

LOS SENSORES BIOACTIVOS, NUEVO METODO ANALITICO

RODRIGO POZO LORA
ACADEMICO CORRESPONDIENTE

Se está desarrollando una nueva tecnología analítica, consecuencia de la conjunción de la biología molecular con la electrónica, que por lo simple, rápida, económica y eficiente, y por la posibilidad de su utilización de forma continua en pequeñas muestras, se prevee que va a tener una extensa aplicación. Consideramos por ello que es oportuno comunicar a esta Real Academia, los fundamentos y aplicaciones de los sensores bioactivos. Este método analítico ha sido puesto a punto, especialmente para el control del pescado, por investigadores japoneses de la Universidad de Pesquerías de Tokyo y del Instituto de Tecnología de la misma capital.

La metodología de los sensores bioactivos requiere precisar conceptos y matizar adecuadamente términos que posteriormente utilizaremos.

Reciben muy diversas denominaciones que no siempre son sinónimos, ya que algunas de ellas son específicas. En general podemos citar los términos, sensores bioactivos, sensores con sustrato bioactivo y biosensores, y según que la molécula orgánica bioactiva sea enzima o anticuerpo, se denominan sensores enzimáticos o electrodos enzimáticos, y sensores inmunológicos o inmunosensores. Son sensores microbianos o electrodos microbianos cuando los microorganismos inmovilizados actúan como complejos enzimáticos.

Se considera sensor el elemento que traduce un estímulo, generalmente físico, en una señal, generalmente electrónica que tiene posibilidad de entrar en un ordenador. El término bioactivo alude a que el elemento activo es una molécula orgánica, una molécula biológica.

El sensor bioactivo es un instrumento de análisis que tiene dos elementos fundamentales: un receptor y un transductor. El receptor es una molécula biológica, una molécula orgánica bioactiva, capaz de reconocer específicamente la molécula que se trata de detectar y medir (analito), capacidad específica que posee aunque exista presencia de otros tipos de moléculas. El receptor es sensible, es capaz de recibir exclusivamente la presencia del analito, actúa específicamente con un solo analito.

El transductor, físico-químico, está en íntimo contacto con el receptor, y es el elemento que transforma la interacción del receptor con el analito en señal, eléctrica u óptica, susceptible de ser amplificada y evaluada mediante un dispositivo electrónico u optoelectrónico. El transductor cambia la conducta, la interacción en señal, con posibilidad de ser registrada y cuantificada.

El receptor del biosensor es una molécula biológica, que puede estar representada por una enzima o por anticuerpos monoclonales, que se encuentran inmovilizados en membranas por unión covalente, aunque también pueden estarlo por absorción, microencapsulación, reticulación o entrecruzamiento. En los sensores microbianos el receptor es un microorganismo vivo inmovilizado.

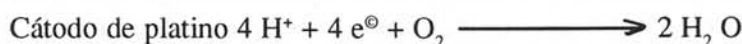
El receptor de los sensores enzimáticos, la enzima, cataliza específicamente la reacción correspondiente, es decir aumenta o disminuye la velocidad de reacción. Permanece inalterada después de la reacción, lo que al estar inmovilizada permite utilizarla en múltiples mediciones. La técnica de los sensores enzimáticos está limitada al número de enzimas; en muchos casos no es posible obtener una enzima para metabolizar determinado analito que nos interesa.

Las enzimas inmovilizadas tienen mayor estabilidad que en medios líquidos, son reutilizables y la muestra se puede separar para análisis posteriores. No obstante la inmovilización puede causar perturbaciones estructurales en la proteína que pueden reducir la eficacia catalítica, producir efectos de partición (actividad en la superficie del soporte, diferente del grueso de la solución), o efectos disfuncionales (por inmovilidad de la película líquida, o atrapamiento de las enzimas por polímeros).

Recordemos que las enzimas tienen naturaleza protéica y son activas a muy pequeñas dosis (una molécula de catalasa puede descomponer cinco millones de moléculas de agua oxigenada en un minuto), exigiendo condiciones especiales de pH y de temperatura.

En los sensores enzimáticos el transductor más frecuente es el electrodo tipo Clark o electrodo de oxígeno; también se utiliza el electrodo de vidrio, que es una sonda sensora potenciométrica.

El electrodo de oxígeno tipo Clark es una sonda sensora amperiométrica, que tiene, un cátodo de platino y un ánodo de plata sumergidos en la misma solución de cloruro potásico, y separados de la solución problema por una membrana de poli-tetra-fluoretileno (teflón), que al aplicar un potencial de 0'5-0'8 V entre los dos electrodos la corriente que se genera es proporcional a la concentración de sustrato en la solución problema. El ánodo puede ser de aluminio y el cátodo de platino. Las reacciones que se suceden son las siguientes:



El electrodo mide la concentración de oxígeno, deducida de la intensidad de la corriente en microamperios.

En los inmunosensores o sensores inmuloógicos, el receptor está constituido por anticuerpos monoclonales inmovilizados. Son estas biomoléculas extraordinariamente sensibles que interaccionan con las correspondientes moléculas antigénicas. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse con técnicas perfectamente establecidas y muy contrastadas; sólo presentan el problema que no son reutilizables, pueden actuar una sola vez, por la irreversibilidad o difícil reversibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo, lo que obliga a profundizar las investigaciones para tratar de conseguir poderlos utilizar en su día como material desechable, de un solo uso. Los anticuerpos tienen también el inconveniente de que la reacción antígeno-anticuerpo no genera ningún subproducto, como ocurre con las enzimas, y el tiempo de reacción es mucho mayor que el tiempo de estabilización de una reacción enzima-sustrato.

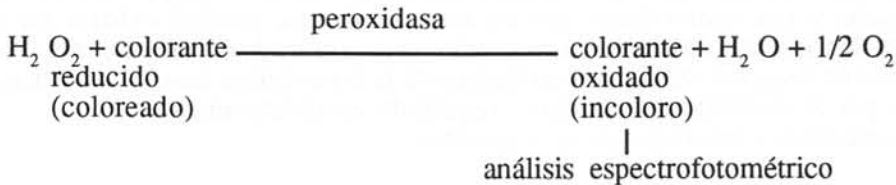
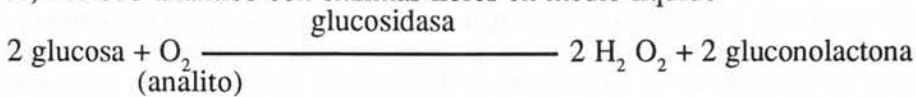
El rango de utilización de inmonosensores es muy superior al de los sensores enzimáticos, pueden ser tantos como antígenos. Los anticuerpos monoclonales tienen más constante especificidad que los policlonales, y mayor facilidad de obtención en pureza y cantidad.

Para los sensores inmulógicos se utilizan tres tipos de transductores: transductor de transistor de efecto de campo, transductor piezoeléctrico y transductor optoeléctrico de onda evanescente.

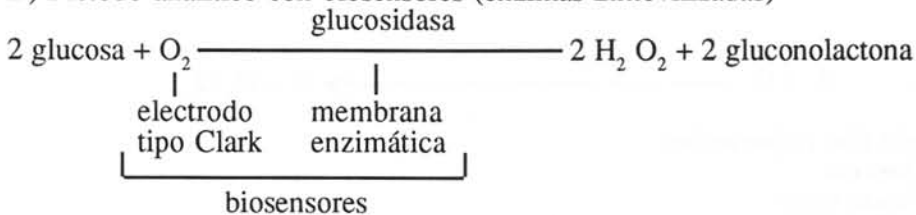
En el transductor de transistor de efecto de campo, las tensiones modificadas por la interacción antígeno- anticuerpo generan una intensidad de drenaje en el transistor, entre puerta y surtidor, proporcional a la concentración del analito. En el transductor piezoeléctrico, de cristales de cuarzo o de ciertos plásticos, el cambio de masa generado por la reacción antígeno-anticuerpo se traduce por variaciones (disminución) en la frecuencia de resonancia del cristal relacionada con la concentración del analito. Sobre el cristal deben fijarse los anticuerpos en monocapa aplanada. En los transductores optoeléctricos de onda evanescente la intensidad de la radiación luminosa, que se propaga por un conductor óptico, determina un campo electromagnético que se manifiesta en la onda evanescente detectable. Los anticuerpos unidos a la superficie del conductor óptico al acoplarse a los antígenos aumentan el espesor de la capa molecular e influyen en la onda evanescente.

A continuación exponemos esquemáticamente, como ejemplo, las reacciones que se producen durante la utilización del electrodo enzimático en el análisis de glucosa; previamente damos las reacciones cuando la utilización de las enzimas se hace por método convencional, libres, en medio líquido.

A) Método analítico con enzimas libres en medio líquido



B) Método analítico con biosensores (enzimas inmovilizadas)



C) También las enzimas pueden inmovilizarse:

- a) en reactores de lecho empaquetado
- b) en reactores tubulares abiertos

En el método ELISA (ensayo inmulógico absorbente con enzima acoplado) se utilizan enzimas acoplados; es una reacción antígeno-anticuerpo en la que el antígeno o el anticuerpo es el analito, y una vez producida la reacción se provoca una nueva

reacción antígeno-anticuerpo, en la que se utiliza un segundo anticuerpo con enzima acoplado (marcado con una enzima), que es anticuerpo del primer anticuerpo (antisuero) que se ha utilizado en este caso como antígeno. El sustrato sobre el que actúa el enzima puede ser cromogénico y una vez producida la primera reacción y lavado, y la segunda reacción, e incubado con el sustrato, se mide, la degradación enzimática producida, mediante espectrofotometría.

Las membranas enzimáticas pueden tener inmovilizada una sola enzima (monofuncionales) acoplada a un electrodo de oxígeno; o bien dos o tres enzimas en la misma membrana (multifuncionales): no conocemos biosensores con más de tres enzimas inmovilizadas en una membrana. Una membrana multifuncional puede tener acoplado un solo electrodo de oxígeno. Incluso cuatro enzimas en dos membranas superpuestas, una con tres enzimas y otra con una, y un electrodo de oxígeno. En otros casos se utiliza una columna de resina por donde pasa la muestra con sucesivas soluciones tampón, de diferente composición, que arrastran los componentes al analizar de forma escalonada, que las membranas enzimáticas y un electrodo van analizando. O bien una alícuota de la muestra es arrastrada por un tampón (p.e. no fosfato) y seguidamente otro tampón (p.e. fosfato) arrastra otra alícuota y los dos registros obtenidos dan el resultado analítico de los dos compuestos; p.e. primero, hipoxantina y en segundo lugar, hipoxantina junto con inosina.

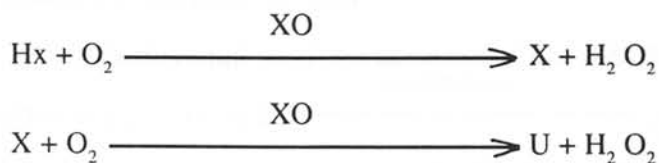
Igual que se perfecciona el biosensor inmovilizando varios enzimas también se ha simplificado y completado el análisis por biosensores utilizando varios electrodos de oxígeno, constituyendo un sensor multielectrodo.

Un completo equipo informático con el correspondiente programa permite obtener los resultados ya elaborados en un brevísimo tiempo; para lo cual la señal ingresa en el sistema informático previamente acoplado.

Vamos a exponer el primero de los sensores enzimáticos descritos para determinar hipoxantina que ha servido de referencia para la mayor parte de los sensores propuestos. La hipoxantina es un compuesto derivado de la degradación post-mortem del ATP del músculo, que en el pescado se utiliza para determinar su grado de frescura.

Watanabe y col. inmovilizan, por enlaces covalentes, xantina oxidasa en una membrana de triacetato de celulosa conectada con un electrodo de oxígeno tipo Clark. El consumo de oxígeno, debido a la oxidación de la hipoxantina hasta ácido úrico, es detectado por el electrodo de oxígeno y registrado cuantitativamente.

Las reacciones y enzimas son las siguientes:



Donde Hx: Hipoxantina

X: Xantina

U: Acido úrico

XO: Xantina oxidasa

La preparación de la membrana con la enzima inmovilizada es la siguiente: se disuelve triacetato de celulosa en diclorometano y glutaraldehído al que se añade diaminoaminometiloctano. La mezcla homogénea se extiende sobre el cristal plano y se deja en reposo dos días a temperatura ambiente. Se corta la membrana en trozos de 0'7x0'7 cm², se desmontan en agua destilada y se lavan con tampón fosfato 0'05 M (pH 7'5). Diez de estas membranas se sumergen en 3 ml de tampón fosfato 0'05 M (pH

7'8) que contiene la xantina oxidasa (300 ul (120 unidades)), que permanecen en contacto 48 h. a 5° C. Se mejora la estabilidad incubando las membranas con cisteína (0'1 mm) (en 5 ml de tampón 0'05M Tris-HCl (pH 8'4) a 5° C durante 24 horas. Las membranas se conservan a 5° C durante 24 horas. Las membranas se conservan a 5° C hasta su uso. Pueden servir hasta para cien análisis.

El extracto de muestra (del pescado en este caso) a analizar se prepara tomando tejido muscular (2 g) al que se añade ácido perclórico (al 10%) para precipitar las proteínas, que se eliminan por centrifugación, se neutraliza el sobrenadante con KOH 10N y se completa con tampón fosfato (pH 7'8) que contiene cisteína.

El diagrama de flujo parte de un baño termostático que contiene tampón fosfato (0'05 M, pH 7'8) y 0'1 mM de cisteína, en su trayecto de la línea de flujo, antes de llegar a la celda de flujo o de reacción, desemboca la puerta de inyección para la muestra; la celda de reacción tiene la membrana con las enzimas inmovilizadas, flanqueadas por una membrana de teflón permeable al oxígeno y otra membrana de acetato de celulosa, y el electrodo de oxígeno, está termostatizada; después de la celda el flujo continúa hasta terminar en una bomba peristáltica que permite la circulación. El electrodo de oxígeno transmite la señal a un registrador.

La solución tampón es transferida continuamente al sensor enzimático por la bomba peristáltica y en el registro se aprecia una respuesta constante del electrodo. Se inyectan en el circuito 20 ul. de la solución de hipoxantina o de extracto de pescado y se observa en el registro un descenso en microamperios, respuesta proporcional a la cantidad, que se utiliza para medir la concentración de hipoxantina.

Previamente a la prueba de análisis del pescado se ha obtenido una curva de calibración con soluciones patrón de hipoxantina.

Las condiciones óptimas de la prueba son las siguientes: caudal de flujo 1 ml./minuto, volumen de muestra 20 ul, temperatura 32°C, pH 7'8.

Se han propuesto sensores microbianos, electrodos microbianos, consistentes en microorganismos inmovilizados y un dispositivo electroquímico, que han sido aplicados a determinaciones de la demanda bioquímica de oxígeno, alcoholes, ácido acético y vitaminas. El grado de asimilación de sustancias orgánicas por los microorganismos puede determinarse por la actividad respiratoria de los microorganismos directamente midiendo el consumo de oxígeno por medio de un electrodo de oxígeno. Los sensores microbianos no son tan específicos como los sensores enzimáticos o los inmunosensores, debido a la complejidad bioquímica del receptor en este caso. Así por ejemplo la levadura *Trichosporon brassicae* puede utilizarse para determinar ácido acético, alcohol etílico, ácido propiónico y ácido butírico. Por ello hemos de conocer la no presencia de compuestos que puedan dar lugar a errores, o utilizarlos sabiendo sus verdaderas posibilidades para el problema a estudiar.

Se inmovilizan los microorganismos en matrices de fibras de colágeno, geles de agar o de poliacrilamida y más frecuentemente entre membranas porosas, una de teflón y otra de compuestos de celulosa (nitrato o acetato), a manera de sandwich, e incluida en la luz de una celda de flujo o de reacción.

La levadura *Trichosporon cutaneum* inmovilizada entre membrana de teflón y membrana de acetato de celulosa se ha utilizado, con electrodo de oxígeno, para determinar la demanda bioquímica de oxígeno, que es la medida más importante de la polución orgánica.

También otra levadura del mismo género, *Trichosporon brassicae*, se ha utilizado para determinar el ácido acético, inmovilizada entre membranas de teflón y de acetato de celulosa, y electrodo de oxígeno.

Watanabe y col. aplican los sensores microbianos a la determinación de la frescura del pescado; sus resultados son comparables al índice K (porcentaje de inosina e hipoxantina en la cantidad total de ATP y sus compuestos relacionados, que se emplea

para la determinación de la frescura enzimática del pescado). Durante la conservación del pescado los compuestos de mayor peso molecular, como proteínas y glucógeno, se degradan en compuestos de menor peso molecular que pueden ser utilizados más fácilmente por los microorganismos; la actividad metabólica de los microorganismos es medida directamente por el consumo de oxígeno por medio de un *Alteromonas putrefaciens*, microorganismo de la alteración del pescado, de cultivo reciente y en número constante ($5 \times 10^8/\text{cm}^2$), que es inmovilizado entre dos membranas, una de nitrato de celulosa (poro $0.45 \mu\text{m}$) que ha servido como filtro de membrana para retener a los gérmenes, y otra de acetato de celulosa (membrana de diálisis) superpuesta a la anterior para inmovilizarlos. El electrodo de oxígeno utilizado consta de un cátodo de platino y un ánodo de plomo con electrolito alcalino, separado de la membrana microbiana por una membrana de teflón permeable al oxígeno. La muestra es un extrato de músculo en agua destilada (5 g en 15 ml de agua destilada, homogeneizado, filtrado y completado hasta 20 ml con agua destilada).

El caudal de flujo es 1 ml/minuto, la temperatura 25°C , pH 7.2 y volumen de muestra 30 μl . Primero se pasa por el sensor microbiano el medio de cultivo (respuesta B) y después el extracto de la muestra (respuesta A). La frescura del pescado viene determinada por la relación A/B; la menor relación representa la mejor frescura. Existe una estrecha correlación con el índice K. En la realización del análisis se tardan trece minutos.

Otros electrodos microbianos utilizan el electrodo de vidrio, sonda potenciométrica. Así Matsunaga y col. (1978) forman un sensor microbiano con *Lactobacillus arabinosus*, atrapados en gel de agar, para determinar el ácido nicotínico; el ácido láctico producido por el bacilo da lugar a una diferencia de potencial entre el medio inicial y el medio incubado durante una hora, que tiene una relación lineal con el logaritmo de la concentración de ácido nicotínico, que permite determinarlo cuantitativamente, previa curva de calibración.

Con esta tecnología se abre un amplísimo campo de posibilidades. Generalmente los problemas analíticos en que se pueden aplicar los biosensores, están resueltos; pero con estos nuevos instrumentos se consigue mayor eficiencia, mayor rapidez y muy fácil utilización con pequeñas cantidades de muestra. Es también posible su utilización para resolver problemas pendientes o de nuevo planteamiento. La rapidez puede modificar las decisiones sobre problemas analíticos, ya que en determinados procesos de degradación química, si se utiliza un procedimiento convencional cuando se obtiene el resultado es ya demasiado tarde, mientras tanto se han instaurado nuevas modificaciones.

Se han descrito biosensores que actúan sobre: glucosa, sacarosa, maltosa, ácido úrico, demanda bioquímica de oxígeno, alcohol etílico, ácido acético, vitaminas, glutamina, colesterol, monoaminas, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido ascórbico y nucleóticos del pescado.

Los análisis clínicos, en medicina humana y veterinaria, pueden ser objeto de la aplicación de los sensores bioactivos.

Las técnicas analíticas mediante sensores bioactivos al mejorar la eficiencia y reducir el tiempo de análisis pueden contribuir a facilitar los controles de calidad de los alimentos en todas sus etapas de fabricación, de comercialización y de exigencias de especificación; ya que el enjuiciamiento nutricional, la autenticidad del producto y su seguridad, están basados en el análisis de componentes naturales, transformados, y de compuestos adicionales o accidentales de los alimentos; en alimentos cada vez en más número transformados y complejos. Los análisis de puntos críticos en las fases de procesado son etapas de interesante control con biosensores. El análisis continuo de pequeñas muestras consigue facilitar el control de múltiples muestras y el de procesos industriales seriados.

BIBLIOGRAFIA

- BURT, J. R.; J. MURRAY y G. D. STROUD. 1968.- *J. Food Technol.*, 3, 165-170.
- DURLIAT, H. y M. COMTAT. 1980.- *Anal. Chem.*, 52, 2109-2112.
- EHIRA, S. y H. UCHIYAMA. 1969.- *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 35, 1080-1085.
- EHIRA, S. y H. UCHIYAMA. 1973.- *Bull. Tokai. Reg. Fish. Res. Lab.*, 75, 63-73.
- EHIRA, S. y H. UCHIYAMA. 1986.- Proceeding Intern. Symposium Coordinated by the Univ. Alaska. 185-207.
- FERRERO, J. M. y T. DIEZ. 1990.- *Rev. CICC*, 6, 3-11.
- GUIBAULT, G. G. y F. R. SHU. 1971.- *Anal. Chim Acta*, 56, 333-338.
- HIKUMA, M.; T. KUBO; T. YASUDA; I. KARUBE y S. SUZUKI. 1979 a.- *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1845-1853.
- HIKUMA, M.; T. KUBO; T. YASUDA; I. KARUBE y S. SUZUKI. 1979 b.- *Anal. Chim. Acta.*, 109, 33.
- HIKUMA, M.; T. KUBO; T. YASUDA; I. KARUBE y S. SUZUKI. 1979 c.- *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 289-297.
- JAHNS, F.D.; J. L. HOWE; R. J. CODURI Y A. G. RAND. 1976.- *Food Technol.*, 30, 27-30.
- JONES, N. R.; J. MURRAY; E. I. LIVINGSTON Y C. K. MURRAY. 1964.- *J. Sci. Food Agric.*, 15, 763-773.
- KARUBE, I.; Y. SATOH; S. ARAKI; S. SUZUKI y H. YAMADA. 1980.- *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2, 117-120.
- KARUBE, I.; H. MATSUKA; S. SUZUKI; E. WATANABE y K. TOYAMA. 1984.- *J. Agric. Food Chem.*, 32, 314-319.
- KASSEMSARN, B. O.; B. SANZ; J. MURRAY Y N. R. JONES. 1963.- *J. Food Sci.*, 28, 28-37.
- KOBAYASHI, H. y H. UCHIYAMA. 1970.- *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Labo.*, 61, 21-26.
- MATSUMOTO, K.; K. YAMADA y J. OSAJIMA. 1981.- *Anal. Chem.*, 53, 1974-1979.
- MATSUNAGA, T.; I. KARUBE y S. SUZUKI. 1978.- *Anal. Chim. Acta*, 99, 233-239.
- MELL, L. D. y J. T. MALOY. 1976.- *Anal. Chem.*, 48, 1597-1601.
- MIZUTANI, F.; K. TSUDA; I. KARUBE; S. SUZUKI y K. MATSUMOTO. 1980.- *Anal. Chim. Acta.*, 118, 65-71.
- NANJO, M. y G. G. GUILBAULT. 1974.- *Anal. Chem.*, 46, 1769-1772.
- NIKOLELIS, D. P. y H. A. MOTTOLA. 1978.- *Anal. Chem.*, 50, 1665-1670.
- OHASHI, M.; N. ARAKAWA y S. SAKAMOTO. 1987.- United States Patent. Patent Number 4, 650, 722.
- SAITO, T.; K. ARAI y M. MATSUYOSHI.- 1959.- *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 24, 749-750.
- SATOH, I.; I. KARUBE y S. SUZUKI. 1976.- *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 269-272.
- SATOH, I.; I. KARUBE y S. SUZUKI. 1977.- *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1095-1099.
- SHEWAN, J. M. y N. R. JONES. 1957.- *J. Sci. Food Agric.*, 8, 491-498.
- TANAKA, T.; A. ARAI y T. SAITO. 1970.- *J. Japan. Soc. Food Nutrition*, 23, 127.
- TANAKA, M.; K. SUZUKI y T. TAGUCHI. 1983.- *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 49, 1155.
- TARR, H. L. A. 1966.- *J. Food Sci.*, 31, 846-854.
- UCHIYAMA, H. y N. KATO. 1974.- *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 40, 1145-1154.
- UDA, F.; E. HAYASHI; H. UCHIYAMA y K. KANUDA y K. KANUDA. 1983.- *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, 111, 55-62.
- WATANABE, E.; K. ANDO; I. KARUBE; H. MATSUOKA y S. SUZUKI. 1983.- *J. Food Sci.*, 48, 496-500.

- WATANABE, E.; K. TOYAMA; I. KARUBE; H. MATSUOKA y S. SUZUKI. 1984 a.- *J. Food Sci.*, 49, 114-116.
- WATANABE, E.; K. ANDO; I. KARUBE; H. MATSUOKA y S. SUZUKI. 1984 b.- *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 18-22.
- WATANABE, E.; T. OGURA; K. TOYAMA; I. KARUBE; H. MATSUOKA y S. SUZUKI. 1984 c.- *Enzyme Microbiol. Technol.*, 6, 207-211.
- WATANABE, E.; S. TOKIMATSU; K. TOYAMA; I. KARUBE; H. MATSUOKA y S. SUZUKI. 1984 d.- *Anal. Chim. Acta*, 164, 139-146.
- WATANABE, E.; K. TOYAMA; I. KARUBE; H. MATSUOKA Y S. SUZUKI. 1984 e.- *Anal. New York Acad. of Sci.*, 434, 529-532.
- WATANABE, E.; H. ENDO; N. TAKEUCHI; T. HAYASHI Y K. TOYAMA. 1986 a.- *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52, 489-495.
- WATANABE, E.; H. ENDO; Y. IKEDA; N. SHIBAMOTO Y K. TOYAMA. 1986 b.- *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52, 711-717.
- WATANABE, E.; A. NAGUMO; M. HOSHI; S. KONAGAYA y M. TANAKA.- 1987. *J. Food Sci.*, 52, 592-595.