



FACULTAD
DE BIOLOGÍA

GRADO EN BIOLOGÍA
Curso Académico 2022-2023

Trabajo de Fin
de Grado

Estudio del metabolismo *in-vitro* de
sustancias relacionadas con la
producción de caucho

Autor

Iago Riveiro Rodríguez

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción	1
3. Objetivos	4
4. Metodología	5
4.2 Metodología de los estudios <i>in-vitro</i>	6
4.2.1 Procedimiento.....	6
4.2.2 Condiciones de medida.....	8
4.2.3 Tratamiento de datos.....	10
4.3 Metodología de los análisis de orina	10
4.3.1 Procedimiento experimental.....	10
4.3.2 Condiciones de medida.....	11
4.3.3 Tratamiento de datos.....	11
5 Resultados y discusión	12
5.1 Resultados del metabolismo <i>in-vitro</i>	12
5.2 Posible ruta metabólica.....	17
5.3 Resultados de los análisis de las muestras de orina.....	18
6 Conclusiones	18
7 Bibliografía	19
Material suplementario	A

1. Resumen

La 1,3-difenilguanidina es un compuesto ampliamente utilizado en los procesos de vulcanización del caucho. Diferentes estudios han reportado su presencia en el medioambiente, (polvo, aguas, aire...), así como toxicidad en diferentes especies animales. Debido a esto, sería interesante utilizar técnicas de biomonitorización para poder evaluar la exposición del ser humano a esta sustancia. Para poder llevar esto a cabo es necesario conocer los metabolitos resultantes a su paso por el organismo. Los metabolitos de esta sustancia no han sido descritos todavía, por eso, en este proyecto se realizan ensayos *in-vitro* para intentar obtener estos posibles metabolitos. Estos se buscaron mediante *screening* con cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (en tándem) de alta resolución y se identificaron un total de seis metabolitos. Una vez conocidos esos posibles metabolitos se realizaron análisis de orina de unas muestras de voluntarios para determinar su presencia en humanos, sin detectar ninguno de ellos.

2. Introducción

Debido a la enorme producción de sustancias químicas orgánicas que se da en la actualidad, los seres humanos, así como otros muchos organismos, se ven expuestos a una gran variedad de compuestos, muchos de los cuales pueden tener efectos negativos sobre la salud. Por ello, es habitual utilizar técnicas de biomonitorización para evaluar el nivel de exposición, y por lo tanto el riesgo potencial que estas suponen, entendiendo por dichas técnicas el análisis de muestras de tejidos o fluidos biológicos.

La orina presenta varias ventajas para este tipo de análisis, ya que es fácil de obtener y las técnicas de obtención de esta no son nada invasivas, pero para poder realizar este tipo de estudios es necesario conocer cuál es la sustancia excretada, pudiendo ser la molécula original y/o sus metabolitos de fase I o fase II.

En este trabajo se estudiará el metabolismo de un compuesto utilizado en el proceso de vulcanización del caucho, la 1,3-difenilguanidina (DPG), y su presencia en muestras de orina. La estructura de esta molécula se muestra en la figura 1.

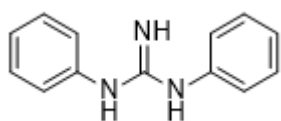


Figura 1: Estructura de la DGP.

El metabolismo engloba una gran cantidad de reacciones bioquímicas, las cuales suelen estar catalizadas por enzimas, permitiendo la producción de las biomoléculas esenciales y la energía necesaria para el mantenimiento de las células (1). Todos aquellos productos de una determinada reacción metabólica se denominan metabolitos. Por otra parte, los compuestos xenobióticos son todos aquellos compuestos que son exógenos a los animales. El término engloba una enorme variedad de sustancias, constituyentes de vegetales, drogas, pesticidas, productos químicos industriales, etc. Se estima que los seres humanos se exponen a un total de 1-3 millones de compuestos xenobióticos a lo largo de su vida. La mayoría de estos compuestos llegan a los organismos a través de la dieta, del aire o del agua. Estas moléculas son sometidas a procesos metabólicos de detoxificación que, en general, darán lugar a moléculas menos tóxicas y más polares, lo que las hace más fáciles de excretar (2).

Normalmente, el metabolismo de estos compuestos implica una fase I donde las moléculas apolares se convierten en compuestos polares mediante reacciones de oxidación-reducción (ej. hidroxilaciones) y una fase II donde se unen algunas pequeñas moléculas (por ejemplo, ácido glucurónico o sulfatos). (3, 4)

Todas estas reacciones, que ocurren de manera natural (*in vivo*) en el organismo pueden replicarse de manera simulada en el laboratorio, lo que constituye el denominado metabolismo *in-vitro*. En las últimas décadas se han desarrollado numerosos modelos *in-vitro* del metabolismo del hígado, dentro de los cuales se incluyen el citosol y los microsomas. Los microsomas de hígado humano son fracciones subcelulares derivadas del retículo endoplasmático hepático. Suelen usarse para simular reacciones de la fase I (con adición de NADP, nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato, como cofactor) y algunas de fase II, como la glucuronidación (la UGT está presente en estos microsomas y requiere de UDPGA, ácido uridín difosfato glucurónico, como cofactor). Las fracciones citosólicas del hígado contienen numerosas enzimas de fase II (por ejemplo, sulfotransferasas, ST). Los cofactores necesarios para el funcionamiento de estas enzimas tienen que ser añadidos.(4)

La DPG es un producto químico sintético utilizado en el proceso de vulcanización del caucho y otros polímeros. El uso de estos materiales está ampliamente extendido y podemos encontrarlos en la producción de neumáticos, materiales de construcción, suelos, muebles, juguetes, productos de cuero, calzado, material de electrónica y guantes.

La producción de la DPG se estima entre 1.000 y 10.000 toneladas anuales (datos para Europa en el 2018) (5). Este compuesto puede pasar al medio ambiente desde los materiales en los que se encuentran, por lo que existe una exposición potencial del ser humano a estos. Se han realizado estudios en modelos animales (6) en los que se vio como tras una ingesta oral (1,5-150 $\mu\text{mol/kg}$) la DPG era rápidamente absorbida por el intestino, seguida por una rápida distribución en todo el cuerpo y su posterior metabolización (6). Tanto los metabolitos como sus compuestos precursores fueron excretados en orina y heces, aunque no se identificó la estructura de los metabolitos. El tiempo de vida media de la DPG en este estudio fue de 9,6 h (6). Otros estudios toxicológicos indican que las partículas generadas por el desgaste de los neumáticos que contienen DPG son tóxicas para los embriones de *Pimephales promelas* (carpa cabezona) (6). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) también predice propiedades neurotóxicas y como disruptor endocrino para la DPG (6). En cuanto a la biomonitorización de estos compuestos, un estudio indicó la presencia de la DPG en el suero materno y el cordón umbilical con unas concentraciones de 1,7 y 0,35 ng/mL, respectivamente (6), y otro más reciente encontró concentraciones en orina de voluntarios de la ciudad de Nueva York (USA) en el rango 0,02-0,79 ng/mL (7). También hay estudios epidemiológicos y clínicos que establecen relación entre la exposición a la DPG y la dermatitis alérgica de contacto (6).

Por otra parte, la presencia de este compuesto se ha estudiado en el polvo de interiores en varios países y se vio que la DPG estaba presentes en el 100% de las muestras con una concentración media de 140 ng/g (8). También se ha encontrado DPG en agua de lluvia, (a nivel de 60 $\mu\text{g/L}$) y procedente de nieve derretida (a nivel de 1 $\mu\text{g/L}$) (8). En estudios de aguas superficiales en varios países europeos se detectó DPG en el 100% (9) de las muestras analizadas.

Debido a esto, se cree importante identificar la presencia de la DPG en humanos, pero para ello es necesario conocer los metabolitos derivados de esta sustancia, para, una vez conocidos, proceder con a su detección mediante técnicas de biomonitorización.

La hipótesis de este trabajo es que la DPG tiene un metabolismo *in vivo* comparable al metabolismo *in-vitro* y que este dará lugar a uno metabolitos determinados, los cuales se podrán encontrar en muestras de orina, en caso de exposición a dicha sustancia.

Para poder llevar a cabo el análisis del metabolismo *in-vitro* y de las muestras de orina se emplearán técnicas de *screening* mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS)

Se conoce como *screening* al conjunto de metodologías analíticas destinadas a identificar un grupo de analitos en una muestra inicial. Este tipo de análisis pretende hacer una clasificación de si/no respecto de la presencia de determinados analitos en una muestra.
(10)

La HPLC-MS/MS es una de las mejores técnicas que existen actualmente para el análisis de biomoléculas tales como proteínas o metabolitos, además de que se pueden aplicar tanto para muestras provenientes de sistemas biológicos modelo o de muestras clínicas como fluidos o tejidos.(11)

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es identificar los principales metabolitos humanos de la DPG mediante metabolismo *in-vitro* combinado con técnicas de *screening* con un sistema HPLC-MS/MS, para posteriormente evaluar su potencial presencia en muestras de orina humanas.

Para poder lograr los objetivos propuestos se estructura el siguiente plan de trabajo:

- Realización de experimentos de metabolismo (fase I y de fase II) *in-vitro* de las sustancias.
- Inyección de las disoluciones conteniendo los productos de reacción (metabolitos) en el sistema HPLC-MS/MS para proceder a su análisis mediante un abordaje de tipo *suspect screening*.
- Creación de la lista de sospechosos (*suspect list*) utilizando para ello diferentes softwares (QSAR Toolbox, GloryX y BioTransformer) que generan *in silico* múltiples posibles metabolitos de las sustancias de partida.
- Procesado de datos e identificación de los posibles metabolitos en las disoluciones de fase I y fase II, realizando si es preciso análisis adicionales en modo *target* e interpretando los espectros obtenidos.
- Análisis de muestras reales de orina para verificar si dichos metabolitos están presentes *in vivo*.

4. Metodología

4.1 Materiales, reactivos y patrones

- Microtubos
- Micropipetas y puntas
- Pipetas pasteur
- Jeringas de plástico desechables
- Filtros de jeringa Clarify (PFTE, 13mm, 0,2µm, *Phenomenex*)
- Microcentrífuga
- Viales de vidrio para LC
- pHmetro
- Horno
- Termómetro
- Etiquetas
- Cronómetro
- Viales y frascos para conservar las disoluciones
- Jeringas
- Cartuchos Oasis HLB 200 mg
- Colector de vacío Visiprep para SPE
- Estación de secado Visidry con corriente de N₂
- Tubos de vidrio para TurboVap
- Sistema de concentración MiniVap (Supelco)
- Agua ultrapura
- Disolución de stock de DPG en DMSO (97% pureza)
- Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Sigma Aldrich)
- Ácido fórmico LCMS (Scharlab)
- Acetonitrilo LCMS (Fischer)
- Irbesartán-d4-IS-(+)(-) (Caymanchem)
- Fenacetina (Sigma-Aldrich)
- Ácido uridín difosfato glucurónico (UDPGA) (Sigma-Aldrich)
- PAPs ()
- Alamecina (Sigma Aldrich)
- 4-nitrofenol (Sigma-Aldrich)
- HLM 20 mg/mL (Xenotech)
- HLCYP10 mg/mL (Xenotech)
- Base trizma (2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) (Sigma Aldrich)
- HCl 1M
- MdCl₂·6H₂O (Sigma Aldrich)
- Metanol LCMS (Fisher)
- Ácido fórmico LCMS (Scharlab)

4.2 Metodología de los estudios *in-vitro*

4.2.1 Procedimiento

En primer lugar se prepararon los reactivos y sustancias necesarias para poder llevar a cabo las reacciones de acuerdo con el protocolo descrito en *Gys, Celine y col.* (12).

Para la disolución sustrato se utilizó directamente disolución de stock de la DPG, 1780 µg/mL,

Para la preparación de la disolución tampón de TRIS-HCl 100 mM se pesaron 1,22801 g de base trizma y 0,111000 g de MgCl₂ hexahidratado. La reacción tiene lugar a 37°C, por lo que el tampón debe prepararse a esta temperatura para evitar variaciones del pH. En el horno se calentaron 80 mL de agua ultrapura en un vaso de precipitados y se añadieron la base trizma y el MgCl₂ y se volvió a calentar hasta la temperatura deseada. Una vez alcanzada, se coloca un termómetro y se añade HCl 1 M poco a poco con una pipeta pasteur mientras se agita. Hay que comprobar a cada momento el pH y la temperatura, si esta baja de los 37°C hay que volver a calentar. Una vez alcanzado el pH deseado (pH=7,52) se añadió agua ultrapura hasta los 100 mL de volumen total de disolución y se calentó nuevamente hasta 37 °C, se comprobó el pH (7,5) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Antes de comenzar el proceso, se preparó la disolución de parada, consistente en 1% v/v de ácido fórmico en acetonitrilo con 5 mg/mL de irbesartán-d4 (empleado como patrón interno) y las disoluciones de NADPH (0.08 mg/uL) y fenacetina (100 ug/mL) en agua ultrapura y UDPGA (1mM), PAPs (10 mM) y 4-NP (1mM) en disolución tampón.

Una vez preparadas las disoluciones necesarias se irán simulando las reacciones. Primero se etiquetan los microtubos adecuadamente y se añaden los reactivos. Los volúmenes añadidos, así como los tiempos a los que se añaden se resumen en las tablas A1, A2 y A3 (material suplementario). La primera muestra se corresponde con el control positivo, un compuesto cuyo metabolismo se conoce que es de fase I, la fenacetina, se utilizará para comprobar que las reacciones se han realizado correctamente. Los experimentos 2 al 7 corresponden a controles negativos a los cuales no se les añade el sustrato, el cofactor o los HLM, se utilizarán para descartar posibles compuestos interferentes. Se hace un control negativo para ambos tiempos, 1 y 3 horas. Las muestras de la 8 a la 13 son las réplicas, se hacen 3 a cada tiempo (1 y 3 h).

Para los ensayos de fase II las muestras 14, 15, 22 y 23 son controles negativos donde no se añade cofactor o sustrato. Las muestras 19 y 27 constituyen el control positivo con el 4-nitrofenol y las muestras 16, 17, 18, 24, 25 y 26 constituyen las réplicas. Se realizan también dos réplicas de solo fase II (20, 21, 28 y 29) para comprobar si se forma algún metabolito solo durante estas reacciones metabólicas.

Los microtubos se colocan dentro del horno a 37°C durante todo el experimento y los cofactores se almacenarán a 4° C mientras no se están utilizando.

Primero se hacen las reacciones de fase I (tabla 4), tanto las que son solo de esta fase como las que van a continuar a la fase II. En primer lugar, hay que añadir el volumen de disolución tampón necesaria a cada microtubo. Después, se añaden los 25 µL de los HLM 20 mg/mL en las muestras que lo requieran. A continuación, se añaden los 10 µL de la disolución sustrato en las muestras donde así se indique y en el caso del control positivo, los 10 µL de la disolución de fenacetina. Al finalizar todas estas adiciones hay que agitar los microtubos con un vórtex. Se ponen a incubar las muestras durante cinco minutos y después se añaden 10 µL de NADPH y se agita. Se deja reaccionar una hora. Al pasar estos 60 minutos hay que parar las muestras de fase I de 1h con 0,25 mL de la disolución de parada. Las otras muestras continúan la reacción y hay que volver a añadir el NADPH. Los microtubos en los cuales se paró la reacción se agitan y se meten en una microcentrífuga a 8000 rpm durante 5 minutos. Cuando vuelva a pasar otra hora (120 minutos desde el inicio) hay que volver a añadir el cofactor, agitar y dejar reaccionar otra hora más. Al cabo de otros 60 minutos, 180 en total, hay que parar las reacciones de fase I y fase II. A las de fase I se les añaden 0,25 mL de disolución de parada y a las de fase II se las mete en un baño de agua-hielo durante 30 segundos. Todas estas muestras se llevarán a una microcentrífuga a 8000 rpm durante 5 minutos.

Después de esto dan comienzo las reacciones de fase II. Se recoge la cantidad de sobrenadante indicada de los microtubos que han sido centrifugados y se añaden 25 µL de los HLM o de los HLCYT, según corresponda. Posteriormente hay que añadir 10 µL de sustrato y de alamecina a las muestras de las reacciones de glucuronidación. Se deja incubar 5 minutos y se añade el cofactor, el UDPGA en un caso y el PAPs en el otro. Tanto en los controles positivos como en los de solo fase II hay que añadir la cantidad de disolución tampón indicada y el sustrato. Después de añadir los cofactores se empieza a

contar el tiempo, teniendo en cuenta que hay que volver a añadir los cofactores correspondientes cada hora, es decir, a los 60 y a los 120 minutos.

Una vez transcurridas 3 horas (180 minutos) se añaden 0,25 mL de disolución de parada, se agita y se microcentrífuga durante 5 minutos a 8000 rpm.

A las muestras centrifugadas se les recoge el sobrenadante y se vierte en viales debidamente etiquetados, los cuales se conservarán en un congelador a -20°C hasta la inyección. Antes de la inyección las muestras se tienen que filtrar, para ello se utilizarán filtros desechables de 0,2 µm acoplados a una jeringa.

4.2.2 Condiciones de medida

Dado que se tiene una lista de posibles metabolitos se realizó un *suspect screening*. Las muestras fueron analizadas en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado con espectrometría de masas en tándem híbrida cuadrupolo-tiempo de vuelo (HPLC-QTOF).

El cromatógrafo es el modelo Agilent 1290 Infinity II acoplado mediante un sistema ESI (*JetStream*) al espectrómetro de masas en tándem modelo Agilent 6550 iFunnel, como se observa en la figura 2. La columna cromatográfica es de fase inversa de Agilent, modelo ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HT, de 2,1 x 50 mm y tamaño de partícula 1,8 µm con una precolumna SecurityGuard C18 2,1 mm. También fue necesario el uso de una columna de retardo Agilent InfinityLab PFC 4,6 x 30 mm.



Figura 2: HPLC-QTOF. Copyright Agilent Technologies.

El gradiente de fase móvil se describe en la tabla 1. El flujo se mantuvo constante a 0,4 mL/min.

Tabla 1: Porcentaje de cada fase móvil para el gradiente de elución. Flujo 0,4 mL/min.

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0,00	98,00	2,00
1,00	98,00	2,00
15,00	30,00	70,00
16,00	30,00	70,00
19,00	0,00	100,00
20,00	0,00	100,00
20,01	98,00	2,00
25,00	98,00	2,00

La fase A está compuesta por agua ultrapura calidad LC-MS (VWR Chemicals) 5mM de acetato de amonio (NH₄OAc) y la fase B metanol calidad LC-MS (Fischer Scientific) 5 mM de NH₄OAc. Las muestras se inyectaron en el modo *Auto MS/MS* (DDA) y se ionizaron tanto en positivo como en negativo.

El equipo tiene dos frecuencias de operación, 4 GHz y 2 GHz. Se escogió el segundo ya que a pesar de tener menor resolución tiene un mayor rango lineal. Las condiciones de operación del espectrómetro se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Condiciones experimentales del espectrómetro de masas.

Modo de ionización	ESI +/-
T ^a gas de secado (N ₂)	200°C
Flujo del gas de secado	12 L/min
Presión nebulizador	30 psig
Voltaje del fragmentador	120 V
Voltaje del capilar	2500 V
Velocidad de adquisición	6 espectros/s
Rango <i>m/z</i>	60-1000
Energía de colisión	10/20/40 V

Para alguno de los metabolitos se realizaron inyecciones complementarias en el modo *Target MS/MS* con el fin de adquirir espectros MS/MS de calidad.

4.2.3 Tratamiento de datos

Antes de realizar la inyección se generó una lista de posibles metabolitos con la ayuda de los softwares GloryX¹, QSAR Toolbox² y BioTransformer³ y en base a conocimientos previos de metabolismo. Se obtuvieron un total de 42 posibles metabolitos para la DPG. En esta lista se incluyeron tanto metabolitos de fase I como de fase II, así como el compuesto de partida.

Los datos obtenidos mediante el HPLC-QTOF se analizaron con dos softwares, MassHunter Profinder y MassHunter Qualitative. En el primero se introdujeron todos los posibles metabolitos de la lista y los cromatogramas de todas las muestras para hacer una selección preliminar y ver que metabolitos estaban presentes y cuáles no. Una vez hecho este primer cribado se utilizó el otro software para ver la estructura y forma del cromatograma, así como para extraer los espectros de masas a diferentes energías.

Los criterios utilizados para aceptar o descartar a cada candidato fueron:

- No estar presentes en los controles negativos o que el área del pico de estos suponga menos del 10% del área correspondiente réplica los experimentos con sustrato DPG.
- Estar presente en al menos dos de las tres réplicas.
- Tener un error de masa de menos de 10 ppm.

Además, se analizaron los controles positivos y el patrón interno para comprobar que tanto las reacciones como las inyecciones habían transcurrido según lo esperado.

4. 3 Metodología de los análisis de orina

4.3.1 Procedimiento experimental

Para las pruebas de los análisis de orina se realizaron dos tipos de preparación de muestra. Por una parte, se realizó una dilución de la orina y se inyectó directamente en el sistema (*dilute and shoot*) y por otra parte se realizó una extracción en fase sólida (SPE).

¹ <https://nerdd.univie.ac.at/gloryx/>

² <https://qsartoolbox.org/>

³ <https://biotransformer.ca/new>

La orina procede de unas muestras de 60 voluntarios (estudio aprobado por el Comité de Ética de Santiago-Lugo, registro 2019/545)) de las cuales se hicieron tres muestras compuestas o *pools*, cada uno de ellos compuesto por la mezcla de 20 orinas diferentes.

Las muestras *dilute and shoot* se prepararon mezclando 250 μL de cada *pool* de orina, previamente filtrados con filtros de 0,22 μm acoplados a jeringa, con 750 μL de agua ultrapura, es decir, se hizo una dilución 1:4.

La SPE comenzó con la filtración de las muestras de orina. Los cartuchos de tipo OASIS HLB se acondicionaron con 3 mL de agua ultrapura y 3 mL de MeOH. Después se pasó a través de ellos la muestra consistente en 1 mL de orina y 10 mL de agua ultrapura. Se hizo un lavado con 1 mL de agua ultrapura. Posteriormente, los cartuchos se secaron con una corriente de nitrógeno durante 20 minutos y al finalizar se eluyeron con 6 mL de metanol. Después se evaporó a sequedad con corriente de N_2 con ayuda del TurboVap y del MiniVap y se reconstituyó con 100 μL de una disolución 50:50 metanol/agua ultrapura. Esto nos da un factor de concentración de 10, ya que se partió de 1 mL de orina y el volumen final es de 100 μL .

Antes de la inyección las muestras de la SPE se filtraron con los filtros acoplados a jeringa de 0,22 μm .

4.3.2 Condiciones de medida

Tanto los equipos como las condiciones de medida fueron las mismas que las utilizadas en el análisis de las muestras de metabolismo *in-vitro* (ver apartado 4.2.2), salvo por el método de adquisición. En este caso se realizó primero un análisis en DIA (*All ions*) para intentar obtener la máxima información posible, aunque no se pudiesen asignar los fragmentos a sus precursores. Posteriormente un DDA dirigido para obtener espectros MS/MS con sus correspondientes precursores.

4.3.3 Tratamiento de datos

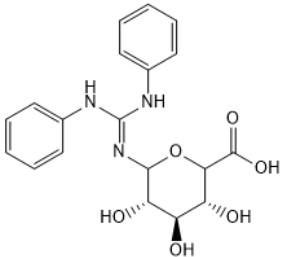
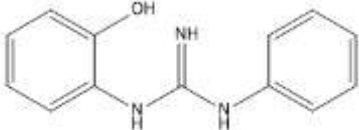
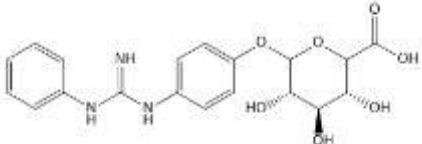
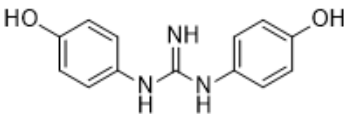
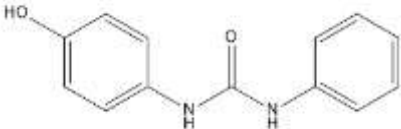
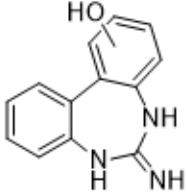
Los datos obtenidos mediante el HPLC-QTOF se analizaron con el software MassHunter Qualitative. Se utilizó la misma *suspect list* que para la búsqueda de los metabolitos *in-vitro*, por si aparecían algunos que no se habían obtenido. El criterio de selección para estos compuestos fue: coincidencia de los tiempos de retención con los metabolitos obtenidos mediante las reacciones *in-vitro* y tener un error de masa de menos de 10 ppm.

5 Resultados y discusión

5.1 Resultados del metabolismo *in-vitro*

Se encontraron un total de 6 metabolitos de la DTG. Los nombres de estos, así como su estructura, se recogen en la tabla 3.

Tabla 3: Abreviatura y estructura de los metabolitos encontrados mediante el análisis de screening de las reacciones de metabolismo *in-vitro* de la DPG.

Reacción	Abreviatura	Estructura
Glucuronidación en el nitrógeno de la guanidina	DPG-G	
Hidroxilación de un anillo aromático	DPG-M1	
Hidroxilación de un anillo aromático y su posterior glucuronidación	DPG-M1G	
Doble hidroxilación de un anillo aromático	DPG-M10	
Hidroxilación y transformación de guanidina en urea	DPG-M7	
Ciclación e hidroxilación de un anillo aromático	DPG-M12a	

Los metabolitos que se encontraron cumplían las condiciones anteriormente mencionadas y fueron confirmados, con diferentes niveles de certidumbre, por sus espectros MS/MS.

- DPG-M1

La DPG-M1 se encontró tanto en los análisis con ionización positiva como negativa. Se encontró en réplicas de fase I y de fase II. Se supone su formación en la primera fase y su conservación en el medio de reacción en la segunda fase.

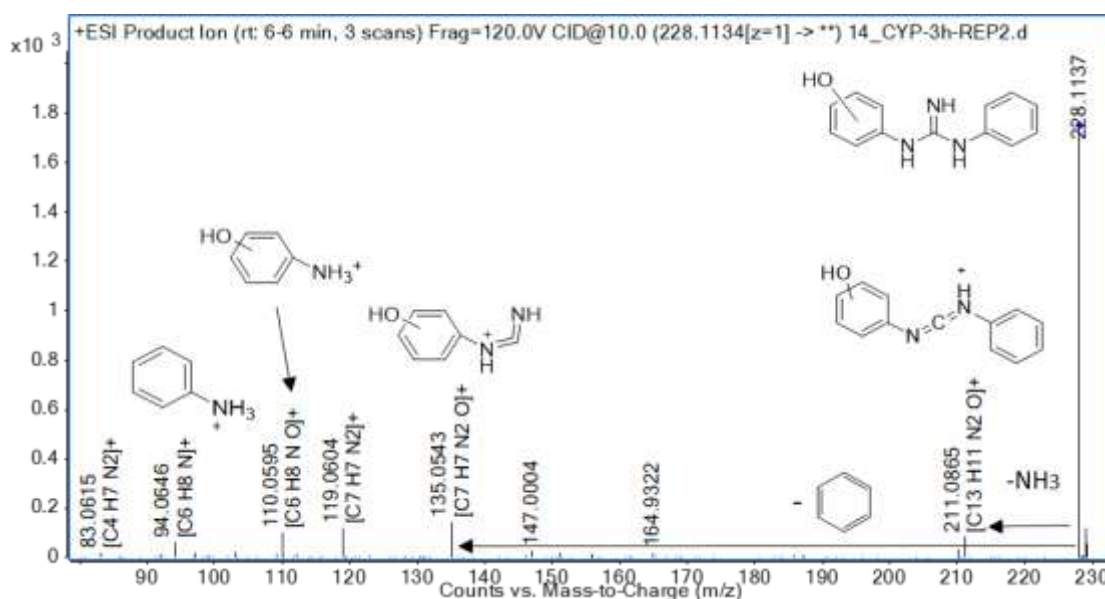


Figura 3: Espectro MS/MS de la DPG-M1 a energía de ionización 10 V junto con la identificación de varios fragmentos. Ionización positiva, ESI +.

Como se puede ver, en el espectro, figura 3, se observa la pérdida de pequeños grupos tales como amoníaco o benceno que cuadran con posibles pérdidas de las estructuras propuestas. Además, el patrón de fragmentación propuesto coincide con el mostrado en otro trabajo de investigación previo de oxidación de estos compuestos con cloro (13).

Observando este espectro podemos obtener más información que respalda la elección de la estructura propuesta. No obstante, hay que decir que no se puede distinguir en que posición se encuentra el grupo hidroxilo. Además, en el modo negativo se encontraron dos picos cromatográficos a distintos tiempos de retención con espectros coincidentes, lo que indica que se formaron al menos dos isómeros del compuesto.

En base a estos datos se puede decir que se formaron (al menos) dos compuestos monohidroxilados en el anillo aromático.

- DPG-M7

La DPG-M7 se encontró solo en los análisis con ionización negativa y en las réplicas de fase I y fase II. Su espectro MS/MS se muestra en la figura 4. El error de masas en las muestras en las que aparecía era menor que 7 ppm.

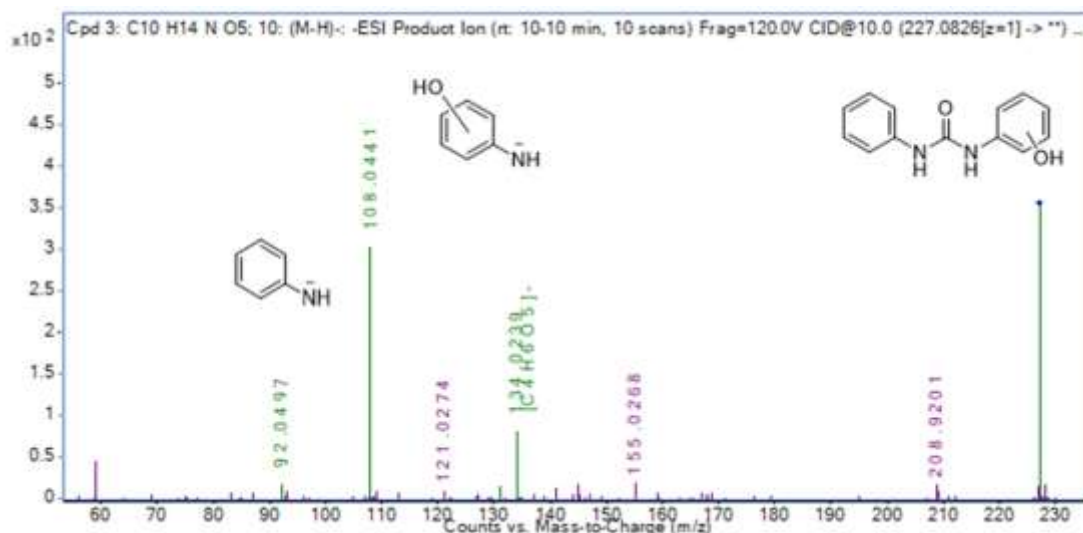


Figura 4: Espectro MS/MS de la DPG-M7 a energía de ionización 10 V junto con la identificación de varios fragmentos. Ionización negativa, ESI -.

Este espectro se comparó con una predicción obtenida mediante CFM-ID⁴ y la mayor parte de los picos predichos coinciden con los del espectro experimental, además se pueden asignar varias masas y sus posibles fórmulas moleculares con estructuras derivadas del metabolito propuesto.

En base a esto se puede decir que se formó un metabolito en el que sustituyó uno de los nitrógenos por un oxígeno, pasando así de una guanidina a una urea y que además está monohidroxilado en uno de los anillos aromáticos.

- DPG-M10

La DPG-M10 solo aparecía en ionización positiva y se encontró tanto en las réplicas de fase I como las de fase II. El error de masas es en todos los casos menor a 7 ppm. El espectro de masas obtenido se corresponde con la figura 5:

⁴ <https://cfmid.wishartlab.com/>

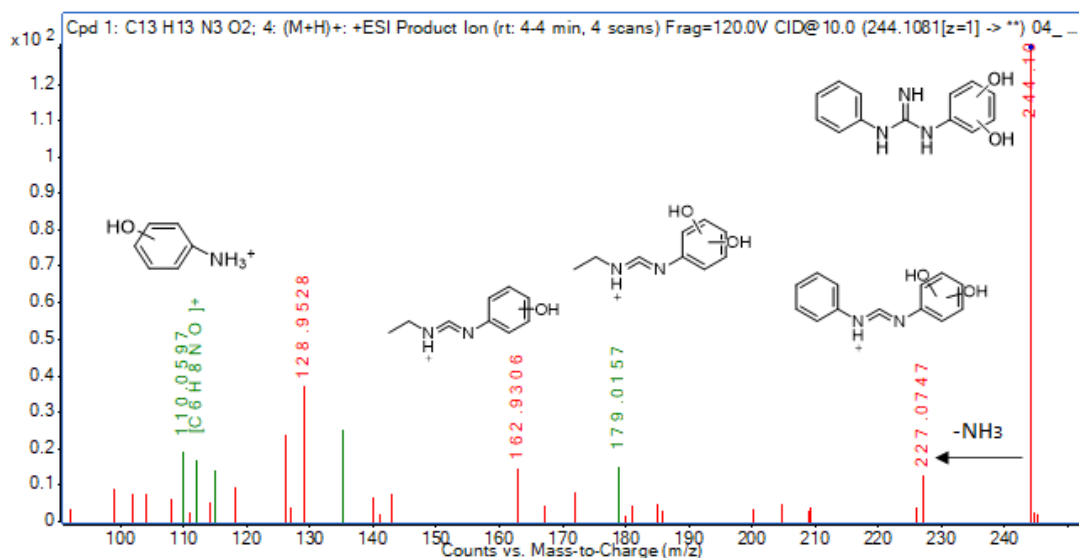


Figura 5: Espectro MS/MS de la DPG-M10 a energía de ionización 10 V junto con la identificación de varios fragmentos. Ionización positiva, ESI +.

En este caso también se comparó el espectro experimental con el predicho en CFM-ID. Se observa coincidencia entre alguno de los picos de la predicción con los obtenidos experimentalmente. En el espectro experimental también se pueden atribuir ciertos picos y fórmulas moleculares con estructuras y fragmentos que vendrían justificados por el metabolito propuesto. En base a estos fragmentos se puede suponer que los dos hidroxilos se encuentran en el mismo anillo.

- DPG-M12a

La DPG-M12a aparece solo en positivo y en las réplicas de fase I y fase II. El error de masa fue siempre menor de 6 ppm. En este caso sí se disponía de otro espectro experimental obtenido de (13), que se corresponde bien con el obtenido en este trabajo y presentado en la figura 6:

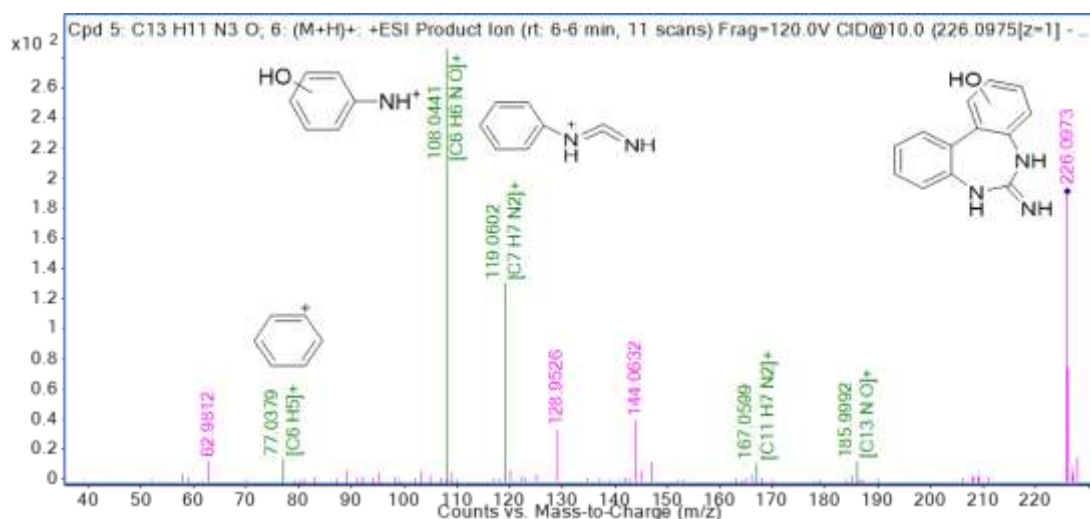


Figura 6: Espectro MS/MS de la DPG-M12a a energía de ionización 10 V junto con la identificación de varios fragmentos. Ionización positiva, ESI +.

Como se puede ver, se encontraron varios fragmentos que respaldan la estructura propuesta y que además coinciden con algunas de las posibles fórmulas. En este metabolito se produce una reacción de ciclación y una hidroxilación de un anillo aromático.

- DPG-G

La DPG-G solo se encontró en los análisis con ionización positiva y solo en las réplicas de fase II, cosa que cabría esperar dado que es un glucurónido. Los errores de masa fueron siempre inferiores a 2 ppm. El espectro experimental aparece en la figura 7:

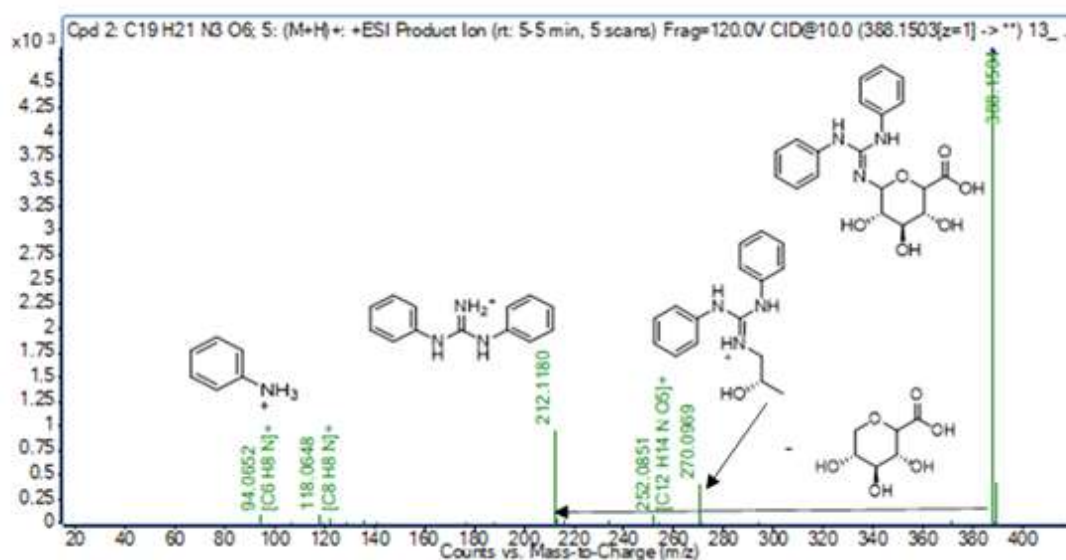


Figura 7: Espectro MS/MS de la DPG-G a energía de ionización 10 V junto con la identificación de varios fragmentos. Ionización positiva, ESI +.

Como se puede observar, se pueden identificar algunos de los picos con las fórmulas y estructuras propuestas relacionadas con el posible metabolito. Además, se observa que desde $M+H$ hasta m/z 212.1180 (DPG protonada) hay una diferencia de masas correspondiente a la pérdida de un glucurónico.

- DPG-M1G

La DPG-M1G solo se encontró en muestras de fase II y en ionización positiva. Los errores de masa siempre fueron menores que 3 ppm. La figura 8 recoge el espectro obtenido.

En el espectro experimental se pueden identificar varias masas y estructuras propuestas compatibles con la molécula de origen. Además, también se observa una diferencia de

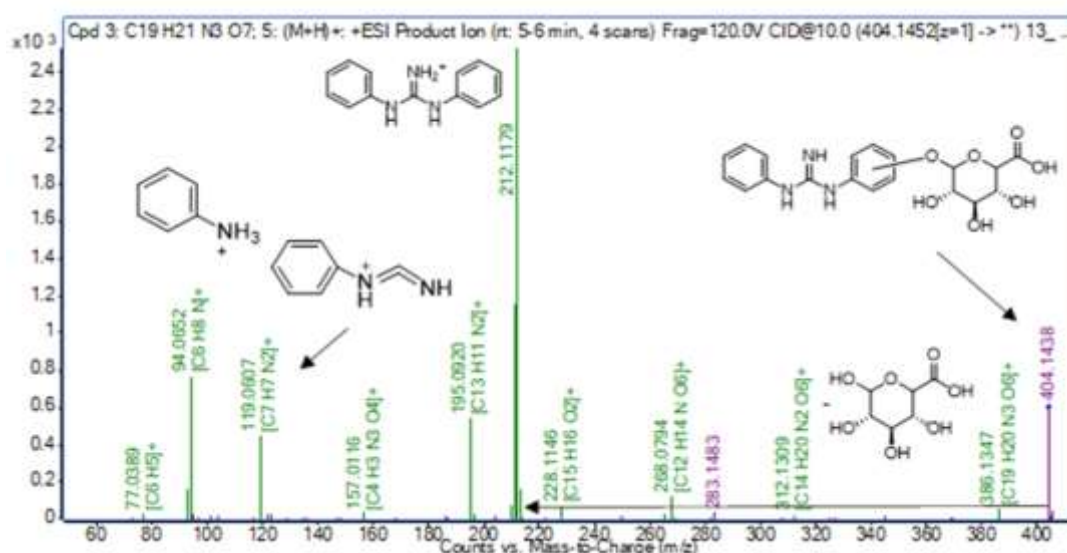


Figura 8: Espectro MS/MS de la DPG-M1G a energía de ionización 10 V junto con la identificación de varios fragmentos. Ionización positiva, ESI +.

masa entre dos picos correspondiente al ácido glucurónico. Este metabolito es el glucurónido derivado de la DPG-M1, así que visto que no se pudo identificar la posición del hidroxilo en su predecesor, tampoco se puede saber el lugar exacto que ocupa este glucurónido.

5.2 Posible ruta metabólica

En la figura 9 se recoge la posible ruta metabólica de la DPG. En las reacciones de fase I se forma, a partir de la DPG su derivado monohidroxilado (DPG-M1). Desde este metabolito se puede producir el compuesto monohidroxilado con el grupo urea (DPG-

M7) o el dihidroxilado (DPG-M10). Desde el dihidroxilado se puede obtener el compuesto ciclado con un grupo hidroxilo en el anillo aromático (DPG-M12a).

En cuanto a fase II se forman dos glucurónidos, el propio de la DPG con el grupo unido a un nitrógeno del grupo guanidina y el derivado de la DPG-M1 con el grupo glucurónido unido al oxígeno del grupo hidroxilo.

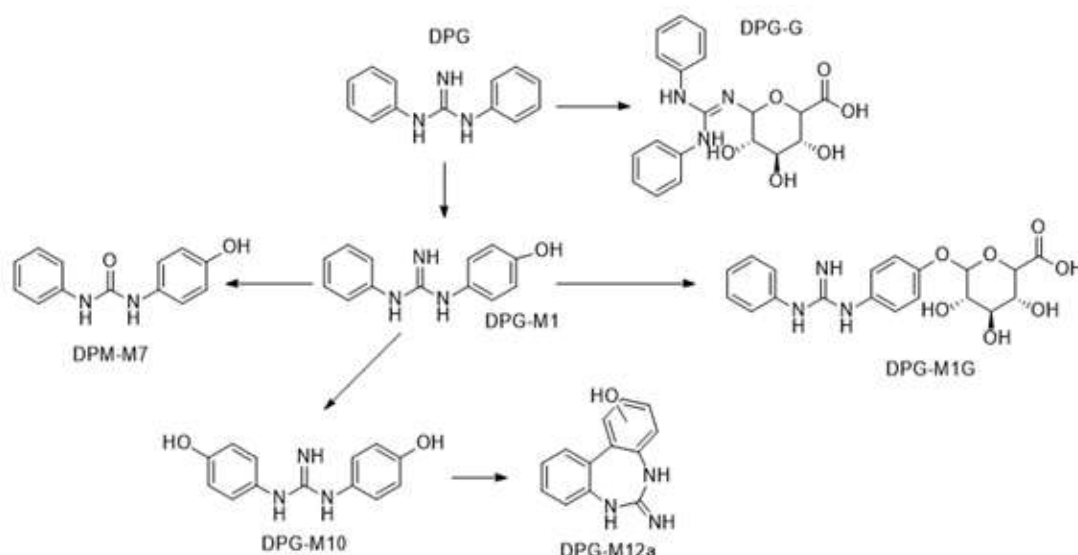


Figura 9: Posible ruta metabólica para la DPG.

5.3 Resultados de los análisis de las muestras de orina

En las muestras de orina no se encontró ningún metabolito, sin embargo, sí se encontró una masa coincidente con el DPG-M7, pero como aparecía en ionización negativa y en los análisis previos solo se obtuvo el espectro MS/MS en ionización positiva, estos no se pueden comparar, por lo que no se puede afirmar que se trate de este metabolito.

6 Conclusiones

En este estudio se hicieron experimentos de metabolismo *in-vitro* de la DPG para obtener los metabolitos correspondientes de esta sustancia. La identificación de dichos metabolitos se realizó mediante técnicas de *screening* por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem. Por último, se analizaron muestras de orina de voluntarios.

En base a los resultados obtenidos se consiguieron identificar tentativamente seis metabolitos de la DPG (algunos presentando varios isómeros) mediante la simulación *in-vitro*. La estructura de estos metabolitos se dedujo a partir de sus espectros de MS/MS.

En los análisis de orina no se encontró ningún metabolito, aunque sí se encontró una masa coincidente con un metabolito (DPG-M7), pero su espectro MS/MS no permitía la identificación. Cabe la posibilidad de que se pudiesen encontrar más metabolitos, por lo que sería interesante proseguir la investigación disminuyendo los límites de detección del método, investigar una población más amplia (incluyendo sujetos de posible exposición ocupacional) para comprobar si se forman o no otros metabolitos.

7 Bibliografía

1. Pornputtapong N, Nookaew I, Nielsen J. Human metabolic atlas: an online resource for human metabolism. Database. 2015;2015.
2. Patterson AD, Gonzalez FJ, Idle JR. Xenobiotic metabolism: a view through the metabolometer. Chemical research in toxicology. 2010;23(5):851-60.
3. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug metabolism in the liver. Clinics in liver disease. 2017;21(1):1-20.
4. Asha S, Vidyavathi M. Role of Human Liver Microsomes in *In-vitro* Metabolism of Drugs—A Review. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2010;160(6):1699-722.
5. (ECHA) ECA. 1,3-diphenylguanidine [Available from: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.002.730>.]
6. Li Z-M, 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 & Technology. 2023;57(15):6129-38.
7. Li Z-M, 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. Environmental Science & Technology. 2023:en prensa <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00412>.
8. Challis J, Popick H, Prajapati S, Harder P, Giesy J, McPhedran K, et al. Occurrences of tire rubber-derived contaminants in cold-climate urban runoff. Environmental Science & Technology Letters. 2021;8(11):961-7.

9. Zahn D, Mucha P, Zilles V, Touffet A, Gallard H, Knepper T, et al. Identification of potentially mobile and persistent transformation products of REACH-registered chemicals and their occurrence in surface waters. *Water research*. 2019;150:86-96.
10. Valcárcel M, Cárdenas S, Gallego M. Sample screening systems in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1999;18(11):685-94.
11. Zhang F, Ge W, Ruan G, Cai X, Guo T. Data-independent acquisition mass spectrometry-based proteomics and software tools: a glimpse in 2020. *Proteomics*. 2020;20(17-18):1900276.
12. Gys C, Kovačič A, Huber C, Lai FY, Heath E, Covaci A. Suspect and untargeted screening of bisphenol S metabolites produced by *in-vitro* human liver metabolism. *Toxicology Letters*. 2018;295:115-23.
13. Sieira BJ, Montes R, Touffet A, Rodil R, Cela R, Gallard H, et al. 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.

Material suplementario

Tabla A1: Volúmenes y tiempos de adición para cada microtubo para las reacciones de Fase I.

Número de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Muestra	CYP-PC	CYP-NCS-1	CYP-NCS-3	CYP-NCC-1	CYP-NCC-3	CYP-NCH-1	CYP-NCH-3	CYP-1h-REP1	CYP-1h-REP2	CYP-1h-REP3	CYP-3h-REP1	CYP-3h-REP2	CYP-3h-REP3
Detalles de la muestra	CYP Control positivo Fenacetin	CYP sin sustrato 1h	CYP sin sustrato 3h	CYP sin NADPH 1h	CYP sin NADPH 3h	CYP sin HLM 1h	CYP sin HLM 3h	CYPs: 1h Réplica 1	CYPs: 1h Réplica 2	CYPs: Réplica 3	CYPs: 3h Réplica 1	CYPs: 3h Réplica 2	CYPs: 3h Réplica 3
Buffer (µL)	935	965	945	965	965	980	960	955	955	955	935	935	935
HLM (µL)	25	25	25	25	25	0	0	25	25	25	25	25	25
DPG/DTG(µL) (0.5 mM)	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Fenacetin (µL) (5 µg / mL)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NADPH (µL) 5 min	10	10	10	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
NADPH (µL) 60 min	10	Parar con ácido	10	Parar con ácido	0	Parar con ácido	10	Parar con ácido	Parar con ácido	Parar con ácido	10	10	10
NADPH (µL) 120 min	10		10		0		10				10	10	10
180 min	Parar con ácido		Parar con ácido		Parar con ácido		Parar con ácido				Parar con ácido	Parar con ácido	Parar con ácido

Tabla A2: Volúmenes y tiempos de adición para cada microtubos para las reacciones de glucuronidación de Fase II.

Muestra	14	15	16	17	18	19	20	21
Experimentos Fase II (GLU)	GLUC sin cofactor	GLUC sin sustrato	GLUC réplica 1	GLUC réplica 2	GLUC réplica 3	GLUC Control Pos (4-NP10 μ M)	GLUC solo Fase II réplica 1	GLUC solo Fase II réplica 2
Tampón μ L	955	965	955	955	955	0	0	0
HLM μ L	25	25	25	25	25	0	0	0
Sustrato (0,5mM) μ L	10	0	10	10	10	0	0	0
NADPH μ L (5 min)	10	10	10	10	10	0	0	0
NADPH μ L (1h)	10	10	10	10	10	0	0	0
NADPH μ L (2h)	10	10	10	10	10	0	0	0
Parada	3h hielo	3h hielo	3h hielo	3h hielo	3h hielo			
Transferencia μ L	945	935	935	935	935	935	935	935
HLM μ L	25	25	25	25	25	25	25	25
Sustrato (1 mM) μ L						4-NP: 10	DPG/DTG: 10	DPG/DTG: 10
Alam (10 μ L)	10	10	10	10	10	10	10	10
UDPGA μ L 5 min	0	10	10	10	10	10	10	10
UDPGA μ L 1 h	0	10	10	10	10	10	10	10
UDPGA μ L 2 h	0	10	10	10	10	10	10	10
Parada (ácido)	3h	3h	3h	3h	3h	3h	3h	3h

Tabla A3: Volúmenes y tiempos de adición para cada microtubo para las reacciones de sulfatación de Fase II.

Muestra	14	15	16	17	18	19	20	21
Experimentos Fase II (GLU)	SULF sin cofactor	SULF sin sustrato	SULF réplica 1	SULF réplica 2	SULF réplica 3	SULF Control Pos (4-NP10 μ M)	SULF solo Fase II réplica 1	SULF solo Fase II réplica 2
Tampón μ L	955	965	955	955	955	0	0	0
HLM μ L	25	25	25	25	25	0	0	0
Sustrato (0,5mM) μ L	10	0	10	10	10	0	0	0
NADPH μ L (5 min)	10	10	10	10	10	0	0	0
NADPH μ L (1h)	10	10	10	10	10	0	0	0
NADPH μ L (2h)	10	10	10	10	10	0	0	0
Parada	3h hielo	3h hielo	3h hielo	3h hielo	3h hielo			
Transferencia μ L	945	935	935	935	935	935	935	935
HLM μ L	25	25	25	25	25	25	25	25
Sustrato (1 mM) μ L						4-NP: 10	DTG/DPG: 10	DTG/DPG: 10
Alam (10 μ L)	10	10	10	10	10	10	10	10
PAPs μ L 5 min	0	10	10	10	10	10	10	10
PAPs μ L 1 h	0	10	10	10	10	10	10	10
PAPs μ L 2 h	0	10	10	10	10	10	10	10
Parada (ácido)	3h	3h	3h	3h	3h	3h	3h	3h