



Universidade de Santiago de Compostela

Máster Universitario en Investigación Química e Química Industrial

**ESTUDO DE METABOLISMO *IN VITRO* DA
1,3-DIFENILGUANIDINA E
DA 1,3-DI-O-TOLILGUANIDINA**

Por

María Lage Díaz

Dirixido polos titores

José Benito Quintana Álvarez e Rosa María Montes Goyanes

Instituto de Investigación en Análises Químicas e Biolóxicas (IAQBUS)

Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía

SANTIAGO DE COMPOSTELA, 2023

ÍNDICE

1. RESUMO.....	3
2. OBXECTIVOS.....	4
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. Compostos de estudo : 1,3-difenilguanidina e 1,3-di-o-tolilguanidina.....	5
3.2. Presenza no medio.....	5
3.3. Presenza en mostras biolóxicas de orixe humana	6
3.4. Biomonitoraxe humana	7
3.5. Metabolismo humano.....	8
3.5.1. Fases do metabolismo	8
3.5.2. Excreción	11
3.6. Metabolismo da 1,3-difenilguanidina e da 1,3-di-o-tolilguanidina.....	12
3.7. Metabolismo <i>in vitro</i>	13
3.8. Cromatografía líquida hibridada con espectrometría de masas en tándem de alta resolución en estudos de análise cualitativo.....	15
3.8.1. Principios da técnica	15
3.8.2. Estudos de cribado	18
3.8.3. Modos de adquisición de datos	18
3.8.4. Modos de busca.....	19
3.8.5. Niveis de confirmación	20
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	22
4.1. Materiais.....	22
4.1.1. Ensaíos de metabolismo <i>in vitro</i>	22
4.1.2. Preparación de mostra de urina.....	22
4.1.3. Material de uso xeral.....	22
4.2. Reactivos e patróns.....	22
4.2.1. Reactivos dos ensaios de metabolismo <i>in vitro</i>	22
4.2.2. Reactivos para a preparación de mostra e a análise.....	23
4.3. Metodoloxía da recreación do metabolismo <i>in vitro</i>	23
4.3.1. Metabolismo de Fase I.....	23

4.3.2.	Metabolismo de Fase I + Fase II.....	24
4.3.3.	Metabolismo de Fase II.....	24
4.4.	Metodoloxía de análise de mostras de urina	25
4.4.1.	Preparación das mostras individuais de urina.....	25
4.4.2.	Preparación dos mostras compostas de urina.....	25
4.4.3.	Inxección directa das mostras tras dilución	26
4.4.4.	Extracción en fase sólida	26
4.5.	Instrumentación.....	27
4.6.	Condicións instrumentais de medida.....	27
4.7.	Tratamento de datos	28
4.7.1.	Tratamento de datos do metabolismo <i>in vitro</i>	28
4.7.2.	Tratamento de datos das mostras de urina	29
5.	RESULTADOS E DISCUSIÓN	30
5.1.	Lista de posibles metabolitos formados	30
5.2.	Metabolitos identificados nos ensaios <i>in vitro</i>	30
5.2.1.	Metabolitos dos ensaios <i>in vitro</i> da 1,3-difenilguanidina	30
5.2.2.	Metabolitos dos ensaios <i>in vitro</i> da 1,3-di-o-tolilguanidina	35
5.2.3.	Rutas de biotransformación metabólica da 1,3-difenilguanidina e da 1,3-di-o-tolilguanidina.....	42
5.3.	Metabolitos identificados <i>in vivo</i>	44
6.	CONCLUSIÓN.....	46
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	47
	ANEXOS	A1

1. RESUMO

Galego

A 1,3-difenilguanidina e a 1,3-di-o-tolilguanidina son dous aceleradores da vulcanización, utilizados como reactivos na industria do caucho, potencialmente prexudiciais para a vida acuática e a saúde humana. Debido a que son substancias persistentes e móbiles poden acadar con certa facilidade a auga de consumo e supor un potencial perigo para a saúde humana pola exposición ás mesmas. A biomonitoraxe humana é unha ferramenta interesante á hora de estimar a exposición a estas substancias e así poder aplicar as medidas adecuadas para a protección da nosa saúde, pero require coñecer o metabolismo das mesmas.

O obxectivo do traballo é identificar os metabolitos formados tras a exposición a estas substancias a través da realización de experimentos *in vitro* e da análise mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución co fin de empregar estes metabolitos como biomarcadores en futuros estudos de biomonitoraxe humana.

Conseguíronse identificar 13 posibles metabolitos nos experimentos *in vitro* e un deles foi detectado en mostras de urina.

English

1,3-diphenylguanidine and 1,3-di-o-tolylguanidine are two vulcanisation accelerators, commonly used in rubber industry, that are potentially hazardous to aquatic life and human health. Because they are persistent and mobile substances, they can easily enter drinking water and pose a potential hazard to human health through exposure. Human biomonitoring is an interesting tool for estimating exposure to these substances allowing the application of appropriate measures to protect our health, but requires having an appropriate knowledge of their metabolism.

The aim of this work is to identify the metabolites formed after exposure to these substances through *in vitro* experiments and analysis by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry in order to use these metabolites as biomarkers in future human biomonitoring studies.

Thirteen potential metabolites were identified through *in vitro* experiments, one of them being detected in urine samples.

2. OBXECTIVOS

O principal obxectivo deste Traballo Fin de Máster foi a determinación dos metabolitos formados *in vitro* a partir da 1,3-difenilguanidina e da 1,3-di-o-tolilguanidina. A finalidade era obter un grupo de novos biomarcadores para o seu futuro uso en estudos de biomonitoraxe humana.

Para acadar este obxectivo desenvolvéronse as seguintes actividades:

- Creación dunha lista de posibles metabolitos a través do emprego de ferramentas *in silico* e a busca bibliográfica.
- Recreación do metabolismo *in vitro* das substancias de estudo.
- Análise instrumental mediante o emprego de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.
- Tratamento de datos mediante abordaxe de tipo *Suspect Screening*.
- Análise de mostras de ouriños.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Compostos de estudo : 1,3-difenilguanidina e 1,3-di-o-tolilguanidina

A 1,3-difenilguanidina (DPG) e a 1,3-di-o-tolilguanidina (DTG) (Figura 1) son compostos amplamente utilizados nos procesos industriais. Tanto a DPG como a DTG atópanse en polímeros e empréganse como aceleradores da vulcanización, unha etapa fundamental no proceso de fabricación do caucho. Así pois, o nivel de produción ou compra destes produtos na área Económica Europea sitúase no rango das 10.000 ás 100.000 toneladas anuais para a DPG mentres que a DTG sitúase no rango das 10 ás 100 toneladas anuais, o que deriva na potencial emisión de grandes cantidades destes compostos ao medio.

O gran uso destas substancias contrasta coa información aportada pola Axencia Europea de Substancias e Mesturas Químicas que indica que estas substancias son prexudiciais para a vida acuática producindo efectos adversos de longa duración, son tóxicas se se inxiren e, ademais, sospéitase que a DPG é tóxica para a reprodución (1, 2).

Malia o potencial perigo que supoñen estas substancias, ata o de agora non se dispón de suficiente información sobre a súa migración no medio nin, polo tanto, do grado de exposición ao que estamos suxeitos.

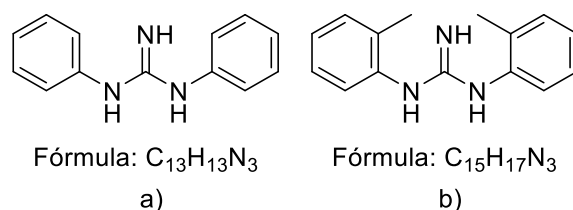


Figura 1. Estrutura e fórmula dos compostos de estudo: a) 1,3-difenilguanidina e b) 1,3-di-o-tolilguanidina.

3.2. Presenza no medio

As substancias persistentes e móbiles supoñen un potencial perigo para a saúde e o medio natural debido á súa baixa tendencia a quedar adheridas nos solos ou sedimentos. Así pois, en ciclos de auga (semi)pechados, este comportamento pode derivar na acumulación destas substancias na fase acuosa cando se emiten en grandes cantidades, ameazando os organismos acuáticos, a calidade dos aquíferos e incluso da auga potable (3). Neste sentido, os contaminantes que teñen maior probabilidade de afectar a auga de consumo son aqueles que son o suficientemente móbiles como para acadar as reservas de auga potable e o suficientemente persistentes como para permanecer nas mesmas tras os tratamentos habituais

(4). A DPG e a DTG encóntranse neste grupo de substancias persistentes e móbiles polo que é preciso prestarlles especial atención.

Como se comentou, malia o potencial perigo que poden supor para o medio a DPG e a DTG, son escasos os artigos que estudan a súa presenza no mesmo. Zahn et al. (5) publicaron un traballo onde se estuda a presenza da DPG (entre outros compostos) en 25 mostras de augas superficiais alemás, sendo detectada en todas elas. Ademais, neste estudo leváronse a cabo probas de lixiviación con pneumáticos que suxiren que o seu desgaste é unha fonte importante deste composto. A principios de 2019 publicouse un estudo no que se analizaron 14 mostras de auga de diferentes fontes (auga superficial, auga subterránea, auga filtrada e auga potable dunha planta de produción) de 3 países de Europa. Tanto a DPG como a DTG foron detectados nas 14 mostras cunha concentración aproximada de 100 ng/L e 10 ng/L respectivamente (3). Noutro estudo dese mesmo ano levado a cabo por Montes et al. (6) analizáronse diversos compostos persistentes e móbiles (incluídas a DPG e a DTG) en mostras de auga superficial e potable de diferentes puntos de Galicia. A DPG foi detectada en 7 das 15 mostras mentres que a DTG observouse en 2 delas. A concentración da DPG foi superior en todas as mostras, chegando a existir unha diferenza dun factor de 20 entre as concentracións dos dous aceleradores da vulcanización.

Emporiso, non soamente se detectaron estes compostos en auga. Recentemente publicouse un estudo sobre a súa presenza no po de ambientes interiores. Estudáronse 332 mostras de po de 11 países de América, Asia e Europa, observando a presenza da DPG no 100% das mostras cunha concentración media de 140 ng/g, namentres que a DTG foi detectada no 62% delas nunha concentración media de 2,3 ng/g (7).

Á vista destes estudos, existe un perigo potencial para a nosa saúde debido á exposición a estas substancias a través de diferentes rutas como a inxestión e a inhalación.

3.3. Presenza en mostras biolóxicas de orixe humana

Tendo en conta a gran presenza destas substancias no medio, cabe analizar se estas están tamén presentes en mostras biolóxicas de orixe humana. Con todo, ata o de agora é un campo moi pouco estudado.

Son escasos os artigos que reportan o estudo destas substancias en mostras humanas. Un traballo publicado en 2021 estudou a presenza de DPG en 10 mostras de soro sanguíneo e 9 de placenta de mulleres que se atopaban de parto no período de estudo en Barcelona, España.

Concluiron que a DPG estaba presente no 70% das mostras de soro nunha concentración máxima de 28 ng/mL mentres que non se atopou en ningunha das mostras de placenta (8).

Un traballo similar foi publicado en 2022. Neste caso estudouse a presenza tanto da DPG como da DTG e analizouse o soro sanguíneo materno e do cordón umbilical de 109 mulleres que se atopaban de parto no período de estudo en China. Namentres que a DTG non foi detectada, a DPG estaba presente no 90 % das mostras de soro materno e no 80 % das mostras de soro do cordón umbilical nunha concentración media de 1,7 ng/mL e 0,35 ng/mL respectivamente (9).

Por último, recentemente, en xuño de 2023 publicouse un artigo de grande interese para este traballo. Estudouse a presenza de DPG e DTG en mostras de urina de 15 nenos e 20 adultos de Nova York. Detectaron DPG no 73% das mostras infantís nunha concentración media de 0,05 ng/mL e no 20 % das adultas nunha concentración máxima de 0,79 ng/mL. Ademais, a DTG foi detectada no 13% das mostras infantís cunha concentración máxima de 0,54 ng/mL e no 5% das mostras de adultos cunha concentración máxima de 0,04 ng/mL (10).

Estes datos son indicativos de que existe exposición a estas dúas sustancias, mais precísanse estudos máis detallados, que consideren ademais o seu metabolismo, como se discute nas seccións seguintes.

3.4. Biomonitoraxe humana

A exposición a contaminantes prodúcese a través de diferentes rutas como a inhalación, a ingestión ou a absorción dérmica. A cantidade de carga dun contaminante no corpo depende de diversos factores como a cantidade á que está exposto o individuo, o seu metabolismo, as propiedades físico-químicas do contaminante, etc. A biomonitoraxe humana (BMH) ten en conta todos estes factores ao medir a concentración dun contaminante en matrices biolóxicas, podendo definila como o método para avaliar a exposición humana a sustancias químicas ou aos seus efectos medindo estes produtos, os seus metabolitos ou os produtos de reacción en mostras humanas (11).

Unha vez o contaminante foi absorbido no corpo este pode excretarse sen transformación algunha, excretarse tras a súa metabolización ou quedar almacenado en diversos tecidos ou órganos. Así pois, dependendo da natureza de cada contaminante empregaranse unhas matrices biolóxicas ou outras para a BMH. Entre as posibles matrices de estudo atópanse o sangue, a urina, a saliva, o leite materno, a suor, as feces, o pelo, os dentes ou as unllas.

Entre as matrices citadas, a urina é de fácil obtención debido a que é unha mostra non invasiva. Trátase dunha matriz especialmente útil para compostos que se metabolizan e excretan rapidamente, como os de interese neste traballo. Con todo, tamén ten certos inconvenientes como a variabilidade nas taxas de excreción urinaria entre individuos, a variabilidade temporal da urina para cada individuo e a necesidade de coñecer cales son os produtos de excreción na mesma.

Os datos que reporta a BMH son, moitas veces, os máis interesantes á hora de avaliar o impacto na saúde xa que reflicten a variación segundo o modo de exposición, o grado de exposición individual, o metabolismo ou a velocidade de excreción. Reporta para cada contaminante tendencias temporais e espaciais, grupos en risco, etc. Así, a BMH é unha ferramenta clave á hora de formular políticas de protección da saúde xa que proporciona información cuantitativa sobre a exposición real da poboación aos contaminantes ambientais e as consecuencias que estes poden ter na saúde (11).

3.5. Metabolismo humano

Coa fin de poder determinar cales son os produtos de excreción a identificar na urina como matriz de interese para a BMH, débense estudar os procesos que teñen lugar durante o metabolismo humano.

O metabolismo é o proceso de transformación dunhas substancias noutras a través da actuación das encimas. O seu principal obxectivo é eliminar certas moléculas endóxenas e exóxenas do corpo volvéndoas máis hidrofílicas (máis polares). Os produtos formados tras o metabolismo denomínanse metabolitos e fórmanse principalmente no fígado aínda que algún tecido extrahepático como os riles ou a mucosa intestinal xogan tamén un papel importante (12). O proceso de transformación dun composto xenobiótico (substancia que non se atopa de forma natural no organismo) nos correspondentes metabolitos abrangue diversas fases, as cales se discuten a continuación.

3.5.1. Fases do metabolismo

Normalmente o metabolismo divídese en dúas fases, a Fase I (ou reaccións de funcionalización) e a Fase II (ou reaccións conxugativas). Tamén se postulou a existencia dunha terceira fase (Fase III) na que os produtos da Fase II serían transformados pola microflora intestinal e posteriormente reabsorbidos e metabolizados (13). No transcurso deste traballo tivéronse en conta as dúas primeiras (e principais) fases.

○ *Metabolismo de Fase I*

No metabolismo de Fase I prodúcense reaccións de oxidación, redución e hidrólise que introducen ou desprotexen grupos funcionais (-OH, -NH₂, -SH) susceptibles de sufrir posteriormente unha conxugación. Estas reaccións están principalmente mediadas pola actuación das encimas da superfamilia do citocromo P450 (CYP 450) dos microsomas das células hepáticas.

• *Reaccións de oxidación.*

Existen varios subtipos de oxidación pero, de forma xeral, esta consiste na adición dun ou máis átomos de osíxeno á molécula segundo se representa na Figura 2, onde o NADPH é o cofactor nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato, RH é unha molécula susceptible de ser oxidada e ROH é a molécula oxidada (14).



Figura 2. Reacción xeral de oxidación que ten lugar durante a Fase I do metabolismo.

• *Reaccións de redución.*

Son outra ruta importante de reaccións para o metabolismo de Fase I. Estas reaccións están acopladas a un sistema encimático secundario como a redutasa NADH citocromo-b5 ou a redutasa NADPH citocromo-c. Tamén interveñen algunhas encimas do CYP 450, en especial no caso da metabolización de compostos aromáticos con grupos nitro, nitroso, azo e N-óxido (Figura 3) (14).

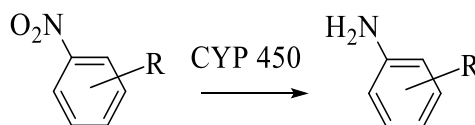


Figura 3. Exemplo de redución levada a cabo no metabolismo de Fase I.

• *Reaccións de hidrólise.*

Nestas reaccións tamén interveñen as encimas do CYP 450. Este tipo de reaccións son especialmente relevantes no caso de ésteres e amidas (Figura 4) (14).

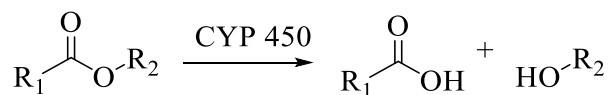


Figura 4. Exemplo de hidrólise producida debido ao metabolismo de Fase I.

○ **Metabolismo de Fase II**

No metabolismo de Fase II os compostos xenobióticos ou os metabolitos formados na Fase I son conxugados con moléculas endóxeas hidrofílicas grazas ao papel das transferasas. Algunhas das reaccións máis importantes que teñen lugar son a glucuronidación e a sulfatación.

○ *Glucuronidación.*

É a ruta metabólica maioritaria en Fase II, sendo a ruta seguida por entre o 40 e o 70% dos compostos endóxeos e exóxeos metabolizados. Esta transformación prodúcese pola reacción do composto co ácido uridina difosfato glucurónico (UDPGA) que se forma tras a reacción da glucosa-1 fosfato co trifosfato de uridina. A uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasa (UGT), que se atopa no retículo endoplasmático das células do fígado, facilita a unión da UDPGA co composto para dar un metabolito glucuronizado (Figura 5) (14, 15).

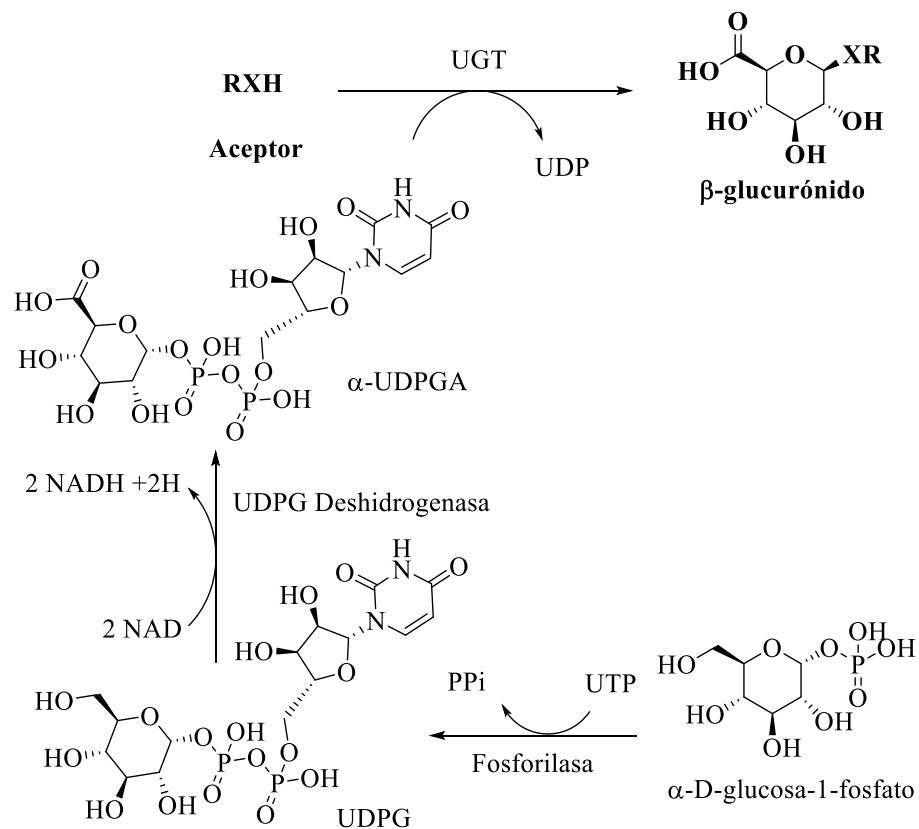


Figura 5. Reacción xeral de glucuronidación.

○ *Sulfatación.*

Estas reaccións están mediadas por unha superfamilia denominada sulfotransferasas que catalizan a transferencia dun grupo sulfato da 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato (PAPS) cara o grupo hidroxilo ou amino da molécula aceptora. Existen dous grandes grupos de sulfotransferasas. O primeiro dos grupos está constituído por encimas unidas á membrana localizadas no aparato de Golgi e encárganse do metabolismo de moléculas endóxeas como proteínas, lípidos, etc. O segundo dos grupos está constituído polas sulfotransferasas localizadas no citosol (Figura 6) e xogan un papel importante tanto na conxugación de compostos endóxeos como en xenobióticos (15).

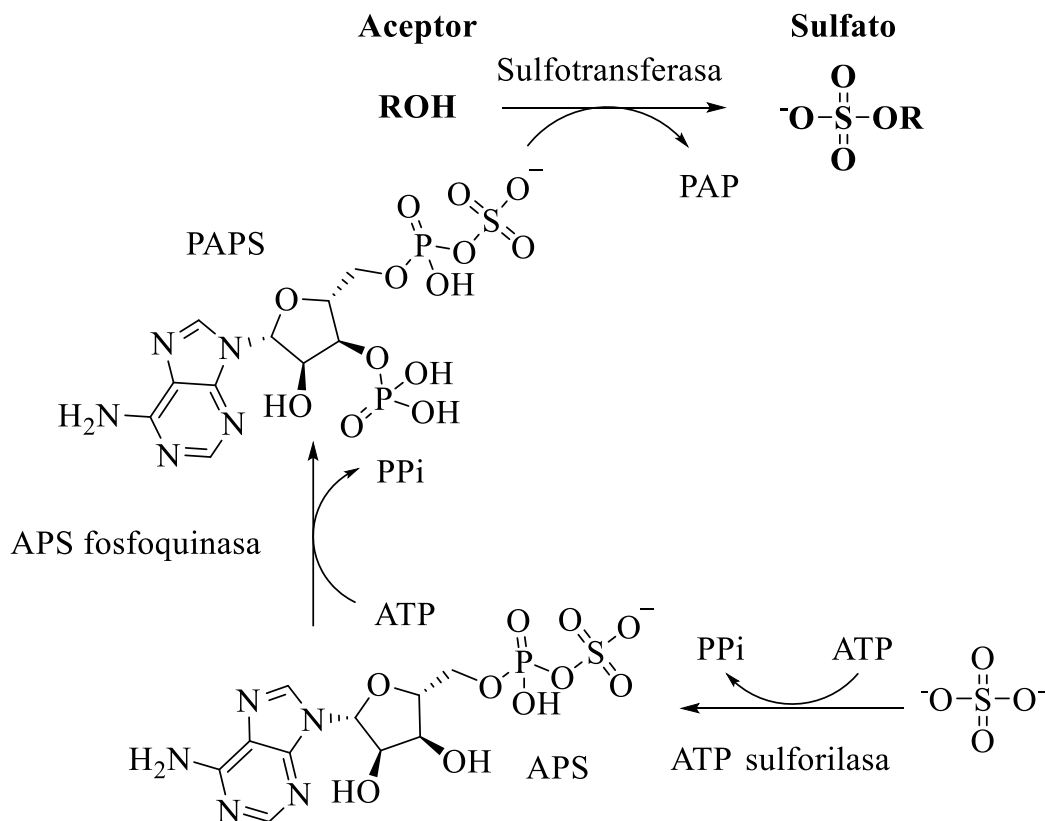


Figura 6. Reacción xeral de sulfatación.

3.5.2. Excreción

A excreción é o proceso de expulsión dos xenobióticos do corpo sen transformar ou como metabolitos. Existen moitas rutas de excreción como a urina, a bile, o leite ou as feces entre outros. Así pois, varios órganos están implicados na excreción entre os que sobresaen os riles e o fígado (16).

○ Excreción renal

A excreción renal vai a permitir a eliminación dos xenobióticos a través da urina. A urina fórmase debido á transferencia de auga e substancias de refugallo dende o sangue cara os túbulos colectores de urina dos riles. Esta transferencia pode producirse pola denominada filtración glomerular onde a auga e os xenobióticos ou os seus metabolitos que teñen pouca afinidade polo plasma, son filtrados cara estes túbulos a través duns capilares denominados glomérulos. Ademais deste mecanismo tamén é posible que as substancias sexan transferidas a través do transporte activo dende o sangue cara os túbulos a través das células situadas na parede tubular. Existe un primeiro sistema que transporta ácidos débiles e un segundo que transporta bases cara os túbulos. Este proceso non é selectivo polo que as substancias coa mesma carga compiten polo transporte. Este transporte vese moi afectado polo pH da urina xa que este vai modificar a forma iónica das substancias dando lugar ou a un aumento da excreción renal ou, pola contra, a un aumento do grado de reabsorción cara o sangue (12).

○ Excreción biliar

O fígado ten mecanismos de transporte activo que, de forma xeral, permite a excreción de metabolitos ionizados cun peso molecular superior a 300 Da cara a bile, dende onde alcanzan o tracto dixestivo e poden ser eliminados a través das feces ou poden ser reabsorbidos. A reabsorción prodúcese tras sufrir o metabolito unha hidrólise no intestino dando lugar á súa reabsorción cara a bile e podendo sufrir este varios ciclos de excreción biliar e reabsorción (ciclo enterohepático). Soe ser común que finalmente o metabolito sexa excretado por vía urinaria malia haber estado sometido a varios destes ciclos (12, 17).

3.6. Metabolismo da 1,3-difenilguanidina e da 1,3-di-o-tolilguanidina

Ata o de agora, a única información relativa ao metabolismo da DPG ou da DTG é a proporcionada para o DPG nun estudo levado a cabo en 1984 por Ioannou e Matthews (18). Nese momento varios científicos alertaran xa do potencial problema que podía supor esta substancia para a saúde humana, polo que o obxectivo do estudo era obter información básica sobre o metabolismo da DPG para futuros estudos toxicolóxicos.

O estudo levouse a cabo en ratas ás que se lles administrou de forma oral e intravenosa DPG. Co seu traballo observaron que a absorción da DPG non se ve afectada polo modo de

administración ou da concentración administrada. Ademais, o 99% da DPG administrada foi expulsada a través da urina e as feces aos 3 días da exposición.

Tras o análise da urina ás 24 horas concluíron que a metabolización da DPG daba lugar a dous metabolitos maioritarios (MET1 nun 37% e MET2 nun 32%), un deles un glucurónido (MET 1) e un metabolito minoritario (MET3 nun 3%) que se corresponde coa versión desconxugada do MET1. Pola súa banda, ao analizar a bile ás 6 horas observouse de forma moi maioritaria (95%) o MET1 e unha pequena cantidade dun cuarto metabolito (MET4). Finalmente, tras analizar as feces ás 24 horas detectaron de forma maioritaria esta vez o (MET3, 94%) e de forma anecdótica (2%) un quinto metabolito, MET5.

Co seu estudo demostraron a fácil absorción e distribución da DPG polos diferentes tecidos en ratas, a súa metabolización en tres metabolitos maioritarios e dous minoritarios e a súa excreción na urina e nas feces. Con todo, non se conseguiu determinar a estrutura ou fórmula molecular dos metabolitos observados.

3.7. Metabolismo *in vitro*

O emprego de suxeitos humanos para o estudo do metabolismo dunha substancia semella ideal. Con todo, os riscos que isto supón e a regulación existente fano practicamente imposible ademais de custoso e lento. Por outra banda, os estudos con animais supoñen un desafío para a súa correlación cos procesos que teñen lugar no ser humano e o Centro Europeo para a Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) promove o emprego de métodos que permitan reducir ou desprazar o uso de animais de laboratorio (19).

Así, os estudos de metabolismo *in vitro*, que permiten recrear e comprender os procesos que teñen lugar *in vivo*, despuntan como unha alternativa con importantes vantaxes como a facilidade de almacenamento e emprego, o custe, etc. (20). A ruta metabólica dun composto xenobiótico desenvólvese maioritariamente no fígado, por iso existen diversas tecnoloxías dispoñibles baseadas neste órgano. Entre todas destacan as que empregan fraccións citosólicas de fígado humano e microsomas de fígado humano (19).

o Microsomas de fígado humano.

Os microsomas de fígado humano ou HLMs polas súas siglas en inglés (*human liver microsomes*), son vesículas de hepatocitos do retículo endoplasmático obtidas por centrifugación diferencial. Normalmente empréganse para a recreación do metabolismo de Fase I pola favorecida expresión das encimas CYP.

É habitual que o procedemento para levar a cabo os estudos *in vitro* con esta tecnoloxía implique a mestura dos HLMs cunha disolución reguladora de fosfato de potasio ou sodio e os correspondentes cofactores e que todo isto se incube xunto coa substancia de estudo a 37 °C.

Como se indica, son precisos cofactores para a adecuada recreación do metabolismo. Se se desexan activar as encimas CYP, débese engadir NADPH pero se se queren activar as UGTs (Fase II), débese engadir o cofactor UDPGA amais de axentes que formen poros (como a alameticina) para facilitar o aceso dos compostos xenobióticos ás encimas.

Débese ter en conta que a actividade metabólica pode variar significativamente entre individuos polo que, dependendo do tipo de estudo que se desexe levar a cabo, será preciso empregar HLMs de mesturas de diversos tecidos hepáticos individuais.

O método de metabolismo *in vitro* baseado en HLMs ten varias vantaxes como a facilidade de uso, a económica, ou a existencia de procesos claramente establecidos. Pola contra, tamén ten unha serie de desvantaxes, como o feito de que a ausencia doutras encimas presentes nas células intactas (por exemplo sulfotransferasas), limita as reacción que poden ter lugar (19).

- *Fraccións citosólicas de fígado humano.*

O citosol do fígado humano obtense por centrifugación diferencial de microsomas e expresa as encimas solubles de Fase II como a sulfotransferasa (ST) ausente nos HLMs. Este tipo de metodoloxía require tamén de cofactores, polo que para o correcto funcionamento da ST é preciso engadir adenosin-3'-fosfato-5'-fosfosulfato (PAPS).

A vantaxe máis significativa que ofrece este modelo é que so unha pequena cantidade de encimas citosólicas están presentes, e todas elas en concentracións superiores ás observadas noutras alternativas, o que deriva na posibilidade de estudar de forma individualizada cada encima segundo o cofactor engadido.

Como xa se reportou en diversos estudos (21, 22), a través da combinación adecuada destes dous métodos pódese conseguir recrear satisfactoriamente o metabolismo de Fase I e Fase II (glucuronidación e sulfatación) dun composto determinado.

3.8. Cromatografía líquida hibridada con espectrometría de masas en tándem de alta resolución en estudos de análise cualitativo

3.8.1. Principios da técnica

A cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) é unha das técnicas analíticas de separación máis empregadas debido á súa capacidade de separación, sensibilidade, á súa fácil automatización, á idoneidade para a determinación cuantitativa exacta, ou á súa versatilidade, ao non estar limitada pola volatilidade nin estabilidade térmica dos analitos, entre outros motivos.

Na HPLC a fase móbil faise pasar a presión a través da columna cunha fase estacionaria concreta na que quedan retidos os compostos da mostra. Dependendo da afinidade relativa dos analitos cara unha ou outra fase, a temperatura e o pH, estes eluirán a tempos distintos permitindo a súa separación. Para poder levar a cabo unha separación adecuada de distintos compostos existen diferentes modos cromatográficos dispoñibles.

Neste traballo, empregouse a cromatografía en fase reversa (RPLC), onde se empregan columnas relativamente apolares (ex. octadecilsilano, C18) con fases móbiles lixeiramente polares e, polo tanto, serve para separar principalmente compostos (moderadamente) hidrofóbicos. A interacción hidrofóbica é fundamental pero existen outros dous mecanismos (interacción polar e interacción iónica) que interveñen no desenvolvemento da cromatografía e que permite ampliar o seu uso a compostos máis polares como os de interese (23).

A complexidade da determinación de microcontaminantes en mostras biolóxicas a niveis traza fai que o tempo de retención sexa insuficiente para a identificación satisfactoria dos mesmos, polo que a tendencia actual é o uso da espectrometría de masas (MS) como sistema de detección.

A MS é unha técnica analítica que, a través da obtención de ións e da súa separación segundo a relación masa/carga (m/z), permite identificar os compostos de interese coa axuda dos detectores axeitados, ademais da súa cuantificación.

Para levar a cabo esta análise empréganse espectrómetros de masas que, de forma xeral, están compostos dos elementos que se observan na Figura 7.

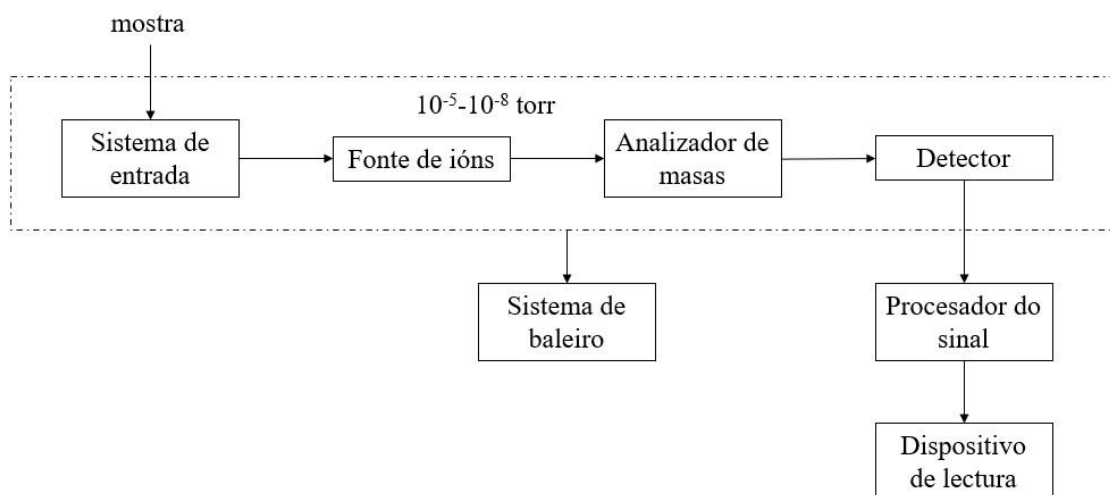


Figura 7. Esquema espectrómetro de masas (24).

En HPLC trabállase cunha presión elevada pero, por contra, como se observa na Figura 7, o MS traballa a baleiro e en fase gas polo que é preciso vaporizar a mostra. Para tal fin faise uso dunha interfase entre o sistema HPLC e o MS que permite levar a cabo a vaporización necesaria e, ao mesmo tempo, a ionización dos compostos para a súa análise. Hoxe en día, as interfases máis comúns son as de ionización a presión atmosférica (API) entre as que se atopa a ionización por “*electrospray*” (ESI), empregada durante a realización deste traballo fin de máster.

A fonte ESI (Figura 8) é unha fonte de ións branda e, polo tanto, xera moi pouca fragmentación da molécula dando lugar, fundamentalmente, a ións cuasimoleculares da forma $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$. Este tipo de fonte é moi interesante, xa que a ionización ten lugar na fase líquida (previa á desolvatación) polo que é recomendable no caso dos compostos (moderadamente) polares cos que se traballa.

A saída do eluínte cromatográfico faise pasar por unha agulla sometida a unha voltaxe que converte o fluxo nun “*spray*” de gotas cargadas. A carga destas gotas facilita a dirección das mesmas cara o espectrómetro. Así mesmo, tamén facilita a desolvatación das moléculas en forma iónica a través das forzas de repulsión Coulómbica, que levan á fragmentación das gotas ata a obtención dos ións correspondentes. Coa ESI conséguese de forma simultánea ionizar os analitos e eliminar gran parte do disolvente (25).

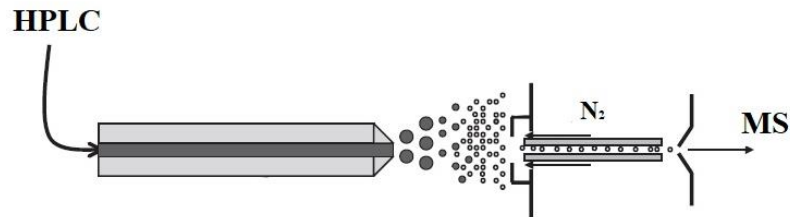


Figura 8. Esquema dunha fonte de ionización de ESI (25).

Unha vez os analitos foron ionizados e se atopan en fase gasosa, estes pasan a un analizador de masas que a través da relación m/z é capaz de separalos. Aínda que as fontes de ionización brandas reportan información da masa (cuasi)molecular dun ión, este dato moitas veces non é suficiente para identificar un composto debido a que non achega información sobre a estrutura do mesmo. Por isto empréganse analizadores de masas en tándem (MS/MS) onde se combinan dous ou máis analizadores para aumentar a selectividade e a versatilidade da análise (25).

Para este traballo fíxose uso dun analizador de masas en tándem de alta resolución (HRMS) de tipo cuadrupolo- tempo de voo (QTOF). O seu funcionamento segue o esquema básico reflectido na Figura 9 onde en primeiro lugar, tras a ionización, selecciónase o ión desexado, posteriormente frágntase coa enerxía de colisión adecuada e finalmente os fragmentos son analizados segundo a súa m/z .

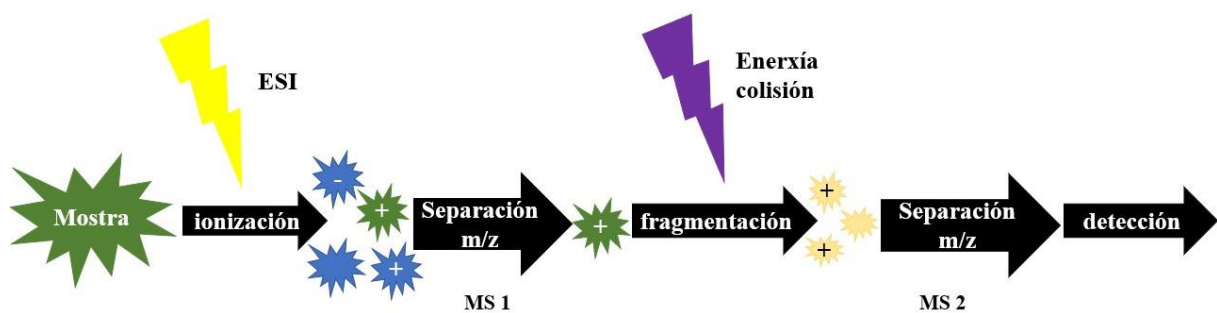


Figura 9. Esquema do funcionamento dun espectrómetro de masas en tándem.

O MS 1 deste esquema asimílase ao cuadrupolo (Q) do equipo co que se traballou que consiste en 4 cilindros metálicos dispostos paralelamente dous a dous onde cada par oposto de cilindros está conectado electricamente. A un dos pares aplícaselle unha corrente continua superposta cun potencial de radiofrecuencias variable no tempo. Ao outro par aplícaselle un potencial de corrente continua de igual magnitude e signo contrario e outro de radiofrecuencias desfasado 180° de tal xeito que se crea entre os cilindros un campo electromagnético. Se se aplica corrente

continua e alterna (radiofrecuencia) a todos os cilindros soamente os ións dunha m/z determinada serán enfocados. Se pola contra se aplica simplemente corrente alterna, o analizador pasa a funcionar como unha guía de ións, unha función interesante que permitiría usar o analizador como se tratase simplemente dun TOF (25).

Pola súa banda o MS 2 correspóndese co TOF tipo reflectrón. Este analizador consiste nun longo tubo a baleiro onde os ións, previamente acelerados por un pulso de potencial eléctrico, se moven libremente. Ao final do tubo atópase o reflectrón que é un espello de ións formado por diferentes aneis de campos eléctricos crecentes que permiten atenuar as pequenas diferenzas de enerxía cinética existentes entre ións coa mesma m/z . Neste analizador os ións vanse separar atendendo á súa m/z xa que a velocidade á que se moven vai depender da súa masa. En primeiro lugar chegarán ao detector os ións máis lixeiros (maior velocidade) e despois os máis pesados (25).

Tras a separación dos ións, estes son detectados cunha placa de microcanaís. Este detector consiste nun centenar de multiplicadores de electróns dispostos paralelamente. As placas de microcanaís, empregadas soas ou en cascada, son capaces de producir unha amplificación dos electróns de entre 10^4 e 10^7 ademais dunha moi elevada resolución temporal (<100 ps) e unha moi boa resolución espacial unicamente limitada polas dimensións e espazo entre canaís (26).

3.8.2. Estudos de cribado

Nos últimos anos observouse unha clara tendencia cara o emprego da HRMS en estudos de cribado (análise cualitativo). Esta técnica permite levar a cabo tanto análises dirixidas como non dirixidas debido á alta selectividade cando se traballa en modo barrido e á alta precisión de masa (27).

Esta instrumentación é especialmente interesante para estudos de cribado debido a que permite identificar compostos descoñecidos sen dispoñer de antemán dun estándar puro. A obtención do espectro completo de MS/MS permite a identificación tentativa do composto (28).

3.8.3. Modos de adquisición de datos

Como se comentou con anterioridade, é preciso obter espectros de MS/MS para a identificación dos compostos xa que o espectro de MS simplemente reporta información sobre o ión e a fórmula molecular.

Co gallo de obter o espectro de MS/MS necesario, en HRMS pódense empregar os 3 modos de adquisición de datos que a continuación se describen.

- *Adquisición dependente de datos ou Auto MS/MS:*

Neste modo de adquisición o primeiro analizador de masas traballa en modo *full-scan*. Os ións precursores diríxense cara a célula de colisión onde se leva a cabo a fragmentación sobre unha lista de ións seleccionados en base á súa intensidade. Con esta análise obtéñense datos cuantitativos (obtidos do espectro de MS *full-scan*) e estruturais (obtidos dos espectros de MS/MS). Como a selección dos ións precursores aos que se lles realiza un espectro de MS/MS é dependente da súa intensidade, estase a perder información de posibles compostos (metabolitos neste caso) presentes nas mostras pero a niveis máis baixos de concentración (29).

- *Adquisición independente de datos ou All ions:*

En *All ions*, pola contra, frágntanse todos os ións precursores, o primeiro dos analizadores de masas permanece inactivo de tal forma que todos os ións xerados na fonte de ionización chegan á célula de colisión. Neste tipo de modo de adquisición, o vínculo entre o ión precursor e o ión fragmento non está tan claro debido á complexidade dos espectros de MS/MS xerados (30).

- *MS/MS dirixido ou Target MS/MS:*

Neste último caso lévanse a cabo análises de MS/MS dirixidos sobre ións de m/z determinado e a un tempo de retención concreto. Para a fragmentación do ión precursor empréganse unha ou varias enerxías de colisión. Con este tipo de análise conséguense información estrutural dunha cantidade limitada de compostos .

3.8.4. Modos de busca

Segundo a información da que se dispoña dos compostos que se pretende identificar, á hora de levar a cabo os estudos de cribado, pódense adoptar diferentes modos de traballo como os que se detallan (31).

○ *Target Screening*

Neste modo de busca trabállase sobre unha lista de compostos a identificar dos que dispoñemos de datos como a masa exacta, o tempo de retención (obtido dun estándar de referencia) e o espectro de masas (obtido a partires do estándar ou a través de bibliotecas espectrais).

○ *Suspect Screening*

Este modo non depende da existencia de estándares de referencia para a cuantificación e a confirmación. Neste caso realízase a busca sobre unha lista de posibles compostos a determinar dos cales dispoñemos de certos datos como a fórmula. A través desta podemos identificar a masa exacta do ión precursor (algo especialmente sinxelo se se traballa con fontes como ESI).

Para elaborar a lista de posibles sospeitosos a identificar, ademais de consultar fontes bibliográficas, pódense empregar softwares que predín posibles produtos de transformación ou, como no caso deste traballo, metabolitos xerados tras o metabolismo de Fase I e Fase II.

○ *Non Target Screening*

Ao contrario do que ocorre no caso de *Target* ou *Suspect Screening*, en *Non Target Screening* non se dispón, *a priori*, de ningunha información sobre os compostos ha detectar. Debido á escaseza de información, a identificación dun composto a través do espectros de MS ou MS/MS de alta resolución supón un proceso intensivo de tratamento de datos. Con este modo de busca expándese o abano de compostos a detectar porque a busca non se atopa tan limitada como nos casos anteriores, pero implica unha maior dificultade (27).

3.8.5. Niveis de confirmación

O emprego da HRMS, como xa se comentou, experimentou unha grande expansión nos últimos anos. O nivel de confianza na identificación das substancias baseadas nesta técnica varía moito entre substancias e estudos, polo que para comunicar de forma precisa e concisa a confianza da identificación, empréganse os seguintes niveis de confianza descritos por Shymanski *et al.* (32).

- *Nivel 1. Estrutura confirmada.*

A estrutura proposta está confirmada a través da comparación co espectro de MS, MS/MS e o tempo de retención dun estándar de referencia.

- *Nivel 2. Estrutura probable.*

Foi posible identificar unha estrutura exacta empregando diferentes evidencias. Dentro deste nivel, hai dúas posibilidades:

- *Nivel 2a. Biblioteca.*

Existe correspondencia clara entre a estrutura e o espectro. Ademais, os datos espectrais coinciden cos das bibliotecas de espectros ou literatura. Outras evidencias como o tempo de retención tamén son interesantes neste nivel.

- *Nivel 2b. Diagnóstico.*

Existe correspondencia clara entre a estrutura e o espectro pero non se dispón de datos espectrais na literatura nin en bibliotecas para comparar.

- *Nivel 3. Posible Candidato.*

Existen evidencias sobre a posible estrutura do composto pero é insuficiente para confirmar unha única estrutura exacta (por exemplo posibles isómeros).

- *Nivel 4. Fórmula molecular inequívoca.*

A fórmula pode ser asignada sen ambigüidade pero non se dispón de información suficiente para elucidación de posibles estruturas.

- *Nivel 5. Masa exacta de interese*

Por último, a identificación dunha masa nunha mostra como interesante, pero sen a información suficiente como para asignar unha fórmula.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais

4.1.1. Ensaio de metabolismo *in vitro*

- Microtubos tipo Eppendorf
- Termómetro
- Forno
- Baño de xeo
- Microcentrífuga accuSpin Micro 17 (Fisher Scientific)

4.1.2. Preparación de mostra de urina

- Estación de extracción en fase sólida, VisiPrep (Supelco)
- Cartuchos de extracción en fase sólida de 200 mg Oasis HLB (Waters)
- Sistema de secado de cartuchos de SPE baixo corrente de nitróxeno, VisiDry, (Supelco)
- Membrana purificadora de nitróxeno (Nitrox Mini)
- Sistema de concentración por corrente de nitróxeno, Turbo-Vap II (Zymark)
- Sistema de concentración por corrente de nitróxeno, Mini-Vap (Supelco)
- Cartuchos β - Gone (Phenomenex)

4.1.3. Material de uso xeral

- Material de vidro e plástico de uso habitual no laboratorio
- Xiringas de 2 mL (Brand)
- Filtros de xiringa de 0,22 μ m Clarify-PTFE hydrophilic (Phenomenex) e de 0,45 μ m Clarify-PTFE hydrophilic (Phenomenex)
- Axitador Vórtex (RS lab)

4.2. Reactivos e patróns

4.2.1. Reactivos dos ensaios de metabolismo *in vitro*

- 1686 μ g/mL DPG (97%, Sigma-Aldrich) en DMSO (99,9%, Sigma-Aldrich).
- 1686 μ g/mL DTG (99%, Sigma-Aldrich) en DMSO.

- Disolución reguladora TRIS 100 mM: 1,22 g Trizma Base (Sigma-Aldrich) e 0,11g $Mg_2Cl_6 \cdot H_2O$ (Sigma-Aldrich) en 100 mL auga ultrapura (VWR Chemicals). O pH axustouse a 7,52 engadindo HCl 1 M.
- 95 mM NADPH (Roche Diagnostics GmbH 98%) en disolución reguladora.
- Disolución de parada: 1% (v/v) ácido fórmico (98-100%, Sigma-Aldrich) en acetonitrilo (grado LC-MS, VWR Chemicals) + 5 μ g/mL Irbersartan-d4 (TRC).
- 100 μ g/mL Fenacetina (>98%, Sigma-Aldrich) en auga ultrapura.
- 100 mM Ácido 2,5-uridinadifosfatoglucurónico (UDPGA) (98-100%, Sigma-Aldrich) en disolución reguladora.
- 10 mM Adenosina-3'-fosfato 5'-fosfosulfato (PAPS) (Sigma-Aldrich).
- 1000 μ g/mL Alamecicina (>98%, Sigma-Aldrich) en DMSO.
- 1 mM 4-Nitrofenol (4-NP) (>99%, Sigma-Aldrich) en disolución reguladora.
- Mestura de microsomas hepáticos humanos (HLMs, xénero mixto, n=50, 20 mg/mL, Sekisui)
- Mestura de citosol hepático humano (xénero mixto, n=200, 10 mg/mL, Xenotech)

4.2.2. Reactivos para a preparación de mostra e a análise

- B-glucuronidasa H-5 3000 unidades en auga ultrapura 0,2% NaCl
- Disolución reguladora 1 M pH = 5 de acetato sódico (>99%, Sigma-Aldrich) /Ácido acético (Scharlau)
- Metanol grado LC-MS (Fisher)
- Ácido Acético grado LC-MS (Scharlau)
- Amoníaco 7 N en metanol (Acros Organics)
- Amoníaco 25% grado LC-MS (Scharlau)

4.3. Metodoloxía da recreación do metabolismo *in vitro*

Empregouse un ensaio de metabolismo humano *in vitro* previamente optimizado (21). Os sets de mostra consistiron en 3 réplicas e xeráronse da forma que a continuación se resume.

4.3.1. Metabolismo de Fase I

Para recrear o metabolismo de Fase I empregouse unha mestura de microsomas hepáticos humanos (HLMs). Nun tubo Eppendorf de 1,5 mL engadíronse entre 935 e 955 μ L (dependendo do tipo de mostra) de tampón TRIS 100 mM para acadar un volume final de 1 mL. Ao tampón engadíronselle 25 μ L de HLMs, 10 μ L de substrato (DPG ou DTG) e durante

1 e 3 horas incubáronse os Eppendorf a 37 °C. Aos 5, 60 e 120 minutos da incubación engadíuselles 10 µL de NADPH.

Leváronse a cabo tres controis negativos onde se eliminou a adición de substrato, de HLMs ou de NADPH, respectivamente. Tamén se realizou un control positivo empregando como substrato a fenacetina. A reacción parouse á hora ou ás 3 horas de incubación con 250 µL da disolución de parada.

4.3.2. Metabolismo de Fase I + Fase II

Para recrear a combinación do metabolismo de Fase I e Fase II parouse a reacción de Fase I ás 3 horas, introducindo os microtubos en baño de xeo durante 30 segundos e posteriormente, centrifugouse 5 minutos a 8000 rpm.

Para a reacción de glucuronidación transferíronse 935 µL do sobrenadante e engadíronse 25 µL de HLMs e 10 µL de alameticina. Incubáronse as mostras durante 3 horas a 37 °C. Aos 5, 60 e 120 minutos de incubación engadíronse 10 µL de UDPGA. A reacción parouse con 250 µL de disolución de parada e centrifugouse durante 5 minutos a 8000 rpm. Recuperouse o sobrenadante a un vial para o seu análise.

Para a reacción de sulfatación seguiu-se un procedemento moi semellante. Transferíronse 965 µL de sobrenadante e engadíronse 25 µL de citosol hepático humano. Incubáronse as mostras durante 3 horas a 37 °C. Aos 5, 60 e 120 minutos de incubación engadíronse 10 µL de PAPS. A reacción parouse con 250 µL da disolución de parada e centrifugouse durante 5 minutos a 8000 rpm. Recuperouse o sobrenadante a un vial para a súa análise.

Neste conxunto de probas tamén se incluíron 4 controis negativos, 2 de substrato e outros 2 do correspondente cofactor (UDPGA para glucuronidación e PAPS para sulfatación) e 2 controis positivo (un para a glucuronidación e outro para a sulfatación) con 10 µL de 4-NP como substrato.

4.3.3. Metabolismo de Fase II

Por último, recreouse o metabolismo de fase II sen ser precedido por fase I (só Fase II). O procedemento é o mesmo que para a glucuronidación e a sulfatación explicadas con anterioridade (ver 4.3.2) coa diferenza de que inicialmente engádense 935 e 965 µL respectivamente de disolución reguladora e 10 µL dos correspondentes substratos xa que non se

transfire sobrenadante da Fase I. O obxectivo destas probas é estudar a posible formación directa de metabolitos de Fase II.

As mostras dos diferentes ensaios filtráronse con filtros *Clarify-PTFE* hidrofílicos de 0,22 μm antes da súa análise

4.4. Metodoloxía de análise de mostras de urina

4.4.1. Preparación das mostras individuais de urina

Tomáronse 60 mostras de urina individuais de doantes voluntarios (estudo aprobado polo Comité de Ética de Santiago-Lugo, rexistro 2019/545). As mostras analizáronse directamente tras un proceso de desconxugación encimática e posterior composición. Na desconxugación prodúcese a reacción dos metabolitos de Fase II coa encima β -glucuronidasa, polo que son transformados nos metabolitos de Fase I correspondentes ou no composto precursor de partida. O procedemento seguido para a desconxugación é o seguinte:

- A mostra de urina fíltrose con filtros 0,45 μm *Clarify-PTFE hydrophilic* de Phenomenex.
- Mesturáronse 200 μL de urina filtrada con 122 μL β -glucuronidasa, 80 μL de disolución reguladora de acetato sódico/ ácido acético 1M, 392 μL de auga ultrapura e o correspondente volume dos patróns internos bisfenol A e S deuterados para acadar unha concentración final en disolución dos mesmos de 200 ng/mL.
- Incubouse a mestura a 37 °C durante 5 horas.
- Fíltrose con cartuchos β -Gone e filtros de xeringa de 0,22 μm *Clarify-PTFE hydrophilic*.

Mediante o procedemento de desconxugación prodúcese unha dilución da urina en relación 1:4.

4.4.2. Preparación dos mostras compostas de urina

Prepáranse 3 mostras compostas de urina, formados por 20 mostras individuais de urina desconxugada (PD1, PD2 e PD3) e 3 mostras compostas de 20 mostras de urina sen desconxugar, simplemente filtradas (P1, P2 e P3). O volume total de cada mostra composta é de 2 mL polo que se toman 100 μL de cada mostra individual de urina para a súa formación.

4.4.3. Inxección directa das mostras tras dilución

Para levar a cabo a análise das diferentes mostras, o método máis simple empregado foi a dilución das mostras en auga ultrapura.

- Mostras sen desconxugar (P1, P2 e P3): Mesturáronse 250 μL de mostra con 750 μL de auga ultrapura conseguindo un volume final de 1 mL. Acadouse unha dilución 1:4 da urina.
- Mostras desconxugados (PD1, PD2 e PD3): Tomouse directamente 1 mL do mostra debido a que as mostras desconxugadas individuais utilizadas na preparación das mesmas xa se atopaban diluídas na relación 1:4.

4.4.4. Extracción en fase sólida

O outro procedemento de preparación de mostra que se levou a cabo para as mostras de urina sen desconxugar (P1, P2 e P3) foi a extracción en fase sólida (SPE) que permite concentrar os analitos e eliminar interferencias das mostras líquidas. Neste caso empregáronse cartuchos OASIS HLB de 200 mg (Waters) e seguiuuse o procedemento que a continuación se describe.

- Acondicionamento do adsorbente: limpeza do mesmo con 3 mL de metanol seguidos de 3 mL de auga ultrapura.
- Carga da mostra: mestura de 1 mL do mostra (P1, P2 e P3) con 9 mL de auga ultrapura.
- Lavado: 1 mL de auga ultrapura que arrastra as interferencias que puideron quedar retidas.
- Secado: 30 minutos en corrente de nitróxeno.
- Elución : arrastre dos analitos con 6 mL de metanol.
- Evaporación a sequidade con corrente de N_2 .
- Reconstitución: 100 μL cunha disolución de metanol e auga ultrapura 50:50.

Con este procedemento conséguese un factor de concentración de 10. Antes da análise as mostras filtranse cun filtro de xiringa de 0,22 μm *clarify-PTFE* hidrofílicos.

4.5. Instrumentación

Nestes estudos fíxose uso dun cromatógrafo de UHPLC da serie 1290 Infinity II de Agilent acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6550 iFunnel QTOF-LC/MS System (Figura 10). Este espectrómetro conta cunha fonte de ionización ESI (JetStream).



Figura 10. Equipo UHPLC-ESI-QTOF empregado.

4.6. Condicións instrumentais de medida

Para o *screening* co sistema anteriormente citado empregouse unha columna de fase reversa ZORBAX Extend-C18 (2,1 x 50 mm; 1,8 μ m) de Agilent Technologies. A temperatura da columna fíxose en 35 °C e inxectouse un volume de 2 μ L de mostra.

Como fases móbiles empregáronse (A) auga ultrapura e (B) metanol con 5 mM de acetato amónico ambas as dúas. O gradiente cromatográfico, cun fluxo de 0,4 mL/min, comezou manténdose 1 minuto con 98% de (A) e un 2% de (B) que subiu ao 70% (B) aos 15 minutos onde se mantivo durante 1 minuto antes de volver aumentar ata o 100% (B) aos 19 minutos. Mantívose nesa porcentaxe outro minuto e no minuto 20,01 a porcentaxe de (B) descendeu ata as condicións iniciais (2% de B) que se mantiveron ata completar 25 minutos de análise. Para a análise dos ensaios *in vitro* traballouse no modo de adquisición *Auto MS/MS* con ionización positiva e negativa e empregando como enerxías de colisión 10, 20 e 40 V.

Pola súa banda, para a análise das mostras de urina traballouse no modo de adquisición *All ions* con ionización positiva e negativa e dous canais, un a 0 V e outro a 20 V.

Debido a que se detectaron os compostos de estudo nas fases móbiles, instalouse unha columna de retardo antes da entrada das fases móbiles á columna de tal xeito que a contaminación por DPG e DTG procedente da fase móbil presenta un tempo de retención lixeiramente superior que o rexistrado para os analitos presentes nas mostras.

4.7. Tratamento de datos

4.7.1. Tratamento de datos do metabolismo *in vitro*

Levou a cabo unha abordaxe de tipo *Suspect Screening* sobre os datos dos ensaios de metabolismo *in vitro*. O fluxo de traballo consistiu no tratamento dos datos co software *Mass Profinder 10.0* e *MassHunter Qualitative Analysis 10.0* a partir dunha lista de metabolitos a localizar. Esta lista foi creada a través da busca bibliográfica (33) e do emprego de softwares de simulación de metabolitos *in silico* que predín as fórmulas moleculares dos posibles metabolitos xerados. Entre os softwares empregados atopábanse *QSAR Toolbox* (34), *Biotransformer* (35), *GloryX* (36) e *Meteor* (37).

Tras comprobar a través dos controis positivos que os ensaios de metabolismo *in vitro* transcorreran sen incidencias, realizouse unha primeira criba co programa *Mass Profinder 10.0*. A finalidade desta primeira criba foi a identificación de falsos positivos debido á presenza de picos nos controis negativos, identificando como verdadeiros posibles metabolitos aqueles que cumpriren os seguintes requirimentos:

- Ausencia de pico nos controis negativos. De estar presente, a área do pico observado no control negativo debía ser inferior ao 10 % da área do pico na mostra.
- Presencia do potencial metabolito en cando menos 2 das 3 réplicas.
- Variación de masa inferior a 10 ppm con respecto á masa teórica.
- *Score* (rango de 0-100 baseado na exactitude de masa, no espaciado isotópico e na abundancia isotópica) superior a 60.

Coa lista de metabolitos lixeiramente reducida tras esta primeira criba, procédese á busca individual dos metabolitos a través da función *Find by Formula* do programa *MassHunter Qualitative Analysis 10.0*. Este programa busca nos cromatogramas o valor de *m/z* dos ións ou aductos permitidos ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M-H]^-$, $[M+CH_3COO]^-$), podendo extraer os espectros de MS/MS que foron lanzados mediante *Auto MS/MS*. As mostras con potenciais metabolitos que non dispoñían de espectro de MS/MS tras a análise, foron reinxectadas en modo *Target MS/MS* o que permitiu a extracción dos espectros mediante a función *Find by Targeted MS/MS* que localiza os MS/MS xerados tras cada inxección.

4.7.2. Tratamento de datos das mostras de urina

Para tratar estes datos volveuse empregar a función *Find by Formula* do programa *MassHunter Qualitative Analysis 10.0* fixando unha tolerancia de masas de 10 ppm, unha variación no tempo de retención dos posibles fragmentos de 0,25 minutos con respecto ó precursor e unha intensidade de pico superior ás 100 contas.

Neste caso a lista de compostos a buscar creouse a partir dos metabolitos identificados nos experimentos *in vitro* (5.2). Cos posibles metabolitos identificados nas mostras de urina, procedeuse á reinxección en modo Target MS/MS para obter os espectros reais dos posibles metabolitos detectados na urina. Con ese fin indicouse a relación m/z a identificar, o seu tempo de retención e as enerxías de colisión desexadas (10, 20 e 40 V). A través da función anteriormente citada *Find by Targeted MS/MS* obtivéronse os espectros necesarios e/ou a través da extracción manual das relacións m/z obtidas.

Así pois, de forma global, a Figura 11 recolle un resumo do fluxo de traballo empregado.

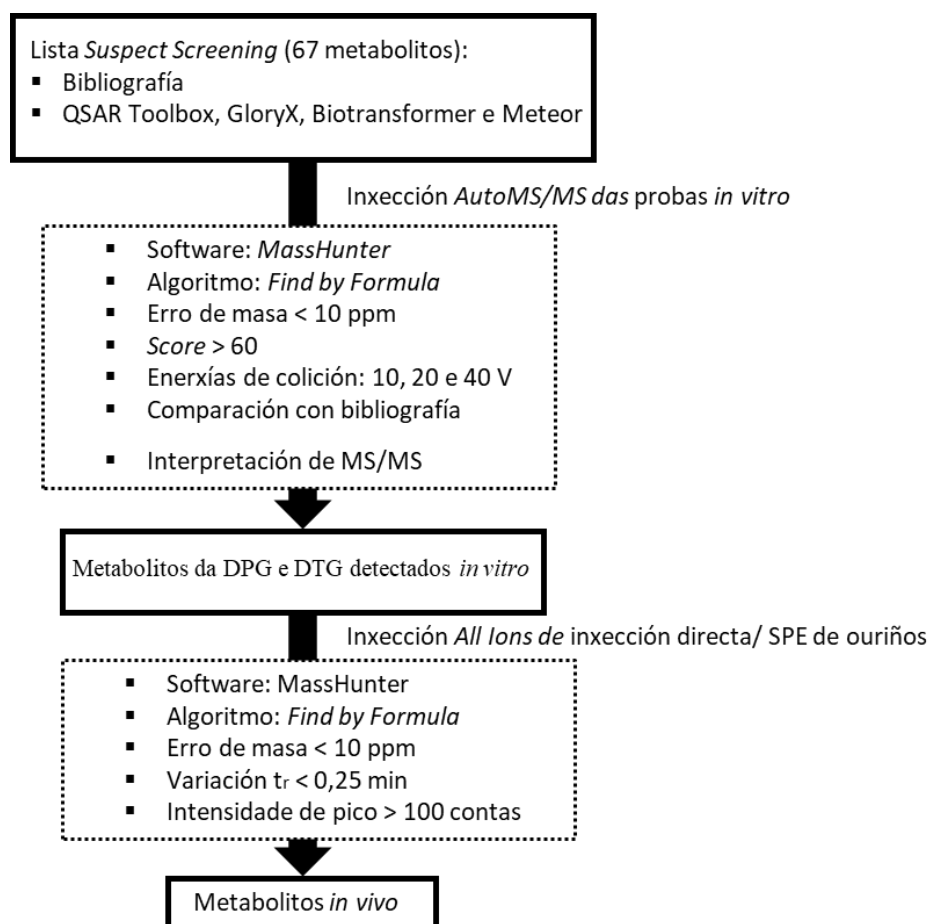


Figura 11. Fluxo de traballo empregado nos estudos de metabolismo *in vitro* da DPG e da DTG.

5. RESULTADOS E DISCUSIÓN

5.1. Lista de posibles metabolitos formados

Como xa se avanzou no apartado 4.7.1, para as buscas mediante *Suspect Screening* é preciso dispoñer dunha lista de compostos a identificar. Neste caso, debido á falta de estudos previos relativos ao metabolismo da DPG e da DTG, fíxose unha busca bibliográfica dirixida cara a estudos que recollesen produtos de transformación destas substancias e empregáronse os softwares de simulación do metabolismo *in silico* anteriormente citados co que se conseguiu propor a formación de un total de 26 metabolitos a partir da DPG (Táboa A1) e 41 metabolitos a partir da DTG (Táboa A2).

5.2. Metabolitos identificados nos ensaios *in vitro*

5.2.1. Metabolitos dos ensaios *in vitro* da 1,3-difenilguanidina

Dos 26 posibles metabolitos, foron detectados 6, 4 metabolitos de Fase I (DPG-225, DPG-227 (maioritario), DPG-228 e DPG-243) e 2 metabolitos de Fase II (DPG-387 e DPG-403). Debido á inexistencia de espectros de MS/MS destes metabolitos nas bibliotecas, a maioría deles foron identificados a través da interpretación dos espectros de MS/MS. Porén, algúns deles (DPG-225 e DPG-227) puideron ser comparados con espectros previamente publicados por Sieira et al. (33), quen estudou a oxidación con cloro e bromo da DPG e DTG, xa que algúns dos produtos de oxidación química correspóndense con algún dos metabolitos de Fase I observados.

O nivel de confianza co que se puideron identificar os compostos variou dun caso a outro. Na maioría dos casos o nivel de confianza foi 3 debido á imposibilidade de identificar a través do espectro de MS/MS unha única estrutura exacta, mais algún deles puido identificarse de forma máis precisa debido a perdas características dando lugar a unha identificación cun nivel de confianza 2b. A continuación amósase a interpretación dos espectros obtidos para cada metabolito.

- DPG-225

O DPG-225 observouse en modo positivo a un tempo de retención de 5,9 minutos. Non existe unha coincidencia inequívoca entre o espectro obtido para a estrutura proposta (espectro Figura 12) e o espectro recollido por Sieira et al (33), mais o feito de que o metabolito análogo para a DTG si puido ser identificado (apartado 5.2.2), lévanos a deducir que si se trata do metabolito

coa estrutura proposta. As diferenzas observadas no espectro de MS/MS serían debidas a que se trata dun dos posibles isómeros da molécula. Con todo, non existe ningunha perda inequívoca que nos leve a pensar que se trata do metabolito proposto e non outro dos isómeros posibles.

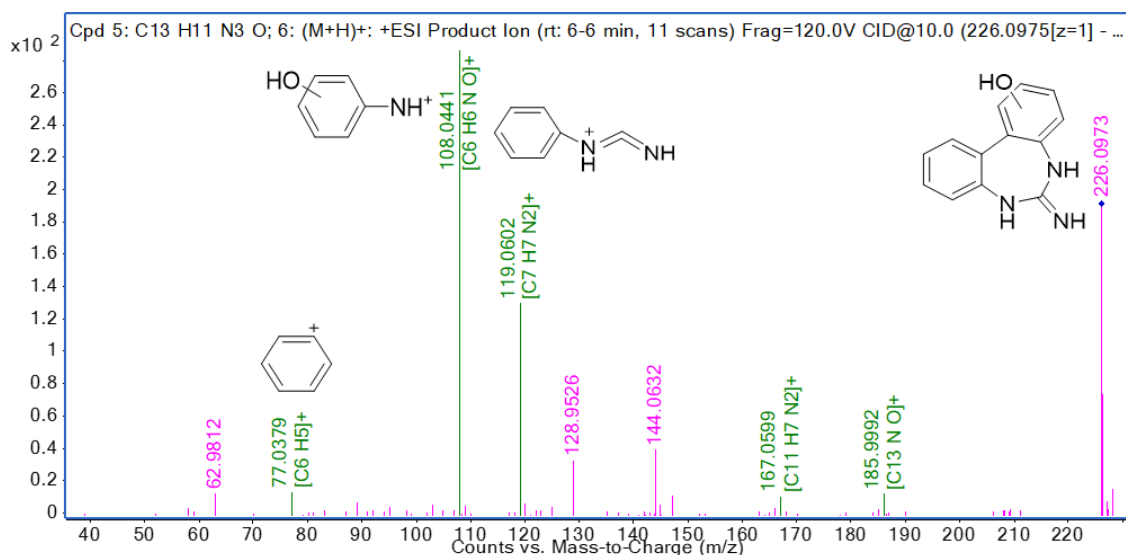


Figura 12. Espectro de MS/MS do DPG-225 en modo positivo con enerxía de colisión de 10 V.

○ DPG-227

Para este composto foron detectados 2 isómeros en modo de ionización negativa a tempos de retención de 5,9 e 6,5 minutos e en modo positivo foi detectado un único pico a 5,9 minutos. Malia a separación cromatográfica dos diferentes isómeros non foi posible identificar a estrutura de cada un deles pola semellanza entre os espectros (Figura 13). Como se pode observar, tanto en modo positivo como en modo negativo observouse a perda de amoníaco que tamén se observará noutros metabolitos. Ademais, os ións fragmento m/z 135,0543 e 110,0595 (modo positivo) e m/z 133,0397 e 108,0446 (modo negativo) lévannos a deducir que a hidroxilación se produce no anel e non nos grupos amino do composto de partida. O espectro deste metabolito presenta unha correspondencia clara co espectro recollido na bibliografía (33).

RESULTADOS E DISCUSIÓN

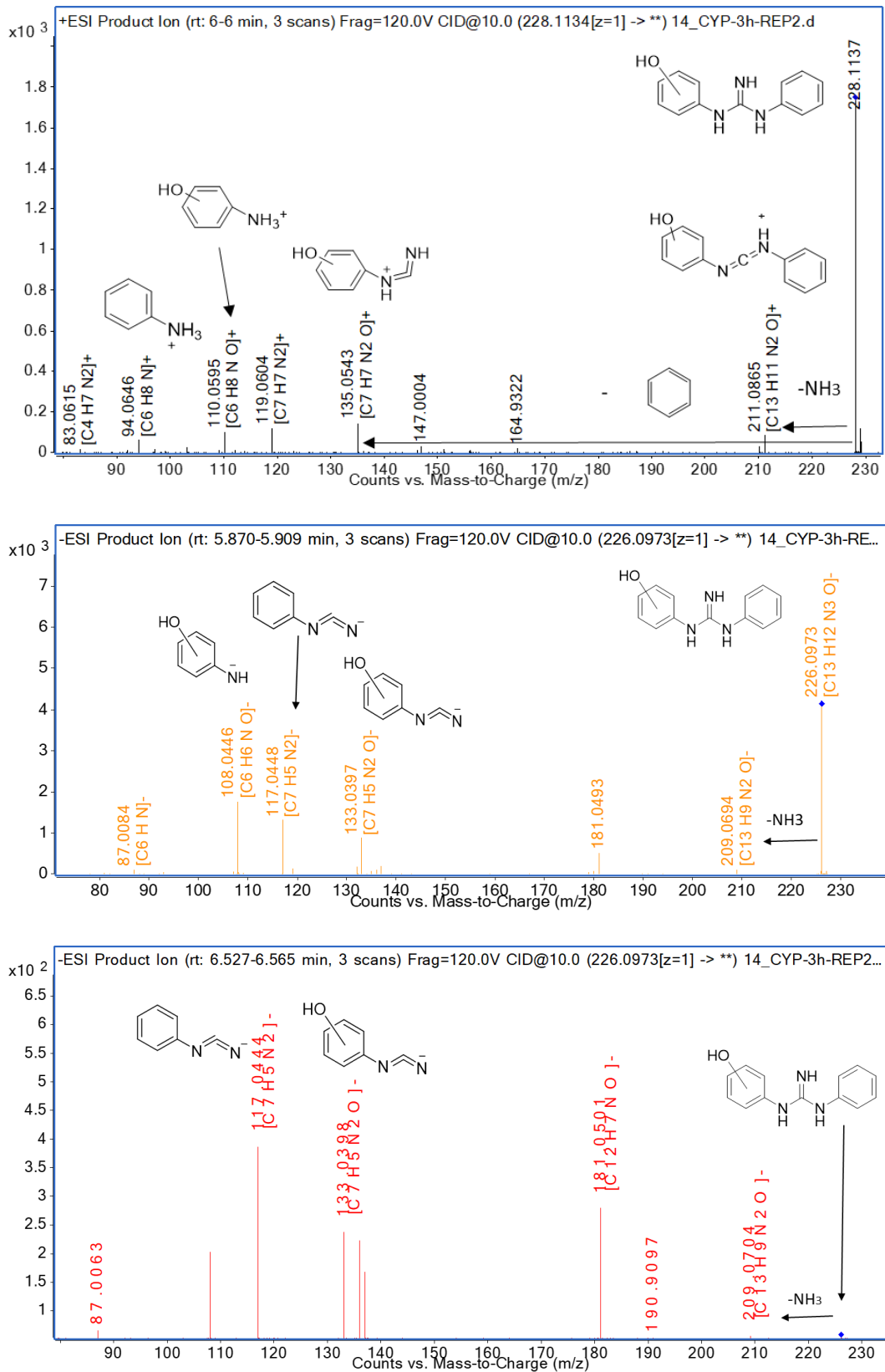


Figura 13. Espectro de MS/MS do DPG-227 en modo positivo na parte superior e 2 isómeros en modo negativo na parte inferior con enerxía de colisión de 10 V.

○ DPG-228

Este metabolito foi detectado soamente en modo de ionización negativo a tempo de retención de 9,6 minutos. Como se observa na Figura 14 o ión fragmento m/z 108,0441 observado no caso anterior é indicativo de que a hidroxilación se produce sobre un dos aneis.

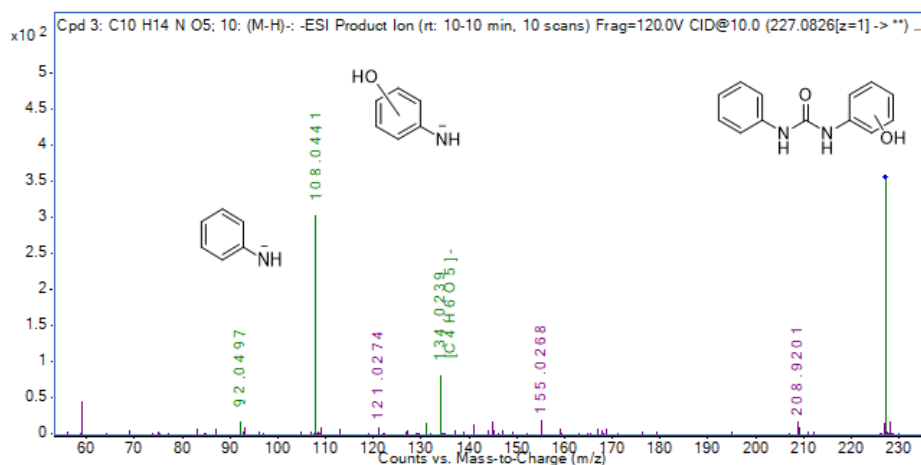


Figura 14. Espectro de MS/MS do DPG-228 en modo negativo con enerxía de colisión de 10 V.

○ DPG-243

Este metabolito foi detectado en modo de ionización positivo a tempo de retención de 4,4 minutos. Obsérvase a perda de amoníaco no espectro de MS/MS (Figura 15) e ademais o fragmento m/z 179,0157 que nos leva a deducir que a dobre hidroxilación se produce no mesmo anel segundo a estrutura proposta.

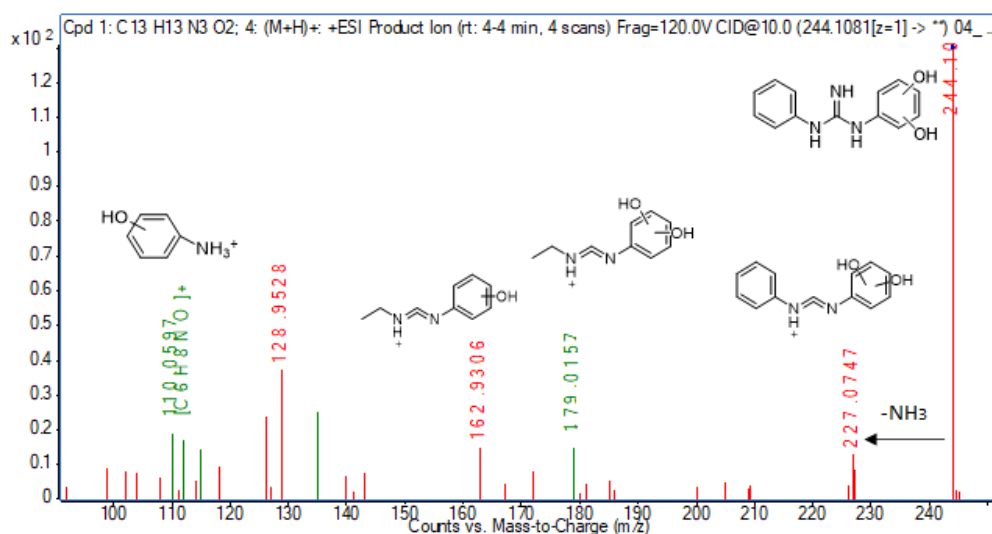


Figura 15. Espectro de MS/MS do DPG-243 en modo positivo con enerxía de colisión de 10 V.

○ DPG-387

O DPG-387 detectouse en modo de ionización positivo a tempo de retención 5,2 minutos (Figura 16). Identificouse grazas á perda característica do grupo glucurónico (m/z 388,1504 > m/z 212,1180) que da lugar a un fragmento correspondente co ión molecular do composto precursor de estudo (DPG).

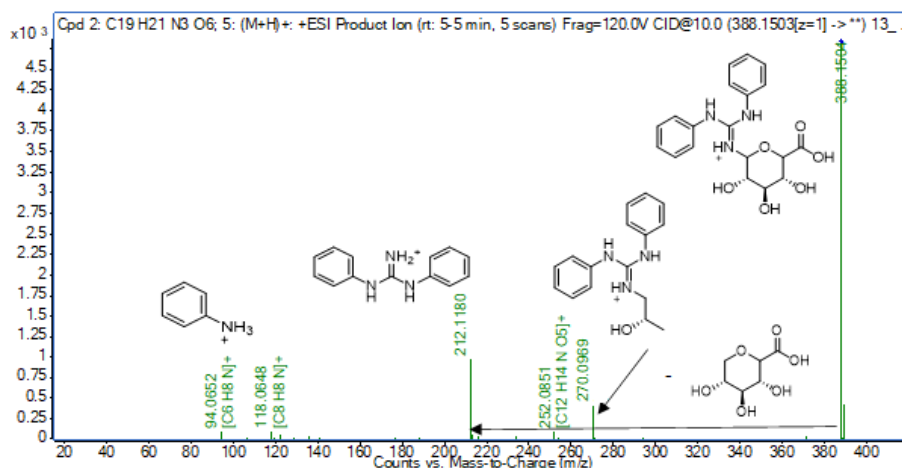


Figura 16. Espectro de MS/MS do DPG-387 en modo positivo con enerxía de colisión 10 V.

○ DPG-403

Por último, tamén en modo de ionización positivo detectouse o glucurónido DPG-403 a tempo de retención 5,3 minutos (Figura 17). Unha perda semellante á anteriormente comentada (DPG-387) é a que permitiu identificar ao derivado glucurónido do composto DPG-227. Neste caso a perda inclúe un grupo hidroxilo que fai deducir que a glucuronidación se produce sobre este grupo e non sobre o grupo amino como no caso anterior.

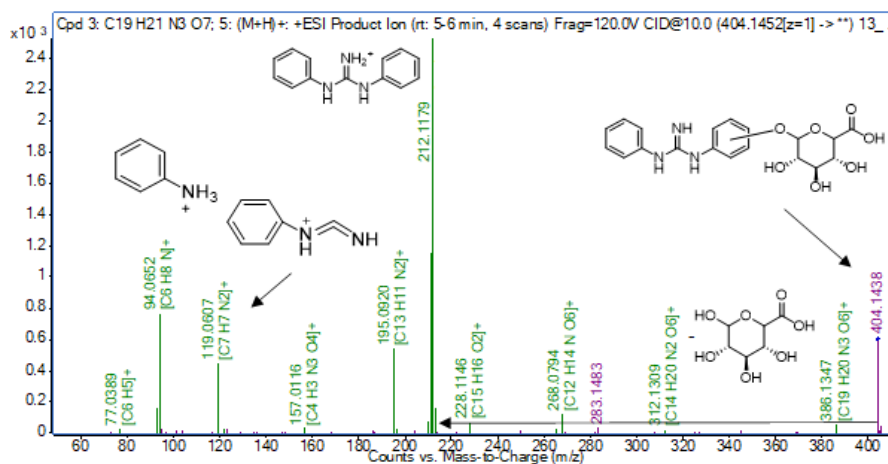


Figura 17. Espectro de MS/MS do DPG-403 en modo positivo con enerxía de colisión 10 V.

5.2.2. Metabolitos dos ensaios *in vitro* da 1,3-di-o-tolilguanidina

Os resultados obtidos para a DTG foron moi semellantes aos da DPG. Identificáronse en total 7 metabolitos, 5 de Fase I (DTG-237, DTG-253, DTG-255 (maioritario), DTG-256 e DTG-271), un máis que no caso da DPG, e 2 metabolitos de Fase II (DTG-415 e DTG-431). Ademais, en modo negativo identificáronse 2 metabolitos máis que no caso da DPG.

Como ocorría no caso da DPG, os compostos foron identificados a través da interpretación do espectro de MS/MS e ademais nos casos dos metabolitos DTG-237, DTG-253, DTG-255 e DTG-271, fíxose unha comparación cos espectros dispoñibles nos estudos de Sieira et al (33).

○ DTG-237

Foi detectado en modo de ionización positivo a tempo de retención 13,2 minutos. Este metabolito só se observa na biotransformación da DTG e o análogo non puido ser identificado no caso da DPG. Púidose comparar cos espectros recollidos en bibliografía pero a coincidencia non é total. De todos xeitos, a coincidencia de certos ións fragmento (Figura 18) e a identificación satisfactoria do metabolito DTG-253 lévanos a deducir que se trata do metabolito ciclado proposto. Obsérvase a perda de metano que no caso dos metabolitos da DTG será unha perda bastante frecuente e que non era posible observar no caso da DPG, debido a que non conta cos grupos metilo nos aneis.

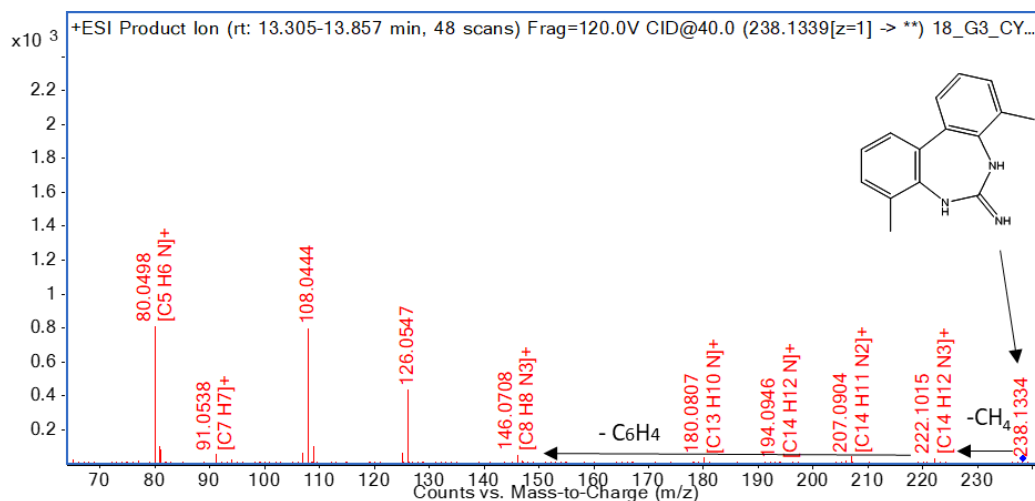


Figura 18. Espectro de MS/MS do DPG-237 en modo positivo con enerxía de colisión 40 V.

○ DTG-253

Foi detectado en modo de ionización positivo a tempo de retención 8,9 minutos. Puido ser identificado a través da comparación bibliográfica, pero debido á imposibilidade de identificar

a posición do grupo hidroxilo, o nivel de confianza co se identificou foi 3. Novamente obsérvase perda de metano (Figura 19). Ademais, o ión fragmento 134,0713 é indicativo de que o grupo hidroxilo se atopa, como en moitos dos casos dos metabolitos anteriormente comentados da DPG, nun dos aneis da estrutura.

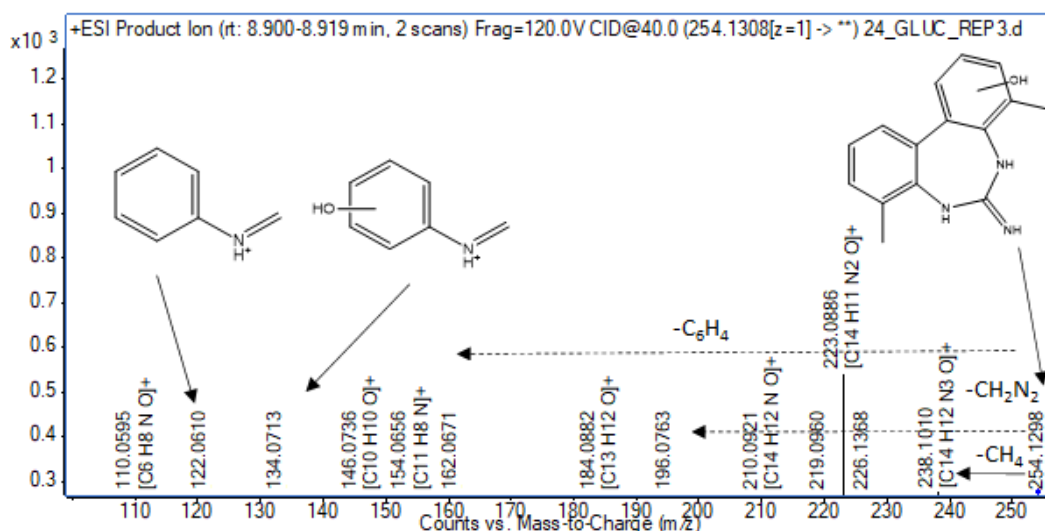


Figura 19. Espectro de MS/MS do DPG-253 en modo positivo con enerxía de colisión 40 V.

○ DTG-255

Este metabolito é o análogo do DPG-227 e foi detectado en ambos modos de ionización, positivo e negativo. Neste caso observouse a separación de 5 isómeros en modo positivo, podendo identificar a estrutura exacta do primeiro dos mesmos mentres que para o resto de isómeros a posición do grupo hidroxilo non foi determinada.

A identificación da estrutura do primeiro dos isómeros que se detectou a tempo de retención 6,8 minutos, baseouse nas primeiras perdas observadas (Figura 20a). Para os 4 isómeros restantes (Figura 20b), a primeira perda observada correspóndese coa perda de amoníaco mentres que neste caso a perda observada é de auga o que nos levou a deducir que o grupo hidroxilo se sitúa enlazado ao grupo amino central segundo se describe na estrutura proposta.

En modo negativo observouse exclusivamente o isómero maioritario debido á perda de intensidade neste modo de ionización (Figura 21).

RESULTADOS E DISCUSIÓN

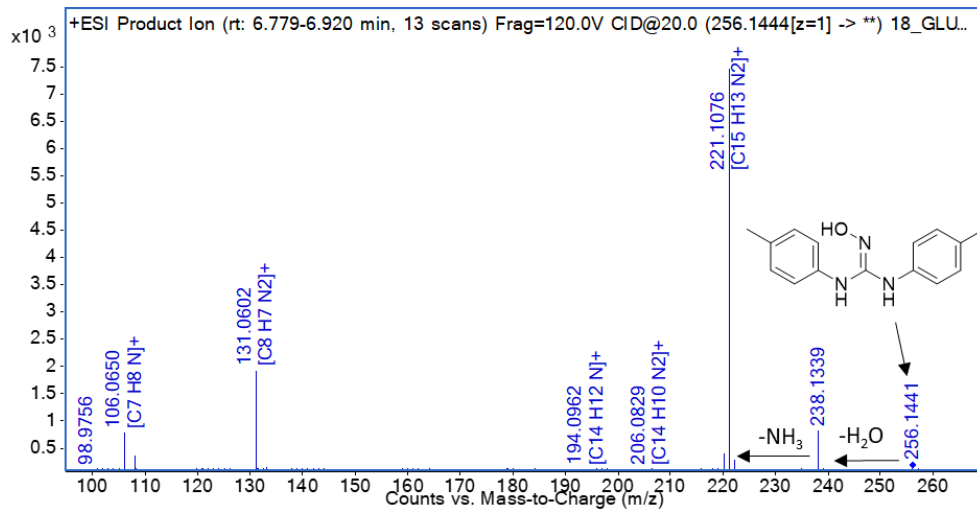
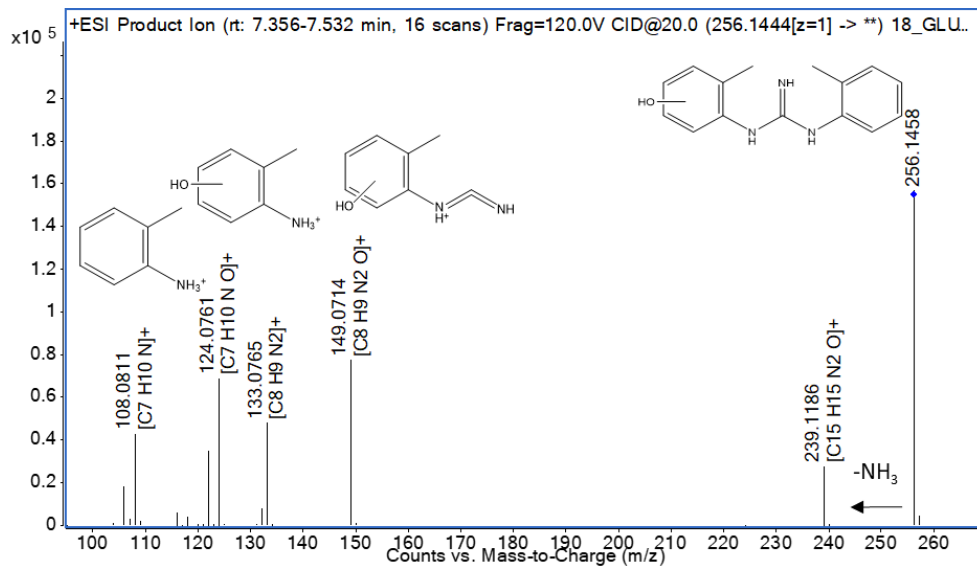
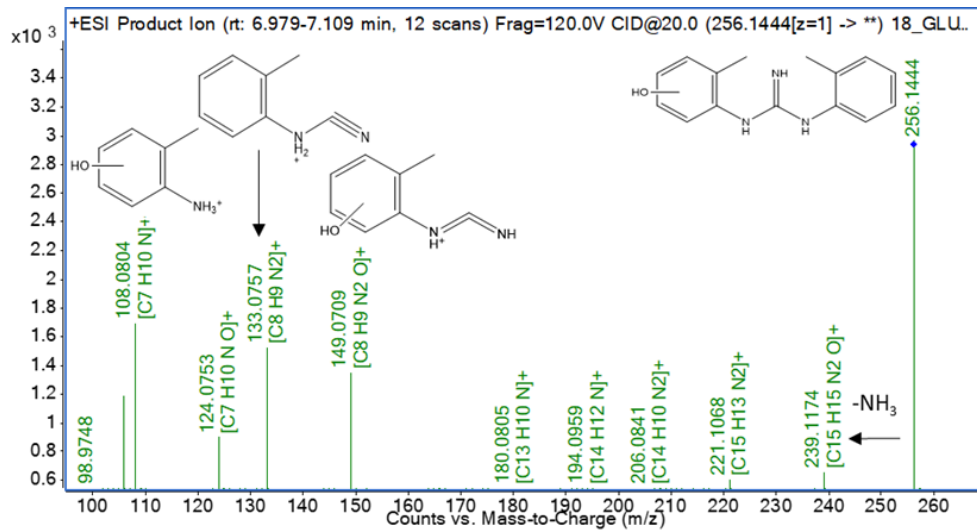


Figura 20a. Espectro de MS/MS del isómero de tiempo de retención 6,8 minutos del DTG-255 en modo positivo con energía de colisión 20 V.



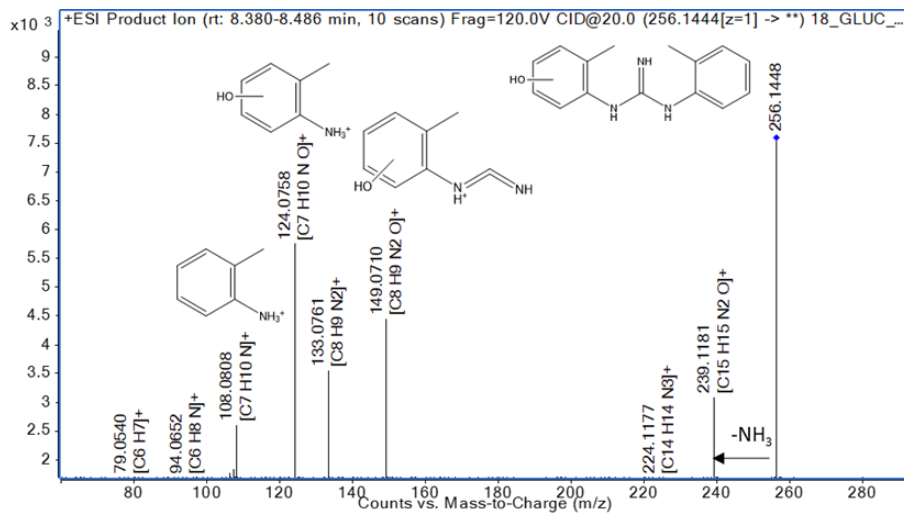
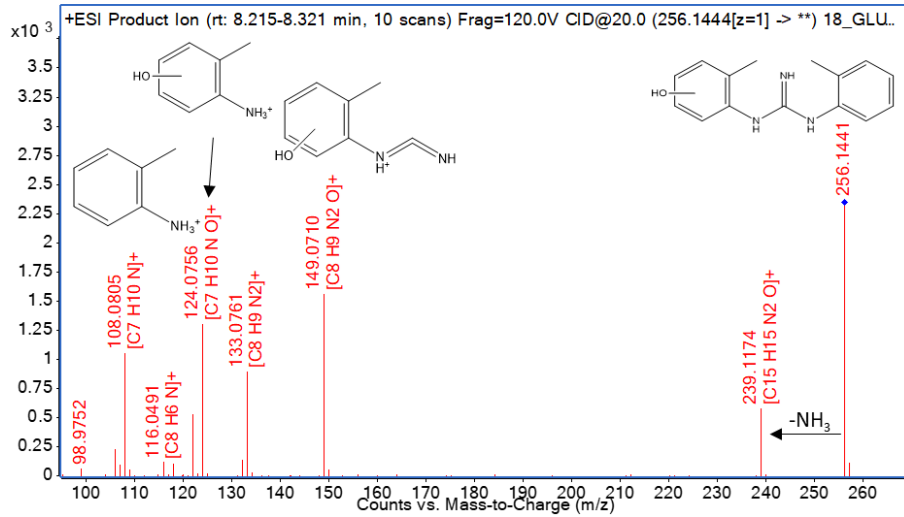


Figura 20b. Espectros de MS/MS dos isómeros do DTG-255 de tempos de retención 7; 7,4; 8,3 e 8,5 respectivamente en modo positivo con enerxía de colisión 20 V.

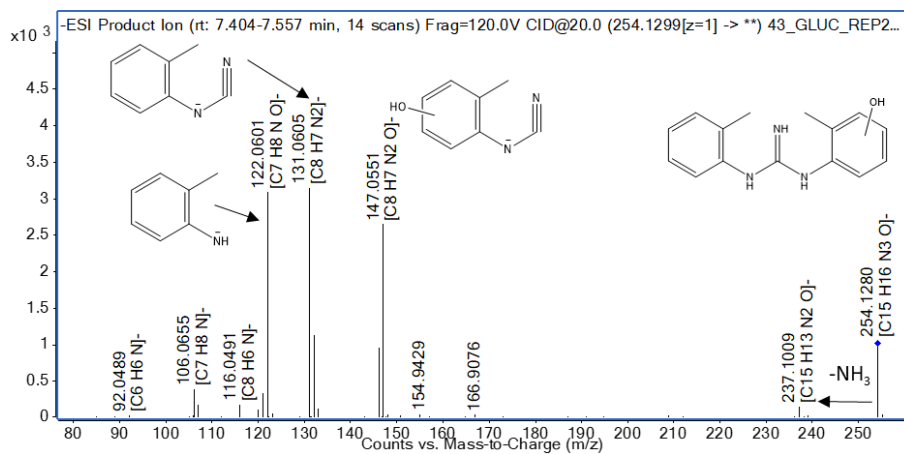


Figura 21. Espectro de MS/MS do DTG-255 en modo negativo con enerxía de colisión 20 V.

○ DTG-256

Este análogo do DPG-228 observouse tanto en ESI (+) como ESI (-) a tempo de retención 11,3 minutos (Figura 22). No modo positivo obsérvase un ión fragmento moi característico (m/z 150,0572) que permitiría a identificación deste metabolito. Con todo, como ocorre coa maioría dos metabolitos identificados, a imposibilidade de localizar o grupo hidroxilo lévanos a un nivel de confianza de 3.

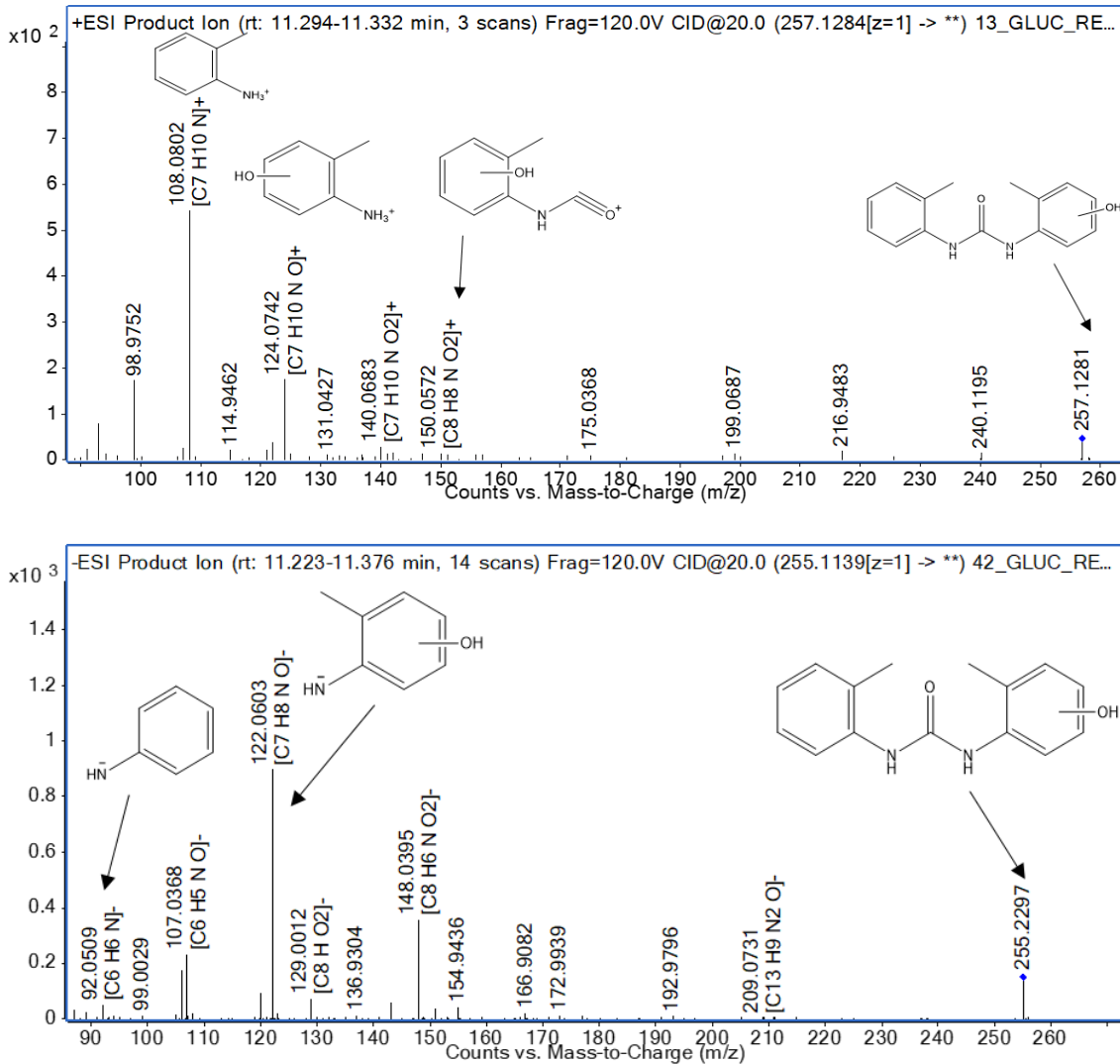


Figura 22. Espectro de MS/MS do DTG-256 en modo positivo e negativo con enerxía de colisión 20 V.

○ DTG-271

Foron detectados dous isómeros deste metabolito, a tempos de retención 5,8 e 7,3 minutos. Tendo en conta ambos isómeros pódese deducir que, debido ás perdas iniciais observadas, no primeiro caso (Figura 23a) é probable que algún dos hidroxilos estea situado sobre o metilo

mentres que no segundo caso (Figura 23b) é probable que ningún dos metilos estea hidroxilado debido a que non se observa perda inicial de auga.

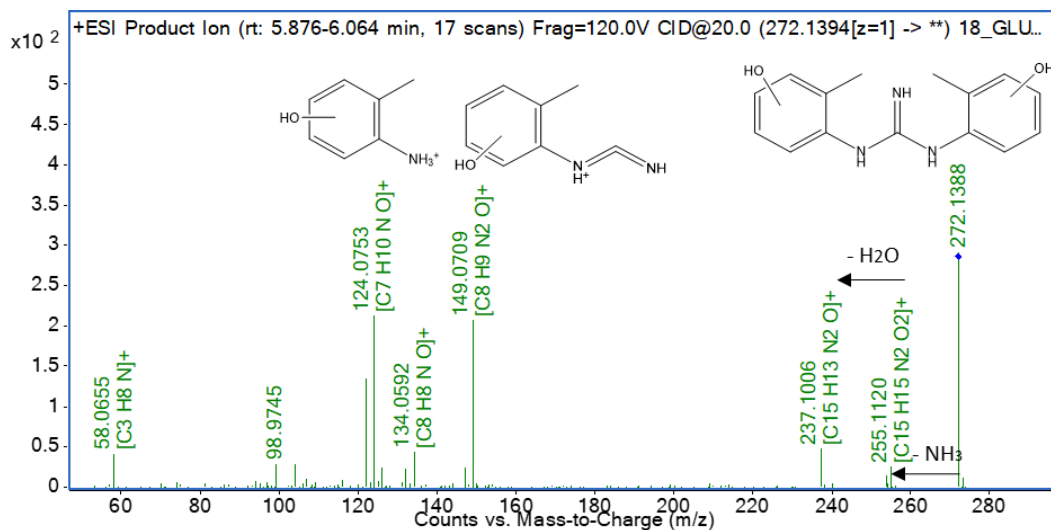


Figura 23a. Espectro de MS/MS do isómero do DTG-255 de tempo de retención 5,8 minutos en modo positivo con enerxía de colisión 20 V.

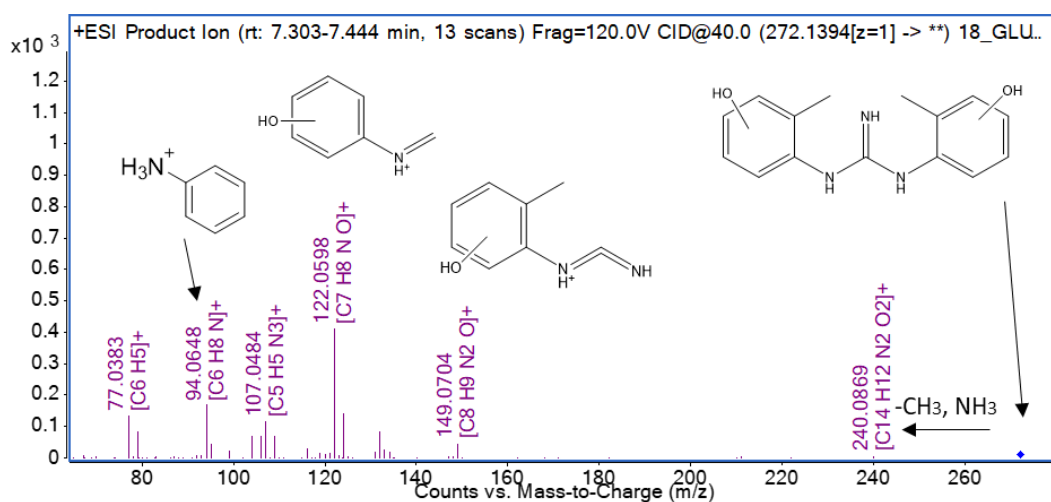


Figura 23b. Espectro de MS/MS do isómero do DTG-255 de tempo de retención 7,3 minutos en modo positivo con enerxía de colisión 40 V.

○ DTG-415

Este metabolito de Fase II é o análogo do DPG-387 e foi detectado a tempo de retención 7,1 minutos en modo positivo. Como no caso do seu análogo, obsérvase a perda do grupo glucurónico (m/z 416,1797 > 240,1474) dando lugar ao fragmento correspondente ao composto precursor DTG (Figura 24).

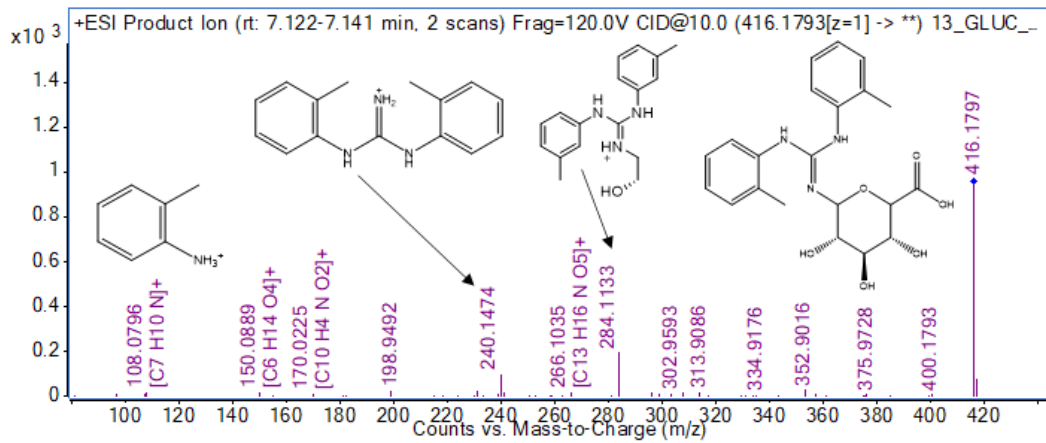


Figura 24. Espectro de MS/MS do DTG-256 en modo positivo con enerxía de colisión 10 V.

○ DTG-431

Por último, determinouse a presenza de dous isómeros deste glucurónido de DTG hidroxilada en modo positivo. No primeiro dos casos (Figura 25a) a perda do grupo glucurónido (m/z 432,1741 > 240,1487) deu lugar ao ión do composto precursor como ocorría no caso anterior polo que se deduciu que neste caso o grupo glucurónido estaba enlazado co grupo hidroxilo adquirido durante a Fase I do metabolismo da DTG.

Pola súa banda, no segundo isómero, tras a perda do grupo glucurónido (m/z 432,1758 > 256,1453), observouse o ión correspondente ao metabolito de Fase I DTG-255 polo que se deduciu que o grupo glucurónido non estaba ligado ao hidroxilo adquirido durante a Fase I senón á amina propia do composto de partida como se mostra na Figura 25.

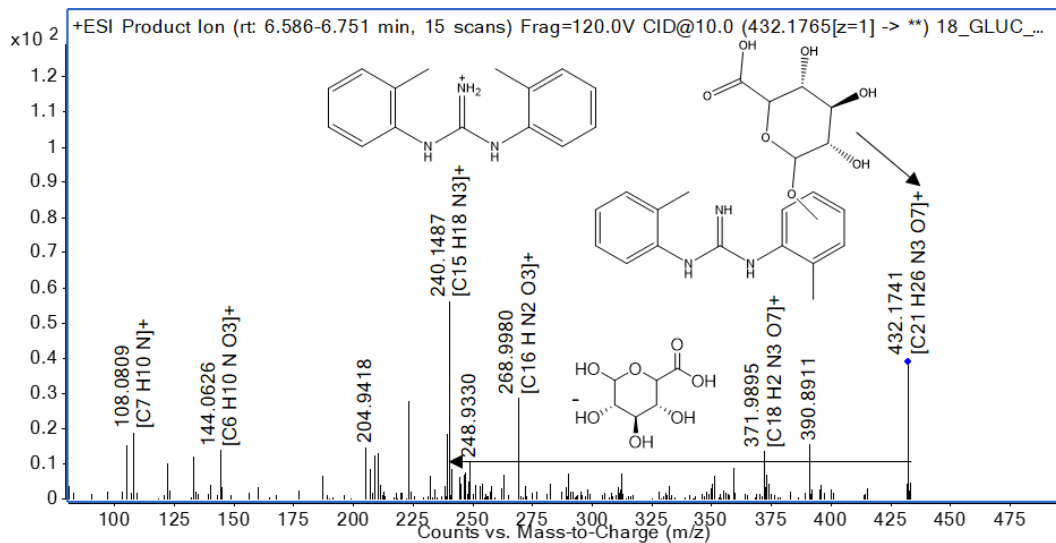


Figura 25a. Espectro de MS/MS do isómero do DTG-431 de tempo de retención 6,6 minutos en modo positivo con enerxía de colisión 10 V.

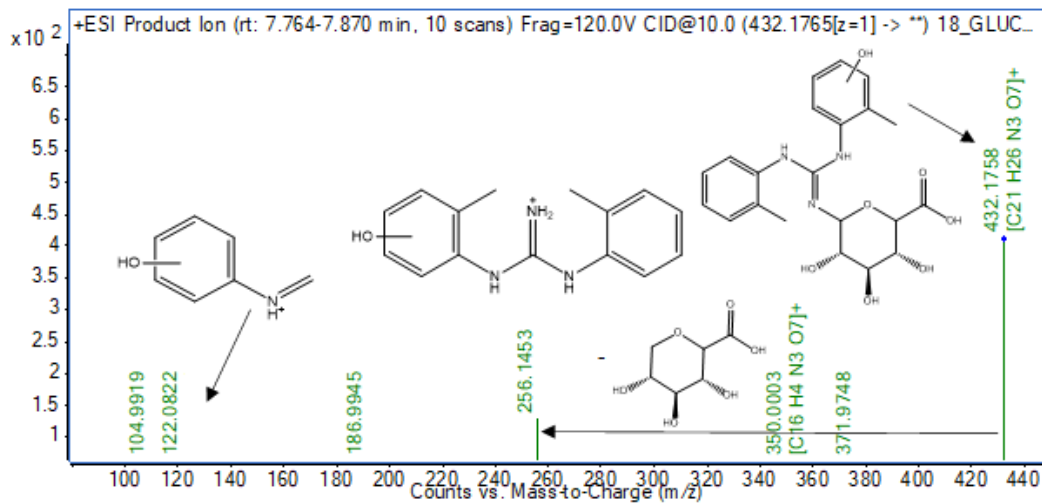
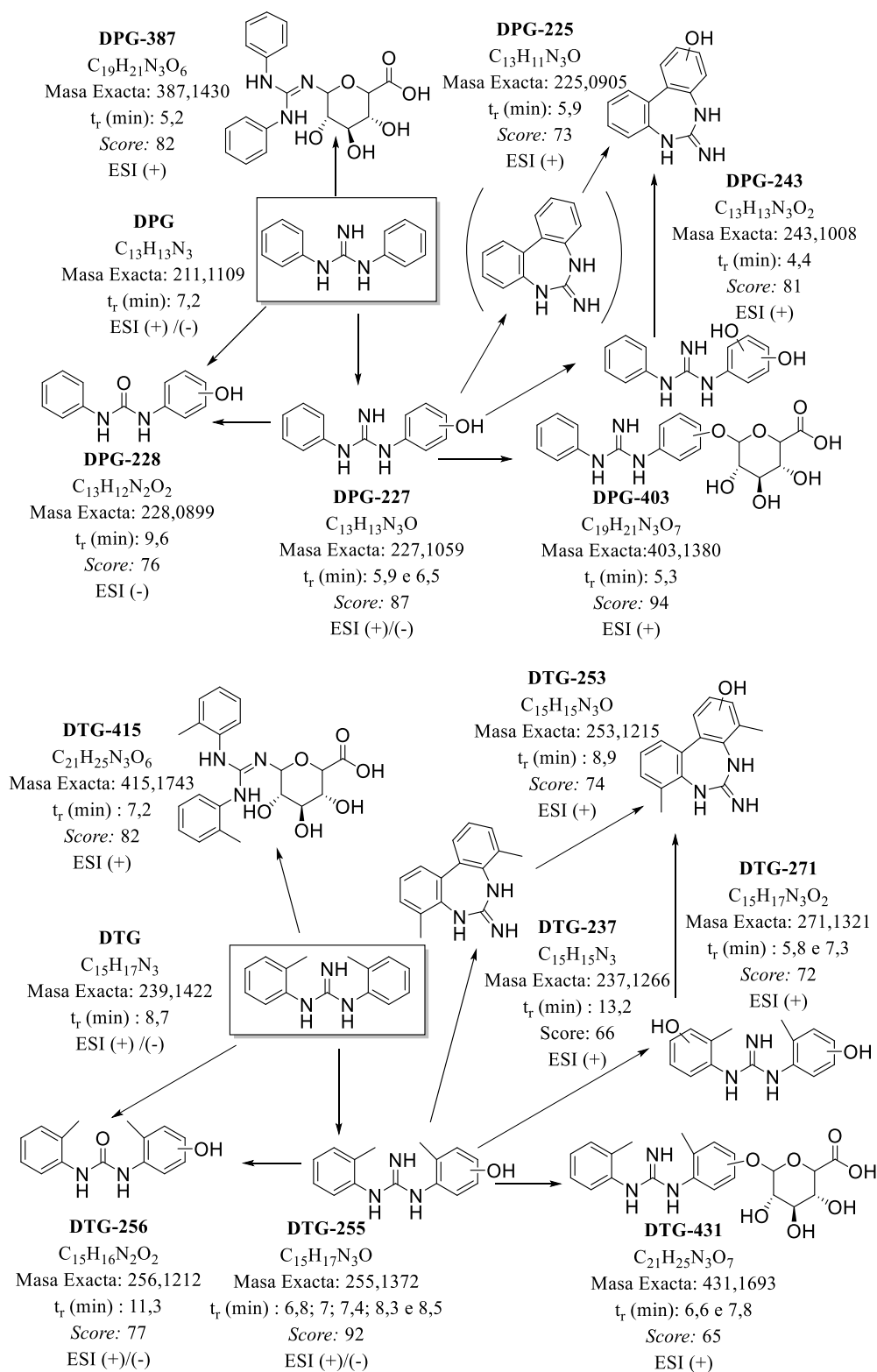


Figura 25b. Espectro de MS/MS do isómero do DTG-431 de tempo de retención 7,8 minutos en modo positivo con enerxía de colisión 10 V.

5.2.3. Rutas de biotransformación metabólica da 1,3-difenilguanidina e da 1,3-di-*o*-tolilguanidina.

Trala identificación dos 6 metabolitos comentados no caso da DPG, propúxose a ruta de biotransformación metabólica que se amosa na Figura 26a. A DPG sufriría varias oxidacións en Fase I que darían lugar por unha banda ao DPG-228 (transformación en urea hidroxilada) e por outra ao DPG-227 (hidroxilación). Este último metabolito sufriría dúas transformacións a maiores típicas de Fase I como é a ciclación (probablemente a través dunha perda de auga dos derivados mono/di-hidroxilados) dando lugar ao composto DPG-225, ou segunda hidroxilación dando lugar ao DPG-243. En Fase II produciríase tanto a glucuronidación da DPG dando lugar ao metabolito DPG-387 como a glucuronidación do metabolito de Fase I DPG-227 para formar o metabolito DPG-403.

Para a DTG a ruta metabólica sería moi similar. A Figura 26b recolle a ruta proposta onde a DTG se oxidaría no metabolismo de Fase I para dar os metabolitos DTG-256 e DTG-255 que posteriormente sufrirá outra hidroxilación (DTG-271) e unha ciclación (DTG-253). Neste caso obsérvase o produto intermedio tras a perda de auga suxerida para o caso análogo da DPG dando lugar ao metabolito (DTG-237). Por último, tanto a DTG como o DTG-255 son glucuronizados no metabolismo de Fase II dando lugar ao DTG-415 e ao DTG-431.



Figuras 26a e 26b. Ruta de biotransformación proposta para a DPG (a) e DTG (b) segundo os ensaios de metabolismo *in vitro*. Como masa exacta indícase a masa monoisotópica da substancia neutra e o *Score* está calculado como a media das mostras que cumprían os requisitos comentados no apartado 4.7.1. para cada composto en calquera dos modos de ionización. O composto entre parénteses da Figura 26a corresponderíase con potencial intermedio non detectado.

5.3. Metabolitos identificados *in vivo*

Tras determinar cales eran os posibles metabolitos a detectar na urina (9 metabolitos de Fase I e 4 metabolitos de Fase II), procedeuse a estudar a presenza dos mesmos nas mostras de ouriños tratados segundo o descrito no apartado 4.4.

Na mostra P2 tratada mediante SPE observouse a presenza do metabolito DTG-256 cun *Score* de 75 (modo positivo). Detectouse a elución dun dos fragmentos máis intensos (m/z 124,0700) ao mesmo tempo de retención que o pico do ión precursor (m/z 257,1294) segundo se mostra na Figura 27 o que implica a moi posible presenza deste metabolito na mostra.

Tamén se observou en modo positivo na mostra P3 da mostra de inxección directa a posible presenza do metabolito DTG-431 pero, debido á coelución dun composto sen identificar, a interpretación do espectro de MS/MS veuse dificultada e non foi posible esclarecer a súa identidade. Así mesmo, en modo positivo na mostra PD3 de inxección directa detectouse a posible presenza do metabolito DPG-228 (é dicir, o análogo para a DPG do composto identificado DTG-256) pero como nos ensaios *in vitro* non se detectou este composto en modo positivo, non se dispón de espectro de referencia para poder determinar se se trata do metabolito ou non.

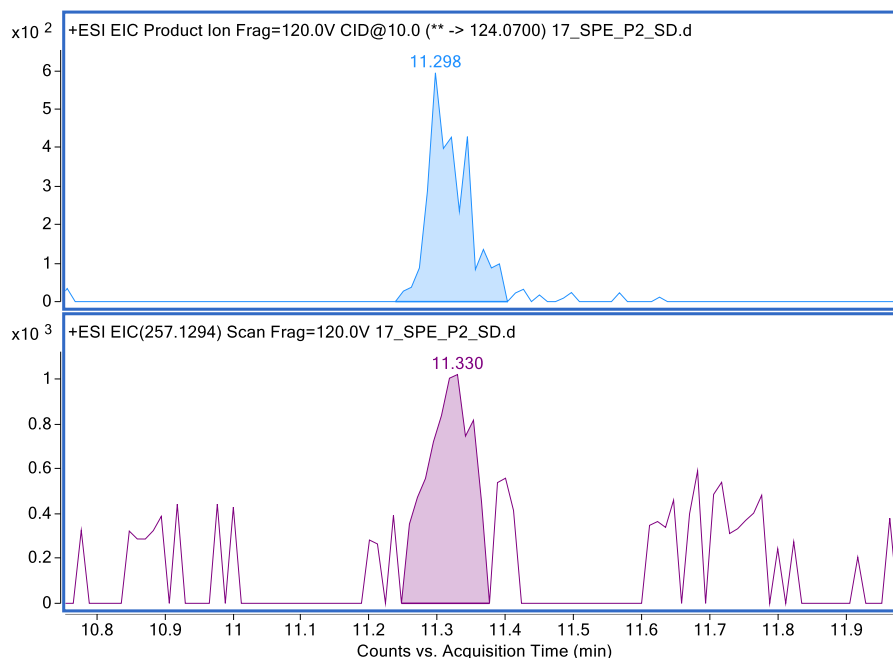


Figura 27. Ión precursor e fragmento do metabolito DTG-256 observado na mostra de urina SPE P2.

A escaseza de metabolitos nas mostras de urina de estudo pode deberse a dous motivos. Por un lado, podería indicar a baixa correlación entre o metabolismo *in vitro* e o metabolismo *in vivo* para estas substancias en concreto.

Por outro lado, podería ser o reflexo dunha baixa exposición da poboación de estudo a estas substancias o que derivaría nunha baixa ou nula concentración dos metabolitos que non sería posible detectar coa instrumentación empregada. Esta explicación tal vez sería a máis probable atendendo aos recentes resultados publicados por Li et al (10).

Con todo, debido ao carácter persistente destes compostos, os resultados obtidos tras este traballo son de grande interese de cara a futuros estudos, xa que de non reducirse a emisión destas substancias ao medio, a exposición ás mesmas podería verse incrementada. Ademais tamén habería que realizar estudos a un maior número de persoas e a aquelas con potencial exposición ocupacional.

6. CONCLUSIÓNS

Galego

A través dos ensaios *in vitro* e a análise de ouriños levados a cabo neste traballo púidose:

- Identificar e elucidar a formación *in vitro* de 4 metabolitos de Fase I e 2 metabolitos de Fase II para a 1,3-difenilguanidina.
- Identificar e elucidar a formación *in vitro* de 5 metabolitos de Fase I e 2 metabolitos de Fase II para a 1,3-di-o-tolilguanidina.
- Propoñer unha ruta de biotransformación metabólica que implica a formación de derivados ciclados, hidroxilados e/ou ureas, e os seus glucurónidos.
- Identificar a presenza dun metabolito de Fase I da 1,3-di-o-tolilguanidina (DTG-256) en mostras de urina sen desconxugar tratadas mediante SPE.

Así pois, este traballo contribúe á estimación fiable da exposición humana á 1,3-difenilguanidina e á 1,3-di-o-tolilguanidina en futuros estudos de biomonitoraxe humana.

English

Through the *in vitro* assays and urine analysis carried out in this work it was possible to:

- Identify and elucidate the *in vitro* formation of 4 Phase I metabolites and 2 Phase II metabolites for 1,3-diphenylguanidine.
- Identify and elucidate the *in vitro* formation of 5 Phase I metabolites and 2 Phase II metabolites for 1,3-di-o-tolylguanidine.
- To propose a metabolic biotransformation pathway involving the formation of cyclic, hydroxylated derivatives and/or ureas and their glucuronides.
- Identify the presence of a Phase I metabolite of 1,3-di-o-tolylguanidine (DTG-256) in SPE-treated urine samples without deconjugation.

Thus, this work contributes to the reliable estimation of human exposure to 1,3-diphenylguanidine and 1,3-di-o-tolylguanidine in future human biomonitoring studies.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) ECHA Substance Information: 1,3-di-o-tolylguanidine. <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.002.344> (Acceso abril 29, 2023).
- (2) ECHA Substance Information: 1,3-diphenylguanidine. <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.002.730> (Acceso abril 29, 2023).
- (3) Schulze, S.; Zahn, D.; Montes, R.; Rodil, R.; Quintana, J. B.; Knepper, T. P.; Reemtsma, T.; Berger, U. Occurrence of emerging persistent and mobile organic contaminants in European water samples. *Water Research* **2019**, *153*, 80-90, DOI: 10.1016/j.watres.2019.01.008.
- (4) Arp, H. P. H.; Brown, T. N.; Berger, U.; Hale, S. E. Ranking REACH registered neutral, ionizable and ionic organic chemicals based on their aquatic persistency and mobility. *Environmental science processes and impacts* **2017**, *19*, 939-955, DOI: 10.1039/c7em00158d.
- (5) Zahn, D.; Mucha, P.; Zilles, V.; Touffet, A.; Gallard, H.; Knepper, T. P.; Frömel, T. Identification of potentially mobile and persistent transformation products of REACH-registered chemicals and their occurrence in surface waters. *Water Research* **2019**, *150*, 86-96, DOI: 10.1016/j.watres.2018.11.042.
- (6) Montes, R.; Rodil, R.; Cela, R.; Quintana, J. B. Determination of Persistent and Mobile Organic Contaminants (PMOCs) in Water by Mixed-Mode Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical chemistry* **2019**, *91*, 5176-5183, DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05792.
- (7) Li, Z.; Kannan, K. Occurrence of 1,3-Diphenylguanidine, 1,3-Di-o-tolylguanidine, and 1,2,3-Triphenylguanidine in Indoor Dust from 11 Countries: Implications for Human Exposure. *Environmental Science and Technology* **2023**, *57*, 6129-6138, DOI: 10.1021/acs.est.3c00836.
- (8) Gil-Solsona, R.; Nika, M.; Bustamante, M.; Villanueva, C. M.; Foraster, M.; Cosin-Tomás, M.; Alygizakis, N.; Gómez-Roig, M. D.; Llurba-Olive, E.; Sunyer, J.; Thomaidis, N. S.;

- Dadvand, P.; Gago-Ferrero, P. The Potential of Sewage Sludge to Predict and Evaluate the Human Chemical Exposome. *Environmental Science and Technology Letter* **2021**, *8*, 1077-1084, DOI: 10.1021/acs.estlett.1c00848.
- (9) Tang, S.; Sun, X.; Qiao, X.; Cui, W.; Yu, F.; Zeng, X.; Covaci, A.; Chen, D. Prenatal Exposure to Emerging Plasticizers and Synthetic Antioxidants and Their Potency to Cross Human Placenta. *Environmental Science and Technology* **2022**, *56*, 8507-8517, DOI: 10.1021/acs.est.2c01141.
- (10) Li, Z.; Kannan, K. Determination of 1,3-Diphenylguanidine, 1,3-Di-o-tolylguanidine, and 1,2,3-Triphenylguanidine in Human Urine Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2023**, *57*, 8883-8889, DOI: 10.1021/acs.est.3c00412.
- (11) Human biomonitoring: facts and figures. *WHO regional office for Europe* **2015**.
- (12) Caldwell, J.; Gardner, I.; Swales, N. An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicologic Pathology* **1995**, *23*, 102-114, DOI: 10.1177/019262339502300202.
- (13) Gibson, G. G.; Skett, P. *Pathways of drug metabolism*; Springer: New York, 2013; pp 1-37.
- (14) Almazroo, O. A.; Miah, M. K.; Venkataramanan, R. Drug Metabolism in the Liver. *Clin. Liver Dis.* **2017**, *21*, 1-20, DOI: 10.1016/j.cld.2016.08.001.
- (15) Petra Jančová; Michal Šiller In *Phase II Drug Metabolism*; IntechOpen: Rijeka, 2012; pp 35-60.
- (16) Lu, J.; Xue, J. *Poisoning: Kinetics to Therapeutics*; Elsevier: Philadelphia, 2019; pp 600-629.
- (17) Garza AZ, Park SB, Kocz R. Drug Elimination. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547662/> (Acceso maio 20, 2023).
- (18) Ioannou, Y. M.; Matthews, H. B. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of 1,3-diphenylguanidine in the male F344 rat. *Fundamental and Applied Toxicology* **1984**, *4*, 22-29, DOI: 10.1016/0272-0590(84)90216-1.

- (19) Fasinu, P.; Bouic, P. J.; Rosenkranz, B. Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies - a review. *Current Drug Metabolism* **2012**, *13*, 215-224, DOI: 10.2174/138920012798918426.
- (20) Siva Nageswara, R. G.; Sakina, A. V.; Dikundwar, A. G.; Sonti, R. In *In vitro Drug Metabolism Studies Using Human Liver Microsomes*; IntechOpen: Rijeka, 2022; pp 1-24.
- (21) Gys, C.; Kovačič, A.; Huber, C.; Lai, F. Y.; Heath, E.; Covaci, A. Suspect and untargeted screening of bisphenol S metabolites produced by in vitro human liver metabolism. *Toxicology Letters* **2018**, *295*, 115-123, DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.05.034.
- (22) Vervliet, P.; Mortelé, O.; Gys, C.; Degreef, M.; Lanckmans, K.; Maudens, K.; Covaci, A.; van Nuijs, A. L. N.; Lai, F. Y. Suspect and non-target screening workflows to investigate the in vitro and in vivo metabolism of the synthetic cannabinoid 5CI-THJ-018. *Drug Testing and Analysis* **2019**, *11*, 479-491, DOI: 10.1002/dta.2508.
- (23) Dhandapani, R. ¿Qué es la HPLC y Cómo Funciona? <https://phenomenex.blog/2022/06/14/que-es-la-hplc/> (Acceso maio 10, 2023).
- (24) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Principios de análisis instrumental; Cengage Learning: Mexico, 2019.
- (25) Somogyi, Á. *Mass spectrometry instrumentation and techniques*; Elsevier: Amsterdam, 2008; pp 93-140.
- (26) Ladislav Wiza, J. Microchannel plate detectors. *Nuclear Instruments and Methods* **1979**, *162*, 587-601, DOI: 10.1016/0029-554X(79)90734-1.
- (27) Hernández, F.; Sancho, J. V.; Ibáñez, M.; Abad, E.; Portolés, T.; Mattioli, L. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *403*, 1251-1264, DOI: 10.1007/s00216-012-5844-7.
- (28) Montes, R.; Aguirre, J.; Vidal, X.; Rodil, R.; Cela, R.; Quintana, J. B. Screening for Polar Chemicals in Water by Trifunctional Mixed-Mode Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry. *Environmental Science and Technology* **2017**, *51*, 6250-6259, DOI: 10.1021/acs.est.6b05135.

- (29) Krasny, L.; Huang, P. H. Data-independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) for proteomic applications in oncology. *Molecular Omics* **2021**, *17*, 29-42, DOI: 10.1039/d0mo00072h.
- (30) Guo, J.; Huan, T. Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. *Analytical Chemistry* **2020**, *92*, 8072-8080, DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05135.
- (31) Krauss, M.; Singer, H.; Hollender, J. LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 943-951, DOI: 10.1007/s00216-010-3608-9.
- (32) Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science and Technology* **2014**, *48*, 2097-2098, DOI: 10.1021/es5002105.
- (33) Sieira, B. J.; Montes, R.; Touffet, A.; Rodil, R.; Cela, R.; Gallard, H.; Quintana, J. B. Chlorination and bromination of 1,3-diphenylguanidine and 1,3-di-o-tolylguanidine: Kinetics, transformation products and toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials* **2020**, *385*, 121590, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121590.
- (34) QSAR Toolbox. <https://qsartoolbox.org/> (Acceso xuño 27, 2023).
- (35) Biotransformer 3.0. <https://biotransformer.ca/> (Acceso xuño 27, 2023).
- (36) GloryX. <https://nerdd.univie.ac.at/gloryx/> (Acceso xuño 27, 2023).
- (37) Meteor Software. <https://www.meteor.com/> (Acceso xuño 27, 2023).

ANEXOS

Táboa A1. Lista de compostos propostos como posibles metabolitos da 1,3-difenilguanidina.

Fórmula	Masa monoisotópica	Abreviatura	SMILE ¹	Fonte ²
C₆H₇N	93,0578	DPG-93	<chem>O/N=C(NC1=CC=CC=C1)/NC2=CC=CC=C2</chem>	QSAR Toolbox
C₆H₅NO	107,0371	DPG-107	<chem>O=Nc1ccccc1</chem>	QSAR Toolbox
C₇H₉N₃	135,0796	DPG-135	<chem>NC(NC1=CC=CC=C1)=N</chem>	QSAR Toolbox/ Bibliografía (33)
C₇H₈N₂O	136,0637	DPG-136	<chem>O=C(N)NC1=CC=CC=C1</chem>	QSAR Toolbox
C₁₂H₁₅N₃S	173,0147	DPG-173	<chem>O=S(NC1=CC=CC=C1)(O)=O</chem>	Propio
C₁₃H₁₁N₃	209,0953	DPG-209	<chem>N=C(NC1=C2C=CC=C1)NC3=C2C=CC=C3.N=C(NC4=C5C=CC=C4)NC6=C5C=CC=C6</chem>	QSAR Toolbox/ Bibliografía (33)
C₁₃H₁₂N₂O	212,095	DPG-212	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1)NC2=CC=CC=C2</chem>	QSAR Toolbox
C₇H₉N₃O₃S	215,0365	MPG-215	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1)NS(=O)(O)=O</chem>	Biotransformer
C₁₃H₁₁N₃O	225,0902	DPG-225	<chem>N=C1NC2=CC=CC=C2C3=CC=C(O)C=C3N1</chem>	Bibliografía (33)
C₁₃H₁₃N₃O	227,1059	DPG-227	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1O)NC2=CC=CC=C2</chem>	GloryX/ Biotransformer/ QSAR Toolbox/ Meteor
C₁₃H₁₂N₂O₂	228,0899	DPG-228	<chem>O=C(NC1=CC=C(O)C=C1)NC2=CC=CC=C2</chem>	Biotransformer/QSAR Toolbox
C₇H₈N₂SO₅	232,0154	DPG-232	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1)NO S(=O)(O)=O</chem>	Propio
C₁₃H₁₁N₃O₂	241,0851	DPG-241	<chem>N=C1NC2=CC(O)=CC=C2C3=CC=C(O)C=C3N1</chem>	Propio
C₁₃H₁₃N₃O₂	243,1008	DPG-243	<chem>N=C(NC1=CC=C(O)C=C1)NC2=CC=C(O)C=C2</chem>	Biotransformer/QSAR Toolbox/Meteor
C₁₃H₁₂N₂O₃	244,0848	DPG-244	<chem>O=C(NC1=CC=C(O)C=C1)NC2=CC=C(O)C=C2</chem>	Propio
C₁₂H₁₃N₃O₃	247,0957	DPG-247	<chem>OC1=C(C=CC=C1O)N=C(N)NC2=[OH]C=CC=C2</chem>	Biotransformer
C₁₃H₁₃N₃O₃	259,0957	DPG-259	<chem>OC1=CC=C(O)C(NC(NO)=NC2=CC=CC=C2)=C1</chem>	Biotransformer
C₁₂H₁₅NO₆	269,0899	DPG-269	<chem>OC(C([C@@H])([C@H])([C@@H]1O)O)OC1NC2=CC=CC=C2)=O</chem>	Propio
C₁₃H₁₁N₃O₃S	289,0521	DPG-289	<chem>O=S(/N=C1NC2=CC=CC=C2C3=CC=CC=C3N1)(O)=O</chem>	Propio

¹ Está representado un dos posibles metabolitos para cada masa monoisotópica.² Con "Propio" facemos referencia a metabolitos que foron propostos polo grupo atendendo á variedade de reaccións que teñen lugar durante o metabolismo.

Fórmula	Masa monoisotópica	Abreviatura	SMILE ¹	Fonte ²
C₁₃H₁₃N₃O₃S	291,0678	DPG-291	<chem>O=S(/N=C(NC1=CC=CC=C1)\NC2=CC=CC=C2)(O)=O</chem>	Propio
C₁₃H₁₁N₃O₄S	305,047	DPG-305	<chem>N=C1NC2=CC(OS(=O)(O)=O)=CC=C2C3=CC=CC=C3N1</chem>	Propio
C₁₃H₁₇N₃O₆	311,1117	DPG-311	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1)NC2OC(C(O)=O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]2O</chem>	Propio
C₁₃H₁₆N₂O₇	312,0958	DPG-312	<chem>O=C(NC1[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)C(C(O)=O)O1)NC2=CC=CC=C2</chem>	Propio
C₁₉H₂₁O₆N₃	387,1430	DPG-387	<chem>OC(C([C@@H]([C@H]([C@@H]1O)O)O)OC1/N=C(NC2=CC=CC=C2)/NC3=C(C=CC=C3)=O</chem>	GloryX/Meteor
C₁₉H₁₉N₃O₇	401,1223	DPG-401	<chem>N=C1NC2=CC(OC3OC(C(O)=O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]3O)=CC=C2C4=CC=CC=C4N1</chem>	Propio
C₁₉H₂₁N₃O₇	403,1380	DPG-403	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1)NC2=CC=C(C=C2)OC3OC(C(O)=O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]3O</chem>	Meteor

Táboa A2. Lista de compostos propostos como posibles metabolitos da 1,3-di-o-tolilguanidina.

Fórmula	Masa monoisotópica	Abreviatura	SMILE ³	Fonte ⁴
C₇H₉N	107,0735	DTG-107	<chem>NC1=CC=CC=C1C</chem>	QSAR Toolbox
C₇H₇NO	121,0528	DTG-121	<chem>NC1=CC=CC=C1C=O</chem>	Propio
C₇H₉NO	123,0684	DTG-127	<chem>NC1=CC=CC=C1CO</chem>	Propio
C₇H₇NO₂	137,0477	DTG-137	<chem>NC1=CC=CC=C1C(O)=O</chem>	Propio
C₈H₁₁N₃	149,0953	DTG-149	<chem>NC(NC1=CC=CC=C1C)=N</chem>	QSAR Toolbox/ Bibliografía (33)
C₈H₁₀N₂O	150,0793	DTG-150	<chem>O=C(N)NC1=CC=CC=C1C</chem>	QSAR Toolbox
C₈H₉N₃O	163,0746	DTG-163	<chem>NC(NC1=CC=CC=C1C([H])=O)=N</chem>	Propio
C₈H₁₁N₃O	165,0902	DTG-165	<chem>NC(NC1=CC=CC=C1CO)=N</chem>	Propio
C₈H₁₀N₂O₂	166,0742	DTG-166	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1CO)N</chem>	Propio

³ Está representado o SMILE dun dos posibles isómeros para cada masa monoisotópica.⁴ Con "Propio" facemos referencia a metabolitos que foron propostos polo grupo atendendo á variedade de reaccións que teñen lugar durante o metabolismo.

Fórmula	Masa monoisotópica	Abreviatura	SMILE ³	Fonte ⁴
C₈H₉N₃O₂	179,0695	DTG-179	<chem>NC(NC1=CC=CC=C1C(O)=O)=N</chem>	Propio
C₈H₈N₂O₃	180,0535	DTG-180	<chem>O=C(N)NC1=CC=CC=C1C(O)=O</chem>	Propio
C₇H₉NO₃S	187,0303	DTG-187	<chem>CC1=CC=CC=C1NS(=O)(O)=O</chem>	Propio
C₈H₈N₂O₄	196,0484	DTG-196	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1C=O)N</chem>	Propio
C₈H₁₁N₃O₃S	229,0521	DTG-229	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1)NS(=O)(O)=O</chem>	Propio
C₁₅H₁₅N₃	237,1266	DTG-237	<chem>N=C(NC1=C2C=CC=C1C)NC3=C2C=CC=C3C.N=C(NC4=C5C=CC=C4C)NC6=C5=CC=C6C</chem>	QSAR Toolbox/ Bibliografía (33)
C₁₅H₁₆N₂O	240,1263	DTG-240	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1)NC2=CC=CC=C2</chem>	QSAR Toolbox
C₈H₁₀N₂SO₅	246,0310	DTG-246	<chem>O=C(N)NC1=CC=CC=C1COS(=O)(O)=O</chem>	Propio
C₁₅H₁₃N₃O	251,1059	DTG-251	<chem>C=C1/C(NC(NC2=C(C)C=C(C=C12)=N)=C(C=O)\C</chem>	Propio
C₁₅H₁₅N₃O	253,1215	DTG-253	<chem>N=C1NC2=C(C)C=CC=C2C3=CC=CC(CO)=C3N1</chem>	Bibliografía
C₁₅H₁₄N₂O₂	254,1055	DTG-254	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1)NC2=CC=CC=C2C=O</chem>	QSAR Toolbox
C₁₅H₁₇N₃O	255,1371	DTG-255	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1CO)NC2=CC=CC=C2C</chem>	GloryX/ Biotransformer/ QSAR Toolbox/ Meteor
C₁₅H₁₆N₂O₂	256,1212	DTG-256	<chem>O=C(NC1=CC=C(O)C=C1)NC2=CC=CC=C2</chem>	Propio
C₁₅H₁₃N₃O₂	267,1008	DTG-267	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1C=O)NC2=CC=CC=C2C=O</chem>	Propio
C₁₅H₁₂N₂O₃	268,0848	DTG-268	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1C=O)NC2=CC=CC=C2C=O</chem>	Propio
C₁₅H₁₅N₃O₂	269,1164	DTG-269	<chem>OCC1=C2NC(NC3=C(CO)C=CC=C3C2=CC=C1)=N</chem>	Propio
C₁₅H₁₄N₂O₃	270,1004	DTG-270	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1)NC2=CC=CC=C2C(O)=O</chem>	QSAR Toolbox
C₁₅H₁₇N₃O₂	271,1321	DTG-271	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1CO)NC2=CC=CC=C2CO</chem>	QSAR Toolbox/ Meteor

Fórmula	Masa monoisotópica	Abreviatura	SMILE ³	Fonte ⁴
C₁₅H₁₆N₂O₃	272,1161	DTG-272	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1CO)N C2=CC=CC=C2CO</chem>	Propio
C₁₅H₁₃N₃O₃	283,0957	DTG-283	<chem>OC(C1=C2NC(NC3=C(C)C= CC=C3C2=CC=C1)=N)=O</chem>	Propio
C₁₃H₁₇NO₆	283,1056	DTG-283*	<chem>CC1=CC=CC=C1NC2OC([C @@H]([C@H]([C@@H]2O) O)O)C(O)=O</chem>	Propio
C₁₅H₁₅N₃O₃	285,1113	DTG-285	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1C(O) =O)NC2=CC=CC=C2CO</chem>	Propio
C₁₅H₁₄N₂O₄	286,0954	DTG-286	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1CO)N C2=CC=CC=C2C(O)=O</chem>	Propio
C₁₅H₁₃N₃O₄	299,0906	DTG-299	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1C(O) =O)NC2=CC=CC=C2C(O)= O</chem>	Propio
C₁₅H₁₂N₂O₅	300,0746	DTG-300	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1C(O) =O)NC2=CC=CC=C2C(O)= O</chem>	Propio
C₁₅H₁₇N₃O₃	312,0958	DTG-312	<chem>N=C(NC1=CC=CC(O)=C1C O)NC2=CC=CC=C2CO</chem>	Biotransformer
C₁₅H₁₇N₃O₃S	319,0991	DTG-319	<chem>CC1=CC=CC=C1N/C(NC2= CC=CC=C2C)=N\S(=O)(O)= O</chem>	Propio
C₁₄H₁₉N₃O₆	325,1274	DTG-325	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1C)NC 2OC(C(O)=O)[C@H](O)[C@ @H](O)[C@@H]2O</chem>	Propio
C₁₄H₁₈N₂O₈	342,1063	DTG-342	<chem>O=C(NC1=CC=CC=C1COC 2[C@H]([C@@H]([C@H](C (O2)C(O)=O)O)O)O)N</chem>	Propio
C₂₁H₂₅O₆N₃	415,1743	DTG-415	<chem>CC1=CC=CC=C1N/C(NC2= CC=CC=C2C)=N/C3OC([C @@H]([C@H]([C@@H]3O) O)O)C(O)=O</chem>	GloryX/ Meteor
C₂₁H₂₅N₃O₇	431,1693	DTG-431	<chem>N=C(NC1=CC=CC=C1COC 2OC([C@@H]([C@H]([C@ @H]2O)O)O)C(O)=O)NC3= CC=CC=C3C</chem>	Meteor
C₂₁H₂₅N₃O₈	447,1642	DTG-447	<chem>CC1=CC=CC=C1NC(NC2=C C=C(O)C=C2COC3C(O)C(O)C(O)C(O3)C(O)=O)=N</chem>	Meteor