

Estudio de la contaminación por pesticidas en aguas ambientales de la provincia de Almería

J. L. Martínez Vidal, M. J. González-Rodríguez, A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich

Dpto. Química Analítica, Universidad de Almería. Edificio de Química, 04120 Almería, España.

En este estudio se han determinado más de cuarenta plaguicidas (organofosforados y organoclorados), de entre los más ampliamente utilizados en tratamientos agrícolas en la provincia de Almería (España), en aguas ambientales de ésta área. El análisis de los plaguicidas se realizó mediante microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases con detección en modo de espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). Se tomaron 9 muestras de aguas superficiales y 15 muestras de aguas subterráneas procedentes de pozos superficiales de las principales áreas agrícolas de la provincia de Almería. Los plaguicidas más comúnmente encontrados en las muestras analizadas fueron endosulfan alfa, endosulfan sulfato y clorpirifos etil en las aguas subterráneas y endosulfan alfa, beta y sulfato en las aguas superficiales. Aunque el plaguicida encontrado a un mayor nivel de concentración fue malatión.

In this study, more than forty pesticides (organochlorine and organophosphorus), selected among the most widely used in the Almería province (Spain), have been monitored in environmental waters from the area. The pesticide analysis was carried out by solid-phase microextraction (SPME) coupled to gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS-MS). Nine samples of superficial waters and fifteen groundwaters were taken from the main agricultural areas of the Almería province. The most frequently encountered pesticides were endosulfan a, endosulfan sulphate and chlorpyrifos ethyl in groundwater samples, and endosulfan a, endosulfan b and endosulfan sulphate in superficial waters. Although, the pesticide found at the highest concentration level was malathion.

Introducción

En las últimas décadas, debido tanto a la explosión demográfica como al desarrollo industrial y agrícola se ha incrementado la demanda de agua. Ello ha repercutido en la calidad de las mismas, la cual puede verse modificada tanto por causas naturales como por factores externos y en este último caso se habla de contaminación. Por otro lado, el uso de productos químicos en las actividades agrícolas ha supuesto un beneficio sustancial en la producción agraria, incrementándose el rendimiento de las cosechas a la vez que se ha elevado la calidad de los alimentos. No obstante, frente al beneficio que supone la destrucción sistemática de parásitos que afectan a la salud de las plantas, animales y a la salud humana se debe tener presente la interacción de los distintos principios activos con las especies animales y con el propio hombre (Olea *et al.*, 1995).

La necesidad de elaboración de listas de contaminantes prioritarios, por parte de las administraciones públicas, es consecuencia de la necesidad de seleccionar para su control aquellos compuestos que presentan riesgos para el ecosistema acuático y para la salud humana a través de su difusión en el medio acuático. La confección de listas de contaminantes prioritarios exige un procedimiento simplificado de evaluación en base a principios científicos teniendo en cuenta los peligros intrínsecos de las sustancias, así como la exposición a las mismas de los ecosistemas. La idea básica es evaluar de manera sistemática las sustancias de las que existen datos suficientes en función de su riesgo relativo para el medio acuático y tras aplicar el dictamen de los expertos se procede a la selección final de las sustancias prioritarias.

Un gran número de sustancias químicas presentes en el medio ambiente tienen capacidad de alterar la homeostasis hormonal de los seres vivos, conociéndose con el nombre de disruptores hormonales o endocrinos, los cuales se definen como agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de hormonas naturales las cuales son responsables del mantenimiento del equilibrio orgánico, reproducción, desarrollo y/o comportamiento.

Los disruptores endocrinos se dividen en diferentes grupos, en función de las propiedades químicas: organohalogenados, plaguicidas, metales pesados, ftalatos, bisfenoles, alquilfenoles y otros compuestos. Los plaguicidas organoclorados, muchos de ellos con efecto hormonal, presentan en común su lipofilidad, baja presión de vapor y persistencia en el ambiente, siendo generalmente difícilmente biodegradables y presentando una alta persistencia en suelos que en ocasiones supera los 20 años. Muchos países industrializados han prohibido su empleo, con excepciones recogidas en varias normativas legales (Real Decreto 140/2003; BOE nº 45), debido a su efecto dañino para la salud, pero su síntesis y aplicación continúa en países en vías de desarrollo.

Entre los disruptores endocrinos cabe destacar los compuestos organoclorados, como endosulfán y DDT, ampliamente utilizados como insecticidas y altamente persistentes. El tratamiento con endosulfán induce actividad β -galactosidasa en levaduras transfectadas con el receptor estrógeno humano y de ratón. Se le ha atribuido también otras actividades hormonales, al ser un buen competidor para el receptor de progesterona y además disminuye la actividad de la progesterona por un mecanismo independiente del receptor (Jin *et al.*, 1997; Ramamoorthy *et al.*, 1997; Vonier *et al.*, 1996). El efecto hormonal de endosulfán se sospechó al observar la atrofia testicular y una caída de los niveles de testosterona en ratas y ratones expuestos al mismo (Maier-Bode *et al.*, 1968; Gupta *et al.*, 1979). Endosulfán tiene efecto estrogénico en líneas celulares humanas estrógeno-sensibles (Soto *et al.*, 1994; Rivas *et al.*, 2001). También se ha demostrado que endosulfán se une al receptor de estrógenos e induce la síntesis y secreción de proteínas estrógeno-inducidas y mimetiza el efecto estrogénico en muy diversos modelos *in vitro* e *in vivo* (Soto *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1999). El DDT, ampliamente usado desde 1940, ha sido prohibido en USA y Europa debido a su elevada toxicidad para el medioambiente, la vida salvaje y el hombre. Ello indujo a la búsqueda de materias activas con propiedades y estructuras similares, potenciándose así el uso de un conjunto de productos que ocupan un lugar de gran importancia en el total de plaguicidas empleados. El p,p'-DDT es el isómero más abundante a nivel medio ambiental (Shekhar *et al.* 1997). El p,p'-DDE es un metabolito del DDT al cual se le ha atribuido actividad estrogénica (Soto *et al.* 1995; Ren *et al.* 1996). Por otra parte, el p,p'-DDE aparece como un excelente competidor en el desplazamiento de la dihidrotestosterona por su enlace al receptor androgénico. Metoxicloro, otro plaguicida organoclorado de interés en este trabajo, tiene un espectro de toxicidad para los insectos más limitado que el DDT y presenta la ventaja de ser menos tóxico para los mamíferos, con actividad proestrogénica, necesita ser activado *in vivo* o alternativamente *in vitro* usando microsomas hepáticos (Stresser *et al.*, 1998) para la génesis del metabolito activo. Su actividad hormonal estrogénica ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* (Bulger *et al.*, 1978; Cummings *et al.*, 1994, 1995; Vom Saal *et al.*, 1995). Cuando se administra *in vivo* produce efectos adversos sobre la fertilidad y sobre la actividad uterina en hembras (Ousterhout *et al.*, 1981) y alteración del comportamiento sexual en animales machos expuestos intraútero (Cummings *et al.*, 1994, 1995).

Cada vez más, el conocimiento de los niveles de plaguicidas presentes en aguas superficiales y subterráneas se ha convertido en un tema de interés social debido a su posible impacto medioambiental. Ello genera la necesidad de metodologías analíticas capaces de determinar plaguicidas a niveles trazas con un nivel de fiabilidad aceptable.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica simple que aúna los pasos de extracción y concentración, no utiliza disolventes y permite la automatización en las etapas de preconcentración y análisis. Se pueden utilizar volúmenes pequeños de muestra sin perder sensibilidad, pudiendo alcanzar la determinación de compuestos a niveles de mg l^{-1} y ng l^{-1} . Esta técnica de extracción-preconcentración acoplada en-línea a cromatografía de gases - espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) constituye una herramienta analítica muy potente para el análisis de trazas de plaguicidas en muestras acuosas.

El método desarrollado en este trabajo es aplicable al análisis de 43 plaguicidas (**Tabla 1**) (organoclorados y organofosforados) a los niveles exigidos por la legislación para aguas de consumo humano (BOE nº 45, Real Decreto 140/2003, EEC y ?Drinking Waters Directive?, Official Journal N229/112,18). Los plaguicidas objeto de estudio han sido seleccionados de entre los más utilizados en tratamientos agrícolas en el sudeste español en los últimos 20 años y además teniendo en cuenta que presentan propiedades para su bioacumulación. El uso de la detección de masas en tándem (MS/MS) presenta una mejora en la sensibilidad y selectividad del método analítico para el análisis de trazas, permitiendo una confirmación inequívoca de los positivos mediante la comparación de los espectros de MS/MS del estándar y de la muestra.

Tabla 1. Lista de plaguicidas estudiados

Pentaclorobenceno (IS)	Fention
Tionazin	Paration etil
Etoprofos	Endosulfan Lactona
Hexaclorobenceno	Heptacloro epoxido
Alfa-Lindano	Isofenfos
Sulfotep	Clorfenvinfos
Dicloran	Quinalfos
Pentacloronitrobenzeno	Endosulfan a
Dimetoato	Dieldrin
Gamma-Lindano	Fenaminfos
Beta-Lindano	p,p-DDE
Clortalonil	Endrin
Endosulfan eter	o,p-DDT
Delta-Lindano	Etion
Etrimfos	Endosulfan b
Clorpirifos metil	Endosulfan sulfato
Heptacloro	p,p-DDT
Paration metil	Famfur
Vinclozolina	Metoxicloro I
Aldrin	MetoxicloroII
Pirimifos metil	Mirex
Clorpirifos etil	Fosalon
Malation	

El objetivo de este trabajo es el estudio de los niveles de contaminación por plaguicidas en las aguas superficiales y subterráneas de la provincia de Almería.

Metodología analítica

Área en estudio

Se tomaron 9 muestras de aguas superficiales en ramblas con llegada al mar de la provincia de Almería, afectadas por el desarrollo agrícola, además de una muestra tomada en una zona no afectada que fue utilizada como blanco de campo.

Por otro lado, se tomaron 15 muestras de aguas subterráneas procedentes de pozos superficiales (entorno a 8-12 m de profundidad) de las principales áreas agrícolas de la provincia de Almería. Dichas áreas son el Campo de Dalías (**Figura 1**), con una extensión de más de 30.000 Ha cubiertas por invernaderos y el bajo Andarax. También se tomó una muestra procedente de un pozo profundo (más de 300 m), que se utilizó como blanco de campo.

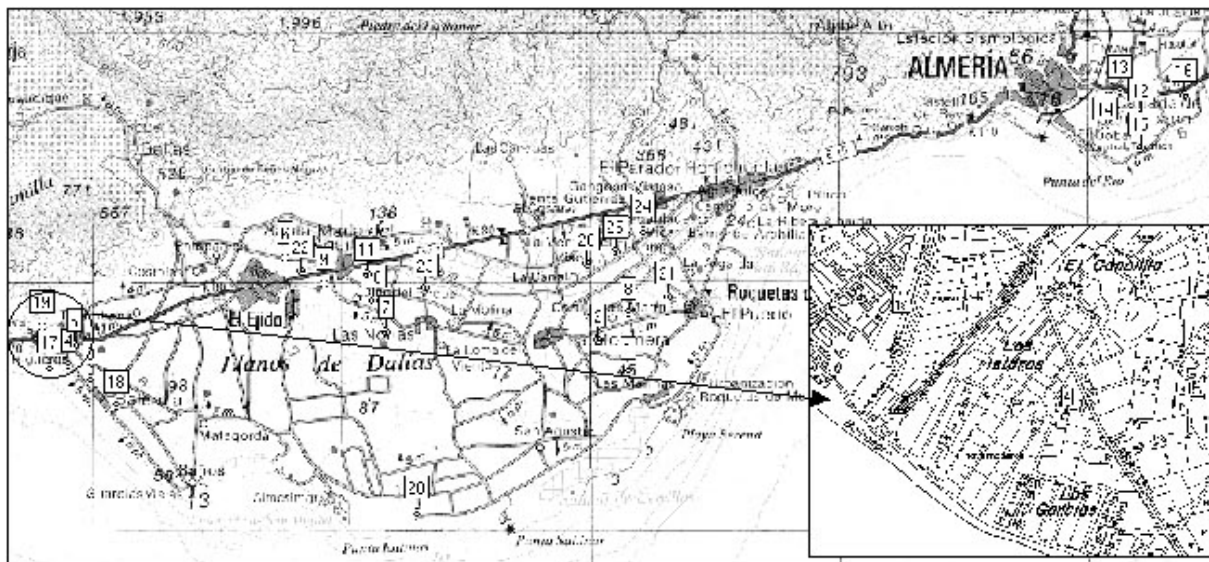


Figura 1. Zona de muestreo de aguas en la zona de influencia agrícola de Dalías y del bajo Andarax en la provincia de Almería

Muestreo

Las muestras se tomaron en botellas de vidrio topacio de 1 L de capacidad cerradas con tapones de teflón y refrigeradas en el campo. En el laboratorio, las muestras se conservaron en oscuridad y a 4 °C hasta su extracción (menos de 24 h). El muestreo se realizó durante el mes de mayo de 2004.

Extracción de los plaguicidas

Para la extracción de los plaguicidas de la matriz acuosa se utilizó la microextracción en fase sólida (SPME), utilizando fibras de PDMS-DVB (polidimetilsiloxano-divinilbenceno) de 65 mm de espesor.

Se tomaron alícuotas de 995 mL de las muestras de aguas, una vez que se había ajustado la conductividad a 50 mS mediante adición de NaCl, y se añadieron 5 mL de estándar interno (disolución de pentaclorobenceno 2 mg L⁻¹ en acetona).

La adsorción de los analitos se llevó a cabo por inserción de la fibra en la muestra y posterior desorción térmica para su análisis en el equipo de GC-MS/MS. La fibra de SPME se mantuvo en la disolución en continua agitación durante un tiempo de 55 minutos a una temperatura de 30 °C, posteriormente se desorbió durante 15 minutos en el inyector. La temperatura del inyector era inicialmente de 250 °C la cual se mantuvo durante 5 minutos y se aumentó hasta 310 °C a razón de 100 °C min⁻¹, donde se mantuvo durante 5 minutos. La válvula de división se mantuvo cerrada durante 9 minutos.

La temperatura de la columna fue 70 °C, la cual se mantuvo durante 9 minutos incrementándose hasta 95 °C a razón de 50 °C min⁻¹, posteriormente se incrementó hasta 165°C a razón de 5 °C min⁻¹, seguidamente se incrementó hasta 190 °C a razón de 20 °C min⁻¹ y por último se incrementó hasta 300 °C a razón de 100 °C min⁻¹ donde se mantuvo 5 minutos.

La temperatura para el cuerpo de la trampa, la interfase y trampa de iones fue 50 °C, 280°C y 200 °C respectivamente. La corriente de emisión fue de 80 mA, el voltaje de la amplitud de la modulación axial de 3 V y el voltaje del electrón multiplicador de 1700 V. Se activó el control automático de ganancia con 200 cuentas (25 ms de tiempo máximo de ionización). Las condiciones MS/MS fueron optimizadas para cada uno de los compuestos analizados. Los espectros obtenidos bajo las condiciones experimentales finales se almacenaron en una librería espectral.

Resultados y discusión

En el desarrollo de metodologías analíticas para el análisis de plaguicidas en aguas se consideran básicamente dos etapas. La primera es el establecimiento de las condiciones instrumentales para el análisis de los compuestos por GC-MS/MS y la segunda es la optimización de los procesos de extracción mediante el tiempo de adsorción-desorción y temperaturas de adsorción-desorción. Por último, se aplica la metodología desarrollada al análisis de muestras reales.

Establecimiento de la metodología analítica

El método muestra una excelente linealidad en el rango estudiado ($25-1000 \text{ ng L}^{-1}$), con valores del coeficiente de determinación mayores a 0.99. Las muestras que presenten una concentración de plaguicida mayor al rango estudiado se reanalizarán tras la correspondiente dilución. En cuanto a la precisión del método, medida como desviación estándar relativa, fue menor del 20 % para todos los compuestos analizados. El método presenta una excelente sensibilidad, los límites de detección varían entre 1 y 6 ng L^{-1} y los límites de cuantificación entre 3-18 ng L^{-1} . En la **Figura 2** se muestra un cromatograma para la mezcla de los compuestos objeto de estudio en modo full scan.

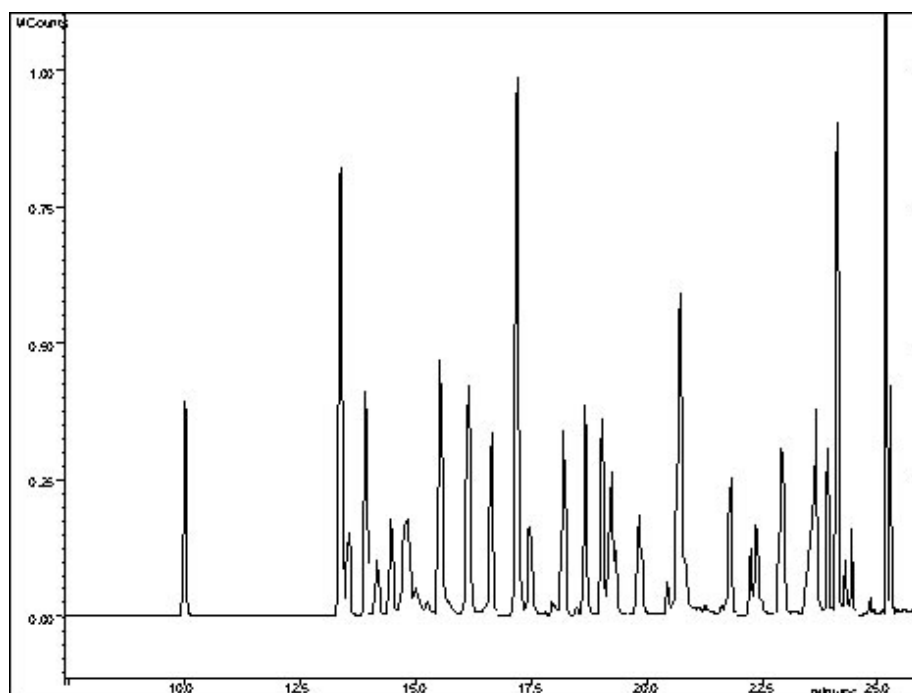


Figura 2. Cromatograma en modo MS/MS de la mezcla de compuestos.

Extracción de los plaguicidas

Para la extracción de los analitos se utilizó SPME optimizando varios factores: tipo de fibra, PDMS y PDMS-DVB; tiempo de adsorción y desorción; temperatura de adsorción y desorción; adición de NaCl y uso de agitación. El procedimiento final optimizado descrito anteriormente ofrecía los mejores resultados para la mayoría de los compuestos, obteniendo recuperaciones entre 70 y 120 %.

Aplicación del método al análisis de muestras de aguas

Una vez validada la metodología analítica se aplicó al estudio de la contaminación por plaguicidas en muestras de aguas superficiales y subterráneas de la provincia de Almería.

Cabe destacar que se aplicó un control de calidad interno consistente en el análisis de un blanco de laboratorio, un blanco de campo, y un blanco fortificado junto con cada set de muestras. Los porcentajes de recuperación deberían oscilar entre 70-120% para la cuantificación de los resultados identificados como positivos. Para la confirmación mediante GC-MSMS el ajuste espectral (**Figura 3**) debería tener un valor superior a 700 al comparar los espectros obtenidos en las muestras analizadas con los almacenados en la librería MS/MS construida en las mismas condiciones experimentales. Además la relación señal / ruido (S/N) tenía que ser mayor o igual que 3 ó 10 para la identificación y cuantificación respectivamente.

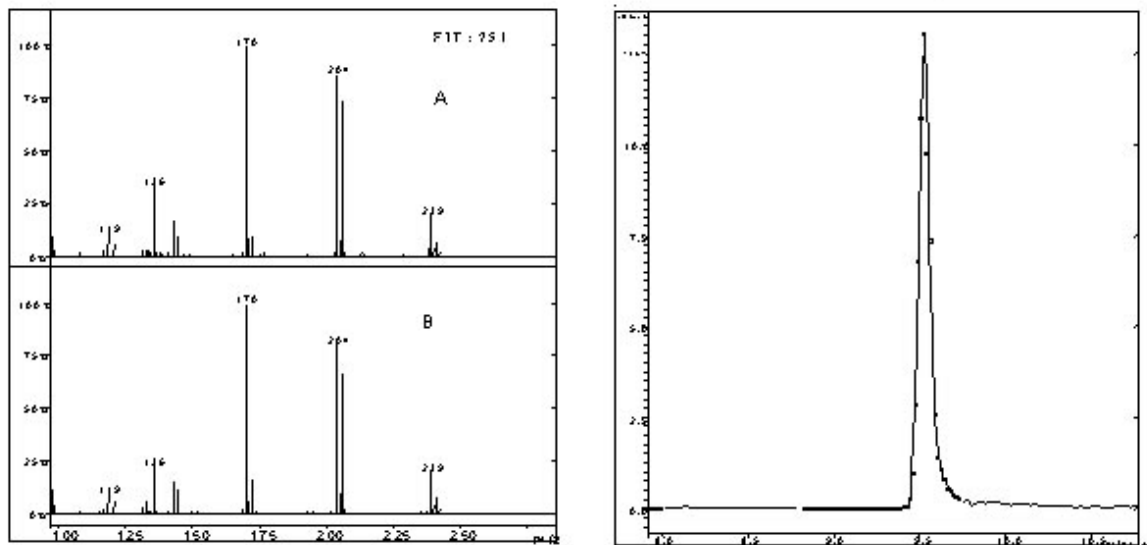


Figura 3. Positivo de endosulfan α ($0,34 \text{ mg L}^{-1}$) en la muestra 4. A) Espectro MS/MS de la muestra y B) Espectro MS/MS de la librería.

En las muestras procedentes de aguas subterráneas (muestras 1-16) se encontraron plaguicidas en 10 de las 16 muestras analizadas, siendo endosulfan α , endosulfan sulfato y clorpirifos etil los plaguicidas más frecuentemente encontrados, aunque la mayor concentración detectada correspondió a malation en la muestra 13 (**Tabla 2**). Las muestras 5, 7, y 15 presentaron valores de endosulfan α superiores al máximo nivel permitido según el Real Decreto 140/2003 de calidad de aguas de consumo establecido en $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ por compuesto individual, excepto para los plaguicidas aldrín, dieldrín, heptacloro y heptacloro epóxido fijados en $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$. También se encontró aldrín en la muestra 15 a una concentración superior al máximo establecido para aguas de consumo. Asimismo, se encontraron residuos de otros plaguicidas en algunas muestras como p,p-DDE, p,p-DDT, metoxicloro y lindano. Cabe destacar que el agua suministrada por los pozos superficiales objeto de estudio es utilizada en la actualidad como aguas para riego de cultivos en invernaderos, aunque años anteriores era utilizada como agua de consumo.

Tabla 2. Resultados obtenidos ($\mu\text{g L}^{-1}$) en el análisis de las muestras de aguas subterráneas en la provincia de Almería.

Analito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Gamma-Lindano		0.10														
Endosulfan eter																
Delta-Lindano																
Paration metil																
Aldrin															0.06	
Pirimifos metil																
Clorpirifos etil		0.08					0.09			0.08						
Malation												42.89				
Isofenfos																
Endosulfan a					0.34		0.25								0.34	
Dieldrin																
p,p-DDE			0.02													
p,p-DDT				0.06												
Endosulfan b																
Endosulfan sulfato	0.04				0.05										0.05	
p,p-DDT		0.06														
Metoxicloro		0.05														

De igual manera se analizaron las 10 muestras de aguas superficiales procedentes de ramblas de la misma región. En 8 de las 10 muestras se encontraron residuos de plaguicidas. Los plaguicidas más comúnmente encontrados fueron endosulfan (a, b) y sus isómeros y productos de degradación (eter y sulfato) (**Tabla 3**), al igual que en las aguas subterráneas. Endosulfan alcanzó un amplio uso como producto fitosanitario, siendo el plaguicida más vendido dentro del grupo de los organoclorados durante varios años en la provincia Almería, lo cual podría explicar su presencia tanto en las aguas superficiales como subterráneas. Sin embargo, no se encontraron residuos de p,p DDT, p,p DDE u otros plaguicidas organoclorados en las diez muestras de aguas de ramblas analizadas. Este hecho, podría poner de manifiesto que los residuos encontrados en las muestras de aguas subterráneas probablemente sean debidos a su persistencia en el medio ambiente.

Tabla 3. Resultados obtenidos ($\mu\text{g L}^{-1}$) en el análisis de las muestras de aguas de ramblas en la provincia de Almería.

Analito	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Gamma-Lindano										
Endosulfan eter	0.04			0.04				0.03	0.13	
Delta-Lindano										
Paration metil				1.94						
Aldrin										
Pirimifos metil										0.16
Clorpirifos etil						0.28	0.08			
Malation				0.18						0.14
Isofenfos									0.07	
Endosulfan a	0.81			1.09		0.20	0.11	0.11	0.28	0.16
Dieldrin	0.12									
p,p-DDE										
p,p-DDT										
Endosulfan b	0.16			0.08		0.08	0.06	0.06	0.05	

Endosulfan sulfato	0.15			0.09	0.04	0.08	0.04	0.04	0.04	0.05
p,p-DDT										
Metoxicloro										

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran como las prácticas agrícolas desarrolladas en la provincia de Almería han degradado la calidad de las aguas tanto superficiales como subterráneas. En consecuencia, resulta evidente la necesidad de un control sistemático de plaguicidas en esta área, ya que el conocimiento de la calidad de un recurso natural escaso en nuestra provincia, así como la protección del mismo frente a la contaminación es de interés desde el punto de vista medioambiental.

La metodología analítica propuesta mediante SPME-GC-MS/MS permite la extracción, preconcentración y determinación de estas sustancias a los niveles exigidos por la legislación europea para aguas de consumo humano con un elevado grado de confianza.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

Referencias

Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., y cols. 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect.*, 107:89-108.

BOE nº 45, Real Decreto 140/2003, de 7 de Febrero, por la que se establecen los criterios sanitarios de la calidad de aguas de consumo humano.

Bulger, W.H., Muccitelli, R.M. y Kupfer, D. 1978. Studies on the in vivo and in vitro estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic mono-oxygenase in methoxychlor activation. *Biochem Pharmacol.* 27:2417-2423.

Cummings, A.M., y Metcalf, J.L., 1994. Mechanisms of the stimulation of rat uterine peroxidase activity by methoxychlor. *Reprod. Toxicol.* 8:477-486.

Cummings, A.M., y Metcalf, J.L. 1995. Methoxychlor regulates rat uterine estrogen-induced protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130:154-160.

EEC, ?Drinking Waters Directive?, Official Journal N229/11, Directive 80/778/EEC (1988).

Gupta, P.K. y Gupta, R.C., 1979. Pharmacology, toxicology and degradation of endosulfan. *A. Review Toxicol.*, 13:115-130 (1979).

Jin, L., Tran, D.Q., Ide, C.F., McLachlan, J.A., Arnold, S.F., 1997. Several synthetic chemicals inhibit progesterone receptor-mediated transactivation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 233:139-146.

Maier-Bode, H., Properties, effect, residues and analytics of the insecticide endosulfan. *Residue Rev.*, 22:1-44 (1968).

Olea N., Molina M.J ., García-Martin M., Modern agricultural practices: The human price. *Comments Toxicology.*, 5: 447. (1995).

Ousterhout, J., Struck, R.F. y Nelson, J.A., 1981. Estrogenic activites of methoxychlor metabolites. *Biochem. Pharmacol.*, 30:2869-2871.

Ramamoorthy, K., Wang, F., Chen, I.C y cols. 1997. Potency of combined estrogenic pesticides. *Science.*, 275: 405.

Ren, L., Lattier, D., Lech, J.J., Estrogenic activity in rainbow trout determined with a new cDNA probe for vitellogenesis, pSG5Vg1.1. *Bull Environ Contam Toxicol.*, 56:287 (1996).

Rivas, A., Fernández, M.F., Cerrillo, I., Ibarluzea, J., Olea-Serrano, M.F., Pedraza, V., Olea, N., Human exposure to endocrine disrupters: standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS.*, 109:1-13 (2001)

Shekhar, P.V., Werdell, J. y Basrur, V.S. 1997. Environmental estrogen stimulation of growth and estrogen receptor function in preneoplastic and cancerous human breast cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 89:1774-1792.

Soto, A., Chung, K.L., Sonnenschein, C., Fernández, M.F., Olea, M.F. y Olea, N., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* 103:113-122.

Soto, A.M., Chung, K.L., Sonnenschein, C., 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health Perspect.* 102: 380-383.

Stresser, D.M. y Kupfer, D. 1998. Human cytochrome P450-catalyzed conversion of the proestrogenic pesticide methoxychlor into an estrogen. Role of CYP2C19 and CYP1A2 in O-demethylation. *Drug Metab Dispos.* 26(9): 868-74.

Vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Palanza, P., Boehler, M., Parmigiani, S. y Welshons, W.V. 1995. Estrogenic pesticides: Binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behaviour in male mice. *Toxicol. Lett.* 77:343-350.

Vonier, P.M., Crain, D.A., McLachlan, J.A., Guillette, L.J. y Arnold, S.F. 1996. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ. Health Perspect.* 104:1318-1322.