

**Resumen**

Este estudio se basa en la investigación realizada entre la empresa Facsa y el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) de la Universitat Jaume I, con el fin de identificar los posibles productos de transformación del herbicida bromacilo que contaminan las aguas subterráneas cuando estas son captadas y sometidas a procesos de cloración. Esta situación ocurre en las aguas subterráneas que son tratadas para obtener aguas de consumo humano, lo que provoca la degradación del bromacilo por el oxidante con base de cloro. La investigación ha identificado hasta cuatro productos de transformación.

**Palabras clave:**

Herbicida bromacilo, cloración, degradación, productos de transformación, aguas, LC-(Q)TOF MS.

**Abstract**

*Investigation of transformation products of the bromacil herbicide in waters subjected to chlorination*

This study is based on the research carried out between Facsa company and the Research Institute of Pesticides and Water (IUPA), University Jaume I. The aim of this work is to identify the possible transformation products of the bromacil herbicide in groundwater, after being subjected to chlorination. This situation happens with groundwater treated to obtain drinking water, which causes bromacil degradation by chlorine oxidizer. Four transformation products have been identified in this investigation.

**Keywords:**

Herbicide bromacil, chlorination, degradation, transformation products, water, LC-(Q)TOF MS.

# Investigación de los productos de transformación del herbicida bromacilo en aguas sometidas a procesos de cloración

Por: **F. Javier García Castillo<sup>1</sup>; Carlos Ferrer Torregrosa<sup>1</sup>; Belén Sánchez-Rubio Ruiz<sup>1</sup>; María Ibáñez Martínez<sup>2</sup>; Félix Hernández Hernández<sup>2</sup>; Juan V. Sancho Llopis<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup> Facsa**

C/ Mayor, 82-84 - 12001 Castellón  
Tel.: 964 221 008 - Fax: 964 727 150  
E-mail: jgarcia@facsa.com - www.facsa.com

**<sup>2</sup> Universidad Jaume I**

Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA)  
Av. de Vicent Sos Baynat, s/n - 12071 Castellón  
Tel.: 964 387 366 - Fax: 964 387 368  
E-mail: ibanezm@qfa.uji.es - www.iupa.uji.es

**1. Introducción**

Los tratamientos de potabilización tienen como objetivo reducir en un agua natural los posibles contaminantes para que esta pueda ser consumida sin tener efectos nocivos sobre la salud humana. Tienen una doble finalidad: por un lado, la eliminación de microorganismos patógenos (desinfección) y, por otro, la eliminación de contaminantes nocivos. Facsa, empresa dedicada a la gestión del ciclo integral del agua desde 1873, da servicio a una población de más de 1.500.000 habitantes en casi 200 poblaciones, a lo largo del territorio nacional, siendo uno de sus principales objetivos la calidad del servicio que presta a sus clientes, en el que se incluye la calidad de las aguas de consumo que distribuye.

El primer paso para la producción de agua potable pasa por el control de calidad de las aguas naturales, donde la legislación vigente marca las concentraciones exigibles.

En España, el artículo 5 del Real Decreto 140/2003 establece que “un agua de consumo humano será salubre y limpia cuando no contenga ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia, en una cantidad o concentración que pueda suponer un riesgo para la salud humana, y cumpla con los requisitos especificados en las partes A y B del anexo I del RD 140/2003”. Este decreto incluye una concentración máxima permitida de 0,5 µg/l como suma total de plaguicidas y de 0,1 µg/l como plaguicida individual.

Cuando estos compuestos se detectan en las aguas naturales, sus concentraciones son muy bajas. Sin embargo, en ocasiones puntuales pueden llegar a detectarse concentraciones superiores a las permitidas por la legislación, especialmente en zonas con intensa actividad agrícola y uso elevado de productos fitosanitarios. Los herbicidas constituyen un grupo de especial preocupación, por su mayor presencia en las aguas en

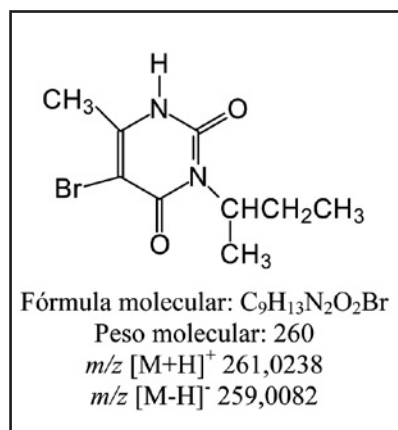


Figura 1. Estructura del bromacilo.

comparación con otros tipos de plaguicidas como insecticidas, acaricidas o fungicidas (Hernández *et al.*, 2008; Marín *et al.*, 2009). Debido a su uso como herbicida en aplicaciones agrícolas, el bromacilo se detecta habitualmente en aguas superficiales y subterráneas en algunas zonas de España y, en particular, en la Comunidad Valenciana, si bien su uso está prohibido al estar excluido de la lista del Anexo I de la Directiva 91/414/CEE.

Tras las investigaciones previas realizadas a escala de laboratorio (Ormad *et al.*, 2007 y 2008; Miguel *et al.*, 2008) y en planta piloto (Ormad *et al.*, 2009), en este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la elucidación de productos de transformación (TP) del herbicida bromacilo en aguas subterráneas tras ser sometidas a procesos de cloración.

## 2. Procedimiento experimental

La estructura química del herbicida bromacilo se muestra en la Figura 1.

### 2.1. Metodología general

La metodología usada en los ensayos fue la siguiente. Se tomaron muestras de agua de pozo de diferentes localizaciones y se fortificaron con bromacilo a un nivel de 500 µg/l. Las muestras se analizaron antes y después (1, 10 y 25 minutos) de ser sometidas a cloración con una

disolución de hipoclorito sódico, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, usando un analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (UPLC-QTOF MS), con el fin de identificar posibles productos de transformación formados. Las mismas muestras sin fortificar se utilizaron como control. Para la cloración se añadieron, a 50 ml de agua, 30 µl de la disolución del reactivo comercial al 1%. Posteriormente, se repitieron estas mismas experiencias a una concentración de bromacilo de 10 mg/l.

Paralelamente se llevaron a cabo ensayos de toxicidad por *Vibrio fischeri* según marca el RD 140/2003. Para ello, se partió de muestras de agua de pozo con ausencia de contaminación por el herbicida bromacilo. Las muestras se fortificaron con 1,0 µg/l de bromacilo, se cloraron y se analizó su toxicidad por el ensayo anteriormente comentado.

### 2.2. Descripción del equipo instrumental

Para llevar a cabo el estudio se empleó un sistema de cromatografía líquida (LC) acoplada a un analizador de masa híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF). En la Figura 2 se muestra una fotografía del equipo utilizado.

Los parámetros instrumentales más relevantes, así como las condi-

ciones cromatográficas utilizadas son las siguientes:

- Se utilizó un espectrómetro híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF Premier, Waters Micro-mass) con una interfase electrospray, para trabajar tanto en modo de ionización positivo (ESI+) como negativo (ESI-). Los datos de MS fueron adquiridos en un rango de  $m/z$  50-1.000. Los voltajes de capilar fueron de 3,5 y 3,0 kV en modo ESI+ y ESI-, respectivamente. Se seleccionó un voltaje de cono de 25 V en ambos modos de ionización. El gas de colisión fue argón 99,995% (Praxair, Valencia). Las temperaturas de la interfase y de la fuente fueron 350 °C y 120 °C, respectivamente.
- Para recalibrar el eje de masas y asegurar una medición robusta a lo largo del tiempo, se utilizó una disolución de 2 µg/ml de *leucine enkephaline* ( $m/z$  556,2771 en ESI+,  $m/z$  554,2615 en ESI-). Para los experimentos de MS<sup>E</sup> se adquirieron dos funciones simultáneamente con diferentes energías de colisión: para la función a baja energía de colisión (LE), se seleccionó 4 eV. Para la función a alta energía (HE), se utilizó una rampa entre 15-40 eV. Se seleccionó un tiempo de escaneado de 0,1 s. Para los experimentos de MS/MS, se



Figura 2. Equipo utilizado (UPLC-QTOF MS).

utilizó la rampa anteriormente comentada.

- Respecto al sistema cromatográfico, se utilizó una bomba UPLC binaria Waters Acquity. Se utilizó una columna analítica Acquity UPLC BEH C18 de 100 x 2,1 mm (Waters) con un tamaño de partícula de 1,7  $\mu\text{m}$ , a un flujo de 300  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Como fases móviles se usaron agua y metanol, ambas con un 0,01% de ácido fórmico. El porcentaje orgánico varió del siguiente modo: 0 min, 10%; 9 min, 90%; 11 min, 90%; 11,1 min, 10%; y 14 min, 10%. El volumen de inyección fue de 50  $\mu\text{l}$ .
- Los datos fueron procesados con MetaboLynx XS (dentro del software MassLynx v. 4.1, Waters). Este software compara dos archivos LC-MS (uno correspondiente a la muestra fortificada y el otro al control) y resalta las diferencias entre ellos, que en principio se atribuyen a los productos de transformación formados.

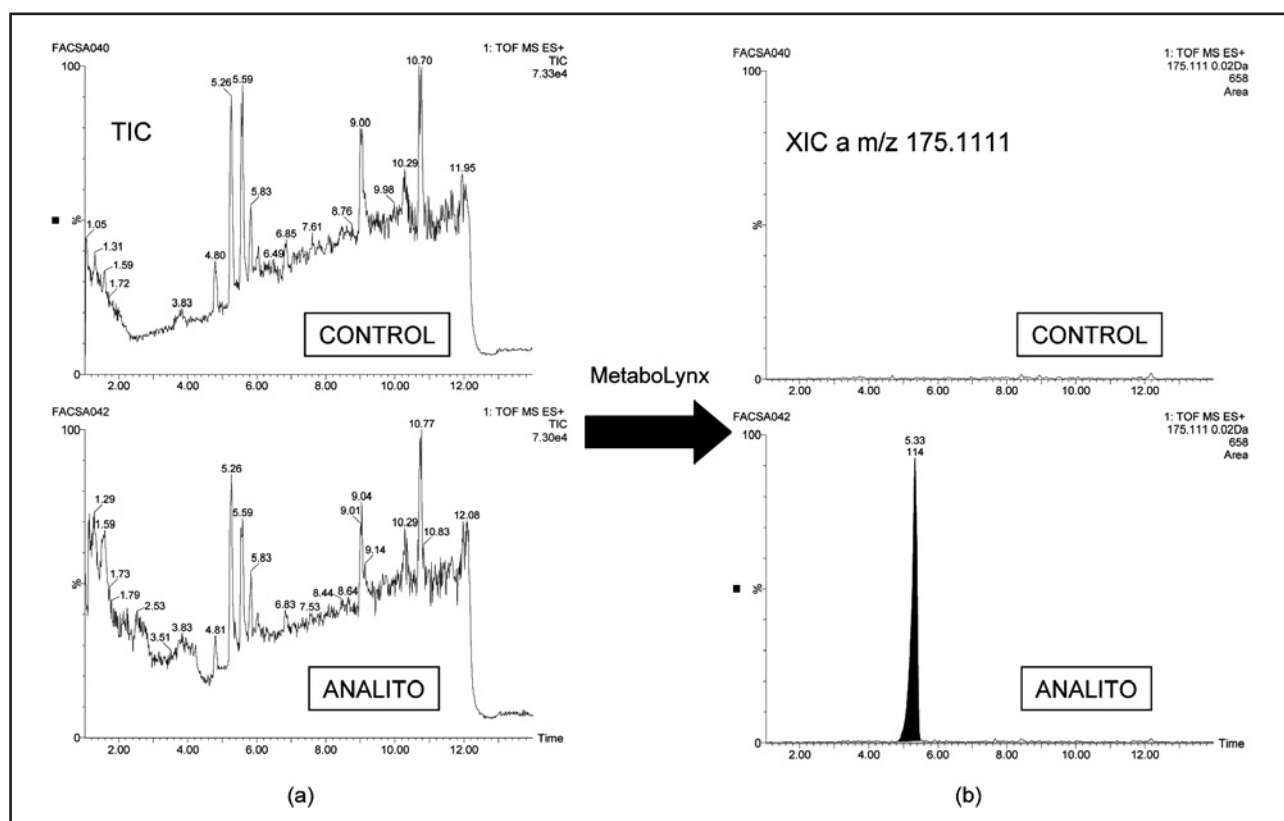
### 3. Resultados

Las características de los analizadores TOF MS en cuanto a su posibilidad de llevar a cabo adquisiciones en modo de barrido completo con masa exacta (<5 ppm), y con elevada resolución (>10000 fwhm) y sensibilidad, los hacen muy útiles en el desarrollo de metodología analítica para fines cualitativos y de elucidación de microcontaminantes orgánicos.

El uso de la masa exacta, junto con las relaciones isotópicas observadas experimentalmente, ha sido utilizada para la elucidación de algunos metabolitos de plaguicidas (García-Reyes *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2008b), ya que la fórmula molecular obtenida puede usarse para realizar búsquedas en las bases de datos, obteniendo así un número reducido de posibles estructuras. Esta aproximación no permite, sin embargo, distinguir entre isómeros. Cuando se hace uso del QTOF, la información estructural obtenida en

el espectro de iones producto con masa exacta es de gran ayuda pues permite distinguir entre compuestos isoméricos.

La técnica LC-QTOF se ha utilizado para la elucidación de metabolitos de plaguicidas en muestras biológicas o en estudios de fotodegradación (Detomaso *et al.*, 2005; Ibáñez *et al.*, 2004; Ibáñez *et al.*, 2008; Kouloumbos *et al.*, 2003). Recientemente, se ha hecho uso de una nueva aproximación ( $\text{MS}^E$ ) por parte del grupo universitario de investigación que permite la adquisición simultánea tanto de la molécula (de)protonada como de los iones fragmento en una única inyección. La información aportada por LC-QTOF  $\text{MS}^E$  es muy valiosa desde el punto de vista identificativos y de elucidación, por lo que esta técnica se ha convertido en una de las poderosas actualmente para el *screening* universal de contaminantes orgánicos en agua.



**Figura 3.** A) Cromatogramas de iones totales (TIC); y b) cromatogramas de ion extraído (XIC) a  $m/z$  175,1111, correspondientes al control y a la muestra fortificada con bromacilo, un minuto después de haber clorado el agua.

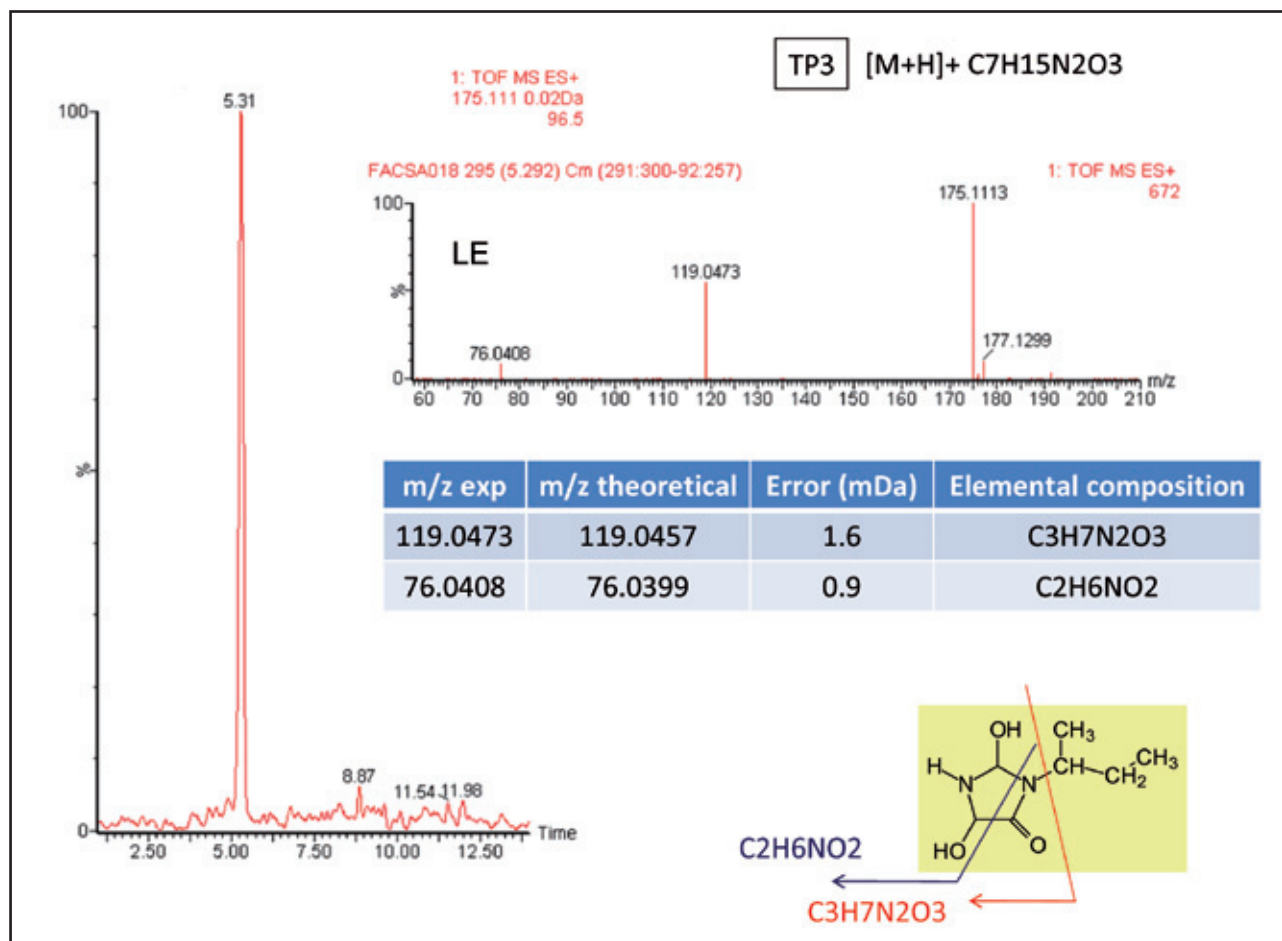


Figura 4. Proceso de elucidación del TP3.

En este trabajo se observó la rápida degradación del bromacilo, pues incluso un minuto después de clorar las muestras ya no se detecta, dando lugar a los TP que se han identificado y se comentan a continuación. La metodología seguida se explica con un ejemplo. La **Figura 3a** muestra los cromatogramas de iones totales (TIC) correspondientes al control y a la muestra fortificada con bromacilo, un minuto después de haber clorado el agua. A primera vista, no se observan diferencias entre ambas. Sin embargo, tras procesar los datos con el software MetaboLynx se detectaron hasta 4 picos diferenciales, que podrían ser atribuidos a 4 productos de transformación. A modo de ejemplo, se muestran los cromatogramas de ion extraído (XIC) a  $m/z$  175,1111 correspondiente al TP3, tanto en la muestra

fortificada (Analito) como en el control (**Figura 3b**).

La **Figura 4** muestra el proceso de elucidación de este producto de transformación. A partir de la masa exacta, para este pico de interés se calculó una composición elemental compatible con la estructura del bromacilo a través de una herramienta disponible en el software del equipo, Elemental Composition Calculator. Se aceptó una desviación máxima de 5 mDa respecto de la masa exacta experimentalmente obtenida. Se seleccionó el siguiente número máximo y mínimo de átomos: C<sub>0-10</sub>, H<sub>0-20</sub>, O<sub>0-10</sub>, N<sub>0-10</sub>. Dado que no se observó el *pattern* isotópico característico de la presencia de un átomo de Br en ninguno de los TP, este elemento no se tuvo en cuenta.

La masa exacta obtenida para el TP3, con un tiempo de retención de 5,3 min, fue de  $m/z$  175,1113. Esta

masa difiere tan solo 3 mDa de  $m/z$  175,1083, que corresponde a una composición elemental de C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que supondría una pérdida de dos átomos de carbono respecto al bromacilo, así como el aumento de un átomo de oxígeno, además de la pérdida del átomo de bromo.

Una vez obtenida la composición elemental más plausible, se investigaron las masas exactas tanto de las pérdidas neutras como de los iones fragmentos observados en ambas funciones (LE y HE) con el fin de facilitar la predicción de una posible estructura. Para calcular las composiciones elementales tanto de los iones fragmento como de las pérdidas neutras, el número mínimo y máximo de átomos posibles fue restringido en función de la composición elemental del correspondiente TP (de)protonado, es decir, en este caso el mínimo/máximo nú-

mero de átomos fue el siguiente:  $C_{0.7}H_{0.15}NO_{.2}O_{0.3}$ .

Tal como se muestra en la **Figura 4**, se observaron dos iones fragmento en el espectro de baja energía de colisión. El fragmento  $m/z$  119,0473 ( $C_3H_7N_2O_3$ ,  $\Delta mDa = 1,6$ ) se debe a la pérdida del grupo sec-butilo, indicando que este grupo permanece inalterado en el TP. La estructura sugerida para este TP se muestra en la **Figura 4**, que también explicaría el otro fragmento observado a  $m/z$  76,0408 ( $\Delta mDa = 0,9$ ). La pérdida de estos dos átomos de carbonos posiblemente se deba a una reorganización en el anillo durante la pérdida del bromo.

Para aquellos TP que presentaban una fragmentación pobre se llevaron

a cabo experiencias en modo MS/MS con el fin de mejorar la generación de iones fragmento que pudieran aportar información relevante sobre la estructura del producto de transformación.

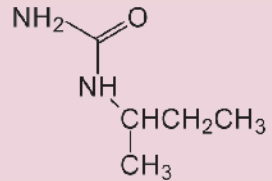

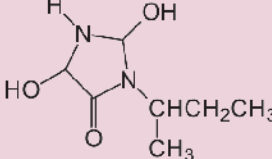
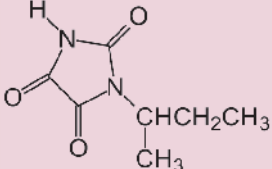
Siguiendo una metodología semejante, se elucidaron el resto de TP. En total se detectaron 4 productos de transformación, 3 en modo de ionización positivo y uno en modo de ionización negativo. En la **Tabla 1** se muestran las masas experimentales obtenidas para los compuestos detectados junto con el error (en mDa) respecto a la masa teórica, la composición elemental más plausible, así como la estructura sugerida para cada uno de ellos.

#### 4. Conclusiones

En este trabajo se han investigado los productos de transformación (TP) del herbicida bromacilo tras el tratamiento de cloración de muestras de agua subterránea que contienen dicho herbicida. Para ello, se ha usado la técnica LC-QTOF MS, una de las más poderosas en la actualidad en estudios de degradación, gracias a las medidas de masa exacta y a la posibilidad de realizar experiencias en modo tándem MS.

La cloración de las aguas produce la inmediata degradación del bromacilo, pues no llega a detectarse en las muestras ensayadas, incluso un minuto después de la cloración. En total, se han detectado cuatro productos de transforma-

**Tabla 1**

| Compuesto | Modo de ionización | $m/z$ experimental (error en mDa) | Composición elemental | Estructura sugerida  |
|-----------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------|--|
| TP1       | ESI+               | 117,1003 (2,5 mDa)                | $C_5H_{13}N_2O$       | <br>1-sec-butylurea  |
| TP2       | ESI+               | 233,1142 (0,5 mDa)                | $C_9H_{17}N_2O_5$     | <br>(1)<br>[(1E)-3-(sec-butylamino)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl] carbamic acid<br><br>(2)<br>{(1E)-3-[sec-butyl(hydroxy)amino]-2-hydroxy-1-methyl-3-oxoprop-1-en-1-yl} carbamic acid |
| TP3       | ESI+               | 175,1113 (3 mDa)                  | $C_7H_{15}N_2O_3$     | <br>3-sec-butyl-2,5-dihydroxyimidazolidin-4-one  |
| TP4       | ESI-               | 169,0603 (1 mDa)                  | $C_7H_9N_2O_3$        | <br>1-sec-butylimidazolidine-2,4,5-trione  |

**Tabla 1.** Resumen de la información obtenida para los productos de transformación del bromacilo detectados en las experiencias de cloración.

ción del bromacilo, después de someter las aguas al proceso de cloración.

El TP1 ya había sido reportado en la literatura por el grupo de investigación (Ibáñez *et al.*, 2008) de la IUPA en estudios de fotodegradación en aguas. Aunque no se ha podido cuantificar exactamente al no disponer de patrón de referencia de este producto, los resultados indican que este TP es mayoritario, dada las grandes diferencias de área entre este compuesto y el resto. Para el TP2 se proponen dos posibles estructuras. De acuerdo con los datos disponibles, este TP no ha sido previamente reportado en la bibliografía, al igual que tampoco se ha hecho con el TP3. En cuanto al TP4, solo se dispone de su fórmula molecular, ya que no ha sido posible obtener información sobre su fragmentación. Su fórmula encaja con un compuesto que ya ha sido reportado en la literatura por otros autores como TP del bromacilo tras ser sometido a ozonólisis (Acher *et al.*, 1994; Hapeman *et al.*, 1997).

Para la confirmación inequívoca de las estructuras químicas de estos TP, sería necesario disponer de los correspondientes patrones de referencia. Tras llevar a cabo los ensayos de toxicidad que marca el RD 140/2003 en las aguas objeto de estudio, no parece que los TP originados presenten toxicidad apreciable.

## 5. Bibliografía

- [1] Acher, A.J.; Hapeman, C.J.; Shelton, D.R.; Muldoon, M.T.; Lusby, W.R.; Avni, A.; Waters, R. (1994). 'Comparison of formation of biodegradation of bromacil oxidation products in aqueous solutions'. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, núm. 42, págs. 2.040-2.047.
- [2] Detomaso, A.; Mascolo, G.; López, A. (2005). 'Characterization of carbofuran photodegradation by-products by liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry'. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, núm. 19, págs. 2.193-2.202.
- [3] García Reyes, J.F.; Ferrer, I.; Thurman, E.M.; Molina Díaz, A.; Fernández Alba, A.R. (2005). 'Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry'. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, núm. 19, págs. 2.780-2.788.
- [4] Hapeman, C.J.; Anderson, B.G.; Torrents, A.; Acher, A.J. (1997). 'Mechanistic investigations concerning the aqueous ozonolysis of bromacil'. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, núm. 45, págs. 1.006-1.011.
- [5] Hernández, F.; Marín, J.M.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Morell, I. (2008). 'Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast'. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, núm. 88, págs. 409-424.
- [6] Hernández, F.; Sancho, J.V.; Ibáñez, M.; Grimalt, S. (2008). 'Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS'. *Trends in Analytical Chemistry*, núm. 27, págs. 862-872.
- [7] Ibáñez, M.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Hernández, F. (2004). 'Use of quadrupole-time of flight mass spectrometry in environmental analysis: elucidation of transformation products of triazine herbicides in water after UV exposure'. *Analytical Chemistry*, núm. 76, págs. 1.328-1.335.
- [8] Ibáñez, M.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Hernández, F. (2008). 'Investigating the presence of pesticide transformation products in water by using liquid chromatography-mass spectrometry with different mass analysers'. *Journal of Mass Spectrometry*, núm. 43, págs. 173-184.
- [9] Kouloumbos, V.N.; Tsiipi, D.F.; Hiskia, A.E.; Nikolic, D.; Van Breemen, R.B. (2003). 'Identification of photocatalytic degradation products of diazinon in TiO<sub>2</sub> aqueous suspensions using GC/MS/MS and LC/MS with quadrupole time-of-flight mass spectrometry'. *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, núm. 14, págs. 803-817.
- [10] Marín, J.M.; Gracia Lor, E.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F. (2009). 'Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples. Study of matrix effects'. *Journal of Chromatography A*, núm. 1.216, págs. 1.410-1.420.
- [11] Miguel, N.; Ormad, M.P.; Lanao, M.; Mosteo, R.; Ovelleiro, J.L. (2008). 'Influencia de la naturaleza del carbón activo y la matriz acuosa en la adsorción de plaguicidas'. *Tecnología del Agua*, núm. 303, págs. 42-47.
- [12] Ormad, M.P.; Claver, A.; Miguel, N.; Ovelleiro, J.L. (2007). 'Eliminación de plaguicidas mediante procesos utilizados en España para la producción de agua potable'. *Tecnología del Agua*, núm. 290, págs. 26-40.
- [13] Ormad, M.P.; Miguel, N.; Claver, A.; Matesanz, J.M.; Ovelleiro, J.L. (2008). 'Pesticides removal in the process of drinking water production'. *Chemosphere*, núm. 71, págs. 97-106.
- [14] Ormad, M.P.; García Castillo, F.J.; Munarriz, B. (2009). 'Eliminación de plaguicidas en aguas de abastecimiento mediante cloración, ozonización y adsorción con GAC'. *Tecnología del Agua*, núm. 314, págs. 24-29.