

La fluorescencia se define como la emisión de energía por una molécula ópticamente activa cuando retorna a su estado fundamental. La activación puede ser provocada por la absorción de luz de determinada longitud de onda capaz de excitar a la molécula a un estado electrónico singulete superior. La luz ultravioleta y visible son las fuentes más comunes de excitación. Al retornar la molécula a su estado fundamental emitirá un cuanto de luz fluorescente siendo ésta, como veremos,

La fosforescencia aparece cuando la pérdida de energía entre el estado excitado y el fundamental se hace lentamente. En ello está implicado el estado triplete o metastable y el fenómeno es observado más frecuentemente en moléculas orgánicas el estado metastable decae lentamente, la emisión de luz puede durar algún tiempo.

Recientemente se ha podido comprobar que muchos de los fenómenos, considerados como fluorescencia, al ser observados a la temperatura del aire líquido se ha confirmado que son netamente fosforescentes. Ello lleva a la conclusión de que la duración de la emisión fluorescente es independiente de la temperatura, mientras que en la fosforescencia, dicha duración disminuye con la elevación térmica. Esta es la causa de que los niveles energéticos de las moléculas se estudien a la temperatura del aire líquido y los niveles vibracionales reales se asignen a esa temperatura. Los líquidos adquieren entonces una forma y las pérdidas de energía por colisiones se reducen considerablemente.

Aún cuando la quimioluminiscencia se refiere a la emisión de luz como resultado de una reacción química y la fluorescencia de rayos X al fenómeno cuando la fuente de excitación es una radiación de esa longitud de onda, no suelen incluirse en este capítulo pese a que el fundamento sea similar al de la fluorometría, si bien el material difiere considerablemente.

* * *

La mecánica cuántica nos muestra que una molécula posee obligatoriamente una energía igual a uno de los valores $E_0, E_1, E_2,$ etc. de la serie cuántica de energías posibles.

Esta energía molecular es la suma de tres términos, principalmente, de origen diferente: la ENERGIA ELECTRONICA, la ENERGIA DE VIBRACION NUCLEAR y la ENERGIA DE ROTACION NUCLEAR.

Estas tres energías pueden, en cierto modo, ser tratadas independientemente:

$$E = E_e + E_v + (E_r + E_f + E_{hf}) \text{ donde } E_e, E_v, E_r, E_f \text{ y } E_{hf}$$

siendo los dos últimos términos la energía rotacional de estructura fina y de estructura hiperfina.

La primera se refiere a los grupos de líneas poco espaciadas que se observan en los espectros de los elementos más ligeros y es debida a que en los estados de momento angular no nulo (cuando el número cuántico orbital $l \neq 0$), el spin del electrón puede orientarse de dos maneras con respecto al campo magnético H producido por el movimiento del propio electrón y la energía suplementaria de interacción del momento magnético del electrón con dicho campo magnético puede sumarse o restarse a la que correspondería al nivel si no hubiera efecto magnético. Para un solo electrón, cada nivel de momento angular no nulo es en rigor dos niveles, o sea un doblete.

La estructura hiperfina se debe al desdoblamiento de las líneas espectrales debido al momento magnético del núcleo atómico, ya que los niveles atómicos son aún más numerosos desdoblados en subniveles más próximos. El núcleo tiene también su spin y su momento magnético al momento magnético angular del átomo dan lugar a un desdoblamiento de los niveles como hemos dicho en la estructura fina. No obstante, estas energías son muchísimo menores que las correspondientes a las energías de rotación y más aún de vibración.

Por consiguiente, para cada nivel electrónico, existen n niveles cuantificados de energía de vibración nuclear y para cada nivel de vibración, existen m niveles cuantificados de energía de rotación nuclear, los cuales permiten trazar un esquema de las principales energías cuantificadas correspondientes a dos estados electrónicos diferentes.

La excitación molecular requiere el tránsito ascensional de un electrón de una orbital a otra de más alta energía que la que ocupaba en su estado fundamental.

El camino más directo para la consecución de este estado excitado en la molécula es la absorción de un fotón de energía igual a la diferencia energética que separa a dos niveles cuantificados:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{por ser} \quad \lambda = cT \quad \text{y} \quad \nu = \frac{1}{T}$$

Como la absorción de una energía luminosa eleva el nivel energético desde el estado fundamental hasta un estado excitado m , por ejemplo, si la molécula es susceptible de quedar en el estado excitado unos 10^{-8} segundos, o sea, la duración media de una fluorescencia, sufrirá alrededor de 10^4 colisiones y la energía de vibración $n\text{Ev}$ se pierde esencialmente bajo la forma de calor. Cuando retorna al estado fundamental, la molécula puede conservar una cierta energía de vibración $n\text{Ev}$. Entonces, la energía emitida después de esta transición es inferior a la energía te la longitud de onda, todo ello de acuerdo con la ley de Stokes.

* * *

El estado de las moléculas orgánicas más frecuente y por tanto más familiar a los químicos

tado de mínima energía. Existe un solo estado fundamental para cada molécula mientras que son posibles diferentes estados de excitación para cada una de las moléculas. La exacta naturaleza de esos estados depende de los tipos particulares de orbitales involucrados.

Ahora bien, los estados de transición corresponden a estados vibracionales excitados, es decir, a moléculas en estado fundamental con una configuración forzada. Una *molécula excitada* hay que considerarla como una *entidad nueva*, remotamente relacionada con la misma al estado fundamental, una *distribución electrónica completamente diferente*, distinta disposición *geométrica o espacial* y es más que probable que origine reacciones químicas diferentes que las que daría lugar en su estado fundamental.

Esto mismo, ampliado al campo de la filosofía, nos confirmará la diferencia del comportamiento de un hombre en un estado de cólera y cuando actúa desapasionadamente. Por ello la justicia se aplica o debe aplicarse siguiendo el pensamiento socrático cuando el amo suspendió el látigo ante el esclavo diciendo: "te azotaría si no estuviese encolerizado...".

Un ejemplo está en la antraquinona, que disuelta en alcohol no tiene tendencia alguna para reaccionar en su estado fundamental, mientras que en el estado excitado, acepta un átomo de hidrógeno para dar semiquinona y más tarde pasa a dihidro oxidándose el alcohol simultáneamente al aldehído.

Como puede verse, en la *figura 1*, geoméricamente, la molécula del formaldehído puede considerarse en dos planos: uno de ellos contiene el átomo de carbono y los dos de hidrógeno y en el otro plano se sitúan el átomo de oxígeno y los dos de hidrógeno.

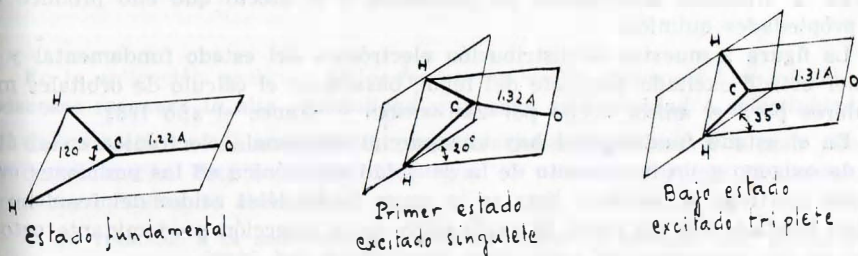


Fig. 1

En el estado fundamestal, estos dos planos coinciden y la molécula presenta una configuración planar. En el más bajo estado excitado singulete, el ángulo entre el plano H - C - H y el plano H - O - H es de 20° y la distancia del enlace C - O aumenta de $1,22$ a $1,32 \text{ \AA}$. En el más bajo estado triplete excitado, la longitud del enlace C - O es de $1,31 \text{ \AA}$ pero el ángulo que forman los dos planos H - C - H y H - O - H se incrementa a 35° .

Esto confirma que no sólo existen diferencias geométricas entre el estado fundamental y el excitado sino también entre el estado singulete y su correspondiente estado triplete.

Otro ejemplo bien expresivo de los cambios geométricos que origina la excitación se dá en el acetileno —Fig. 2—. En el estado fundamental, el acetileno es lineal, con una distancia de enlace C - H de $1,06 \text{ \AA}$ y $1,207 \text{ \AA}$ para el enlace

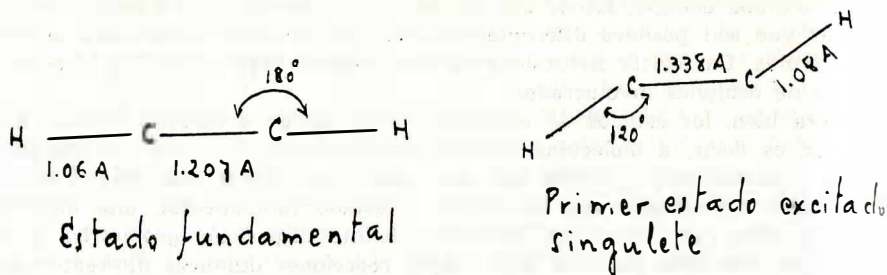


Fig. 2

C - C. En el primer estado excitado singulete, la distancia de enlace C - H cambia a 1,08 Å y el enlace C - C se incrementa a 1,333 Å. Ahora bien, la significación más notable es la del ángulo de enlace H - C - C que cambia de 180° a 120° en el estado excitado. Efectivamente, como era de esperar, el acetileno, después de la excitación sufre una rehibridación de orbitales sp a sp^2 y adopta una configuración de etileno con los átomos de hidrógeno en posición "trans". No obstante, aunque ello no ha sido todavía observado, es concebible encontrar un isómero "cis" del acetileno en el estado excitado, es decir, que una isomerización "cis-trans" pudiera haber entre ambas configuraciones geométricas como consecuencia de la excitación.

Otro cambio importante entre el estado fundamental y los estados excitados es la diferente distribución de electrones y el efecto que ello produce en las propiedades químicas.

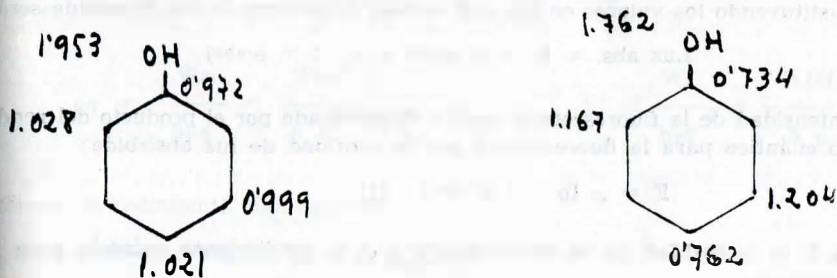
La figura 3 muestra la distribución electrónica del estado fundamental y el primer estado excitado singulete del fenol, basado en el cálculo de orbitales moleculares para el anisol hecho por ZIMMERMAN y SANDEL el año 1963.

En el estado fundamental hay una parcial deficiencia electrónica en el átomo de oxígeno y un incremento de la densidad electrónica en las posiciones *orto* y *para* relativas al benceno. Esta es la causa de la débil acidez del fenol en el estado fundamental así como la explicación de la dirección predominante *orto* y *para* en las reacciones de sustitución electrofílica del fenol.

Si se compara la distribución electrónica del estado fundamental con la del primer estado excitado singulete se aprecia una notable diferencia. El átomo de oxígeno tiene una considerable densidad electrónica más baja en el estado excitado como consecuencia de una parcial traslación del electrón del átomo de oxígeno al anillo, una densidad electrónica mayor en las posiciones *orto* y *meta* y por estado fundamental.

Estas consideraciones nos llevan a la conclusión de que el fenol es un ácido más fuerte en el estado excitado debido al decrecimiento de la densidad electrónica en el átomo de oxígeno y una mayor dificultad para retener el protón.

Todo esto constantes de disociación de los diferentes fenoles expuestas al pie de la figura. Se ve que de ácidos muy débiles del orden del ácido bórico, pasan a ácidos simplemente débiles del orden del acético.



Estado fundamental

Primer estado
excitado singulete

	<u>pKa</u>	<u>pKa*</u>
Fenol	— 10'02	— 5'7
α -Naftol	— 9'23	— 2'0
β -Naftol	— 9'46	— 2'5
p-Cresol	— 9'38	— 3'6

Fig. 3

En la aplicación analítica de los fenómenos de fluorescencia han influido dos poderosas razones: la alta

Con relación a la sensibilidad, concentraciones inferiores a 1 ppm pueden ser determinadas. Esta sensibilidad es unas 10 veces mayor que la conseguida con otros métodos de absorción.

Y en relación a la selectividad, como la radiación elegida sólo puede excitar a un limitado número de sustancias, estas serán observadas y determinadas con esa longitud de onda y reducir considerablemente las interferencias.

Una adecuación de la Ley de Lambert-Bouguer-Beer ha tenido que ser realizada para medir cuantitativamente la intensidad de la fluorescencia y deducir la concentración de la sustancia con fines analíticos.

La luz absorbida por una disolución será la diferencia entre la intensidad de la luz incidente I_0 y la intensidad de la luz transmitida I :

$$\text{Luz abs.} = I_0 - I$$

De acuerdo con la Ley de Lambert-Bouguer-Beer

$$I = I_0 e^{-abc}$$

donde a es el coeficiente de absorción, b el espesor de la célula y c la concentración.

Sustituyendo los valores en las expresiones anteriores, la luz absorbida será:

$$\text{Luz abs.} = I_0 - I_0 e^{-abc} = I_0 (1 - e^{-abc})$$

y la intensidad de la fluorescencia vendrá determinada por el producto del rendimiento cuántico para la fluorescencia por la cantidad de luz absorbida:

$$F = \varphi I_0 (1 - e^{-abc}) \quad (1)$$

siendo F la intensidad de la fluorescencia y φ el rendimiento cuántico para la fluorescencia.

La reabsorción, dispersión y disipación de la luz se ha despreciado en la ecuación anterior.

Como una expresión exponencial e^{-abc} es equivalente a una serie de formas siguientes,

$$e^{-abc} = 1 - abc + \frac{(abc)^2}{2} - \frac{(abc)^3}{6} + \frac{(abc)^4}{24} - \frac{(abc)^5}{120} \dots \frac{(abc)^n}{n!}$$

siendo el producto abc pequeño, se pueden despreciar los términos fraccionarios, cada vez más pequeños, como se vé, siendo aproximadamente

$$e^{-abc} = 1 - abc$$

y sustituyendo este valor en la ecuación (1)

$$F = \varphi I_0 (1 - 1 + abc) = \varphi I_0 abc$$

y para un aparato determinado, unas condiciones experimentales determinadas un compuesto y disolvente fijos, etc., el producto $I_0 abc$ será constante y entonces

$$F = K \cdot c$$

siendo la fluorescencia proporcional a la concentración.

El rendimiento cuántico φ estará determinado por la relación entre los cuántos de fluorescencia emitidos y los absorbidos.

Cuando la relación vale 1, el rendimiento corresponde a un proceso de eficacia perfecta donde todas las moléculas excitadas emiten en forma de fluorescencia su energía de excitación.

Si W_a es la energía absorbida y W_f la energía radiactiva (fluorescencia), el rendimiento energético será:

$$\rho = \frac{W_f}{W_a}$$

Si se expresan las energías W_a y W_f en números de cuántos,

$$p_a = \frac{W_a}{h\nu_a} = \frac{W_a\lambda}{h c}; \quad P_f = \frac{W_f}{h\nu_f} = \frac{W_f\lambda_f}{h c}$$

entonces en rendimiento cuántico será

$$\varphi = \frac{P_f}{P_a} = \frac{W_f\lambda_f / h c}{W_a\lambda / h c} = \varphi \frac{\lambda_f}{\lambda}$$

lo que indica que el rendimiento cuántico es proporcional al rendimiento energético y a la longitud de onda para todas aquellas radiaciones que satisfagan la Ley de Stokes.

Para un valor constante de I_0 , la intensidad de fluorescencia es proporcional a ϵ (coeficiente de extinción molecular). El espectro de excitación corresponde por tanto al espectro de absorción.

Vemos por consiguiente que en condiciones determinadas, la intensidad de la fluorescencia

No obstante, otros factores, como veremos, pueden modificar la intensidad de la fluorescencia y no ser por tanto función lineal de la concentración.

Estos factores pueden resumirse así:

- a) Influencia de la concentración sobre el rendimiento cuántico.
- b) Inhibición.
- c) Autoinhibición.
- d) Fotodescomposición, y
- e) Efectos de filtro interno.

En cuanto al primero, la elevación de la concentración disminuye el rendimiento en fluorescencia debido a que la probabilidad de desactivación sin emisión radiactiva aumentará con el número de choques que se producirán entre dos moléculas. Esta desactivación es correlativa a una disminución de la duración media de la emisión, o sea, un descenso en el valor de γ .

La auto-inhibición puede incluirse en este proceso y la explicación del fenómeno está basado en dos teorías principales:

VAVILOFF y PERRIN se fundan en la existencia de colisiones de segundo orden en razón de la alta probabilidad de interacción entre las moléculas de la misma categoría.

En favor de esta teoría está el hecho de la existencia de un paralelismo entre la disminución de φ (rendimiento cuántico) y γ (duración de la vida media) cuando la concentración aumenta.

Una segunda teoría propuesta por RABINOVITCH, invoca la formación de dímeros o de polímeros no fluorescentes.

Se basa en que la existencia de polímeros cambia continuamente el espectro de absorción de numerosos colorantes cuando la concentración se eleva.

Otro factor, quizá el de mayor importancia, sea la inhibición, designándose con este término a todo proceso que reduzca el rendimiento de la fluorescencia verdadera por debajo de 1.

Este rendimiento se puede expresar en función de la velocidad de los procesos que se describen, según la expresión:

$$\varphi = \frac{K_f}{K_f + K_o + K_t + K [Q]}$$

donde K_f = constante de velocidad del proceso de fluorescencia

K_o = constante de velocidad del proceso global de todos los procesos de inhibición interna

K_t = constante de velocidad del estado triplete

$K [Q]$ = constante de velocidad de inhibición colisional

y para una concentración nula en inhibidor $[Q] = 0$

$$\varphi = \frac{K_f}{K_f + K_o + K_t}$$

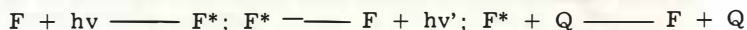
y la relación de las intensidades de la fluorescencia en presencia y en ausencia de inhibidor estará dada por la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{\varphi_0}{\varphi} - 1 = K [Q]$$

siendo φ_0 la intensidad de la fluorescencia en ausencia de inhibidor, φ la intensidad de la fluorescencia a concentración $[Q]$ del inhibidor y K la constante de proporcionalidad.

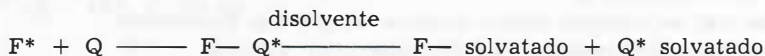
La transferencia de energía en la inhibición colisional es un proceso bimolecular dependiente del contacto entre la molécula excitada y el inhibidor. Se trata de un proceso de difusión controlada, requiriendo que el tiempo de vida del estado excitado envuelto sea mayor de 10^{-9} segundos.

El mecanismo puede esquematizarse así:

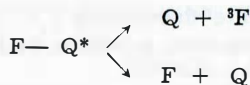


La molécula fluorescente F absorbe un fotón y queda excitada como F^* en el más bajo nivel excitado singulete. F^* puede emitir un fotón $h\nu'$ y retornar al estado fundamental o puede actuar recíprocamente con una molécula del inhibidor Q , perdiendo por tanto la energía de excitación y retornar al estado fundamental sin emisión de fluorescencia.

El mecanismo de inhibición por transferencia electrónica es relativamente nuevo y extremadamente interesante. Se puede resumir así:



o bien



La molécula fluorescente excitada F^* reacciona con el inhibidor aceptando un electrón de ella y originando una pareja de iones $F - Q^*$.

Este par triplete 3F e inhibidor o simplemente volver al estado fundamental disipando la energía de excitación en forma de calor.

La transferencia de energía no colisional se produce cuando existe alguna distancia como 50-100 Å entre el donador y el aceptor, según el esquema:



El donador D , absorbe radiación y va al estado excitado D , transfiere su energía a A^* y A pasa al estado fundamental emitiendo un fotón $h\nu$ o perdiendo su energía con producción de calor.

Otra disminución del rendimiento en fluorescencia puede ser debida a la fotodescomposición, ya que una parte de la energía absorbida entraña la fotodescomposición de uno de los constituyentes.

La velocidad de fotodescomposición R , es proporcional a la energía de la luz incidente según la expresión:

$$R = \varphi I_0 e C d$$

siendo φ el rendimiento cuántico, e el coeficiente de extinción molecular, C la concentración y d el espesor.

Finalmente el efecto del filtro interno. Este no tiene influencia en el proceso primario de la emisión pero reduce la intensidad de la fluorescencia observada, bien sea por la absorción de la luz de excitación o bien por la de emisión. Cuando las disoluciones absorben fuertemente la luz, la fluorescencia se concentra en la superficie o cara de entrada de la cubeta y entonces, el fotomultiplicador recibe poca o ninguna luz. Es por tanto un proceso distinto del de la inhibición ya expuesto.

Como ejemplo de aplicaciones se pueden citar:

- el aluminio con 8-hidroxiquinoleína fluorescente a 520 mμ;
- el cadmio con 2-orto hidroxifenil benzosazol. Interfiere el $Cu(II)$;
- los cianuros con cloramina T dan cloruro de cianógeno y con nicotinamida forman un compuesto con fluorescencia azul en medio alcalino;

- el estaño (IV) con hidroxiflavona se excita a 400 m μ y fluoresce a 470 m μ ;
- el estaño (II) se combina con el ácido 7-amino, 3 nitro, 1-naftalen sulfónico;
- el talio con Rodamina B;
- magnesio con salicilideno-etileno-diamina en dimetil formamida.
- alcaloides (atropina, morfina, codeína, reserpina, quinina);
- aminoácidos: Los aromáticos presentan fluorescencia propia, sobre todo la tirosina a pH=8 y el triptófano a pH=5. Esta fluorescencia es 100 veces mayor que en la tirosina.
- Vitaminas del grupo B como la B₁, B₂ (directamente fluorescente), PP, B₆. También las liposolubles como la A debido a su estructura poliénica, la vitamina E.
- Medicamentos: Atebrina, tetraciclina (previa degradación a isoclortetraciclina), fenotiazidas, imipramina.
- Corticoesteroides, ácidos biliares, progesterona, colesterol, etc.