

Membranas de Quitosana com Extrato Etanólico de Própolis: Caracterização de um novo biomaterial

Chitosan Membrane whit Ethanol Extract of Propolis: Characterization of a new biomaterial

Felipe Soares Sena*, Marina de Oliveira Cardoso Macêdo**, Haroldo Reis
Alves de Macêdo***, João Marcelo de Castro e Sousa****

**(Licenciando em Química no Instituto Federal do Piauí-Campus Picos*

** *(Instituição: Instituto Federal do Piauí - PPGEM/IFPI*

*** *(Instituição: Instituto Federal do Piauí - IFPI*

**** *(Instituição: Universidade Federal do Piauí - UFPI*

ABSTRACT

Chitosan is a natural, low cost, renewable and biodegradable product duo to its properties in wound healing, biocompatibility and low toxicity. Chitosan is obtained by deacetylation of chitin. Propolis is a complex mixture composed of resinous materials collected by bees from branches, flowers, pollen. Has antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, cicatrizing activity among others, its wide application is explained by the variety of its chemical composition. The objective of the research was the incorporations of propolis to the chitosan membranes thus creating a new biomaterial. The produced membrane was characterized by MEV, wettability, surface energy and cytotoxicity by allium cepa. Is was observed that there was no change in topography, the hydrophilicity increased, for surface energy there was an increase in the polarity and surface tension of membranes, this way the propolis can be to added to the chitosan because it had no cytotoxic effect.

Keywords – Biomaterials, Chitosan, Propolis

Date of Submission: 25-09-2020

Date of Acceptance: 07-10-2020

I. INTRODUCTION

Os biomateriais podem ser qualquer tipo de material de origem natural ou sintética e tem aplicações em diversas áreas, são amplamente pesquisados na área biomédica pelo fato de serem substância ou combinações de substâncias, sintética ou natural, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Podem ser classificados de acordo com sua composição como cerâmicos poliméricos ou metálicos [1].

A quitosana é amplamente utilizada em procedimentos para regeneração de pele, uma vez que apresenta efeitos antimicrobianos e de biocompatibilidade, além de estimular a proliferação celular [2]. Possui atividades hemostática, fungicida, antibacteriana e antitumoral, podendo ainda ser utilizado no tratamento da obesidade, na produção de microesferas para a incorporação e liberação controlada de variados fármacos, na preparação de filmes para embalagens de alimentos, de fios

cirúrgicos, de materiais para regeneração óssea e especialmente, de curativos [3].

A incorporação de diversos extratos a membrana de quitosana pode ser realizada para amplas aplicações. O extrato de açafraão foi incorporado a filmes de quitosana onde se obteve uma maior atividade antimicrobiana e rigidez [4]. Extrato de semente de uva foram revestidas em filmes de bicamadas ativas baseados em quitosana, os filmes apresentaram atividade antibacteriana e a capacidade antioxidante das sementes continuou ativa dentro da matriz dos filmes de quitosana [5].

O óleo essencial de *Ziziphora clinopodioides* e extrato etanólico de semente de uva foram incorporados a filmes de quitosana, obtendo-se uma melhora de atividades antibacterianas, antioxidantes e espessura, mostrando ter potencial aplicação para embalagem ativa e biodegradável [6].

O extrato alcoólico da própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante,

antitumoral, imunomodulatória, entre outras[7]. A própolis vem sendo usada desde os primórdios da civilização, povos como os egípcios, gregos e romanos já a utilizavam na medicina para embalsamar cadáveres por suas características anti-putrefativas. O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 a.C [8].

Torlaka e Sertb [9] constataram a eficácia antibacteriana em filmes de polipropileno revestidos de quitosana incorporadas com extrato etanólico de própolis, sua atividade bacteriana foi avaliada contra patógenos de origem alimentar como *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Os filmes formados apresentaram atividade contra todos os patógenos.

Elbaz e colaboradores [10] misturaram nanopartículas de própolis com micropartículas de quitosana, os resultados demonstraram um considerável aumento na solubilidade da própolis com perfil de liberação controlada em diferentes ambientes, aumento na eficiência terapêutica três vezes maior que a própolis livre.

As amostras tropicais de própolis, especialmente as brasileiras, têm mostrado diferenças significantes nas suas composições químicas em relação à própolis da zona temperada. Por essa razão, a própolis brasileira tem se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas [11]. A composição química da própolis, está intimamente relacionada a origem geográfica e ecologia da flora visitada pelas abelhas. Bem como variando de acordo com a espécie e a variabilidade genética das rainhas [12].

Neste trabalho adicionou-se diferentes proporções de extrato etanólico de própolis as membranas de quitosana com o intuito de produzir membranas com novas características com finalidade de uso como um novo biomaterial, já que os materiais de partida possuem características biocompatíveis.

II. METODOLOGIA

O trabalho foi dividido em três etapas. A primeira foi a pesquisa e revisão da literatura sobre membranas de quitosana e própolis. A segunda etapa foi a preparação das membranas de quitosana com própolis. A terceira se constitui na caracterização das membranas por: Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV, Molhabilidade, Energia de superfície e Citotoxicidade.

Para a obtenção das membranas foram utilizados os seguintes reagentes, de qualidade analítica certificada: quitosana 85% desacetilada (POLYMAR, LTDA) ácido acético glacial, hidróxido de sódio, extrato etanólico de própolis

doado pelas indústrias de Mel Wenzel (Picos – Piauí).

Para a produção das membranas de quitosana pura, o pó da quitosana foi dissolvido em ácido acético 2% e deixado por 24 horas em agitação constante, após 24 horas a solução foi filtrada em filtro de nylon e em seguida em um filtro de *Millipore*. Após a filtragem verteu-se a solução em placas de Petri, e as mesmas foram a estufa durante 24 horas a 50°C. As membranas formadas foram neutralizadas com uma solução de hidróxido de sódio, lavadas com água destilada e estiradas para secagem em temperatura ambiente por 24h.

Para membranas De quitosana com própolis foi adicionado o extrato etanólico de própolis a solução das membranas antes de ir para a estufa, com proporções de própolis a 2,85%, 4% e 15%.

2.1 MEV

A análise da topografia superficial foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura modelo SHIMADZU[®] SSX – 550, foram obtidas 5 imagens de diferentes partes da superfície das membranas com e sem a adição de própolis, utilizando aproximação de 100 vezes, no modo SE. Esta análise foi realizada no laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Federal do Piauí/ Campus Teresina Central.

2.2 Molhabilidade

O grau de molhabilidade foi mesurado utilizando o método da gota séssil, utilizando água destilada, formamida e glicerina como líquidos molhantes. Esta análise foi realizada no laboratório de Física do Instituto Federal do Piauí/ Campus Picos.

Nesta análise, uma amostra da membrana de quitosana foi colocada na base do aparelho em seguida e gotejou-se 20µl na superfície da membrana, o procedimento é registrado em um computador pelo *software Movie Maker*, os vídeos foram gravados separadamente para cada líquido molhante e tiveram duração de 60 segundos, posteriormente os mesmos passaram por um processo de análise onde foram isoladas as imagens dos instantes: 00s, 10s, 20s, 30s, 40, 50s, 60s e obtido 7 imagens de cada vídeo.

Após esse processo as imagens foram analisadas no *software SurfTens* versão 4.7 DEMO, foram realizadas 5 marcações em volta da gota onde gera-se um círculo para obter a tangente da gota baseado na absorção da membrana.

2.3 Energia de superfície

Calculou-se a energia de superfície utilizando a teoria de Fowkes (equação 1). Para tanto, foram utilizados os valores dos ângulos de

contato medidos utilizando a metodologia descrita no item 2.2 e os valores das componentes polar e dispersiva de cada um dos líquidos, descritos no trabalho de Macedo [13].

$$\left[\frac{1 + \cos\theta}{2} \right] X \left[\frac{\gamma_i}{\sqrt{\gamma_i^d}} \right] = \sqrt{\gamma_s^p} X \sqrt{\frac{\gamma_i^p}{\gamma_i^d}} + \sqrt{\gamma_s^d} \quad (1)$$

2.3 Citotoxicidade

O teste *A. cepa* foi realizado no Laboratório de Pesquisa I da Universidade Federal do Piauí – Campus de Picos. Os bulbos utilizados eram de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis. Os parênquimas centrais das coroas de brotamento foram retirados e em seguida os bulbos de cebola foram colocados em frascos com água destilada, a temperatura ambiente, para enraizar. Os bulbos com as raízes até 2 cm de comprimento foram colocados nas soluções de tratamento com Própolis a 15% diluído em água destilada.

Para verificar a atividade citotóxica e mutagênica da própolis nessa porcentagem, foram realizados 01 tratamento com cinco repetições (bulbos), além de um controle negativo (CN) feito com água destilada e um controle positivo (CP) utilizando sulfato de cobre (6 µg/mL). Após os períodos de exposição (24 e 48h), as pontas das raízes (meristemas) foram removidas e fixadas em Carnoy (3:1, etanol: ácido acético) por 6-8 h, à temperatura ambiente, e estocadas a -20° C, até o momento de confecção das lâminas. Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada de 5 min cada e hidrolisadas (HCl 1N, 10 min). Após a hidrólise, as raízes foram novamente lavadas em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o Reativo de Schiff, onde permaneceram em local escuro, por 2 h. Após esse período, as raízes foram lavadas, até a total retirada do reativo, transferidas para lâminas, onde foram esmagadas em uma gota de carmim acético 2%. As lâminas foram avaliadas, utilizando o microscópio óptico (400 x). Foram avaliadas 1000 células por repetição, totalizando 5.000 células por tratamento.

A citotoxicidade (Índice Mitótico, IM) e a genotoxicidade (alterações cromossômicas, AC) da própolis a 15% foram avaliadas pela contagem de 5.000 células meristemáticas (unidade experimental: 1000 células/ lâmina; total de 5 lâminas por tratamento) em microscópio de luz DM 500 (400 x). O IM foi calculado utilizando a seguinte fórmula: n° de células em divisão dividido pelo n° total de células analisadas e multiplicado por 100. A genotoxicidade inclui alterações resultantes de efeitos aneugênicos (C-metáfases, metáfase com

aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares, metáfases poliploides, e outras alterações) ou efeitos clastogênicos (fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas e outras alterações). Adicionalmente, a presença ou não de MN, os quais podem ser resultantes de efeitos aneugênicos ou clastogênicos, também foi avaliada juntamente com as outras alterações cromossômicas [14].

A análise dos resultados foi realizada pela análise de variância One-way e Two-way (ANOVA) seguido do pós teste Tukey como Post hoc teste, utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego Califórnia U.). O valor de $p < 0,01$ foi utilizado como valor de significância.

III. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 MEV

A microscopia eletrônica das membranas puras e à base de própolis, a 2,85% (Q2), 4% (Q3) e 15% (Q4), podem ser visualizadas na figura 1, onde (a) Q2, (b) Q3 e (c) Q4 com aproximações de 100x.

Nota-se nas imagens, a ausência de poros visíveis, as superfícies mostram-se irregular ao longo de sua extensão, e observa-se a formação de pequenas bolhas, assemelhando-se às membranas puras.

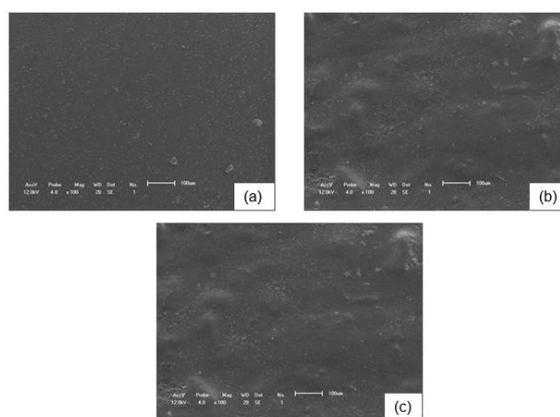


Figura 1 - Microscopia eletrônica da superfície das membranas produzidas.

3.2 Molhabilidade

Quando uma gota de água é gentilmente colocada sobre uma superfície sólida, um de três comportamentos pode ocorrer, A gota se espalha continuamente sobre a superfície, formando uma película cada vez menos espessa; a gota se espalha até certo ponto, tomando a forma de uma calota; a gota se contrai, tentando assumir o formato esférico.

Na figura 2, apresenta-se os valores dos ângulos de contato medidos a partir da técnica da gota séssil de água destilada sobre superfícies das

amostras de quitosana pura (Q1), quitosana própolis a 2,8% (Q2), quitosana própolis 4% (Q3) e quitosana própolis 15% (Q4). Em todos os tratamentos ocorreu uma diminuição dos ângulos de contato tendendo a uma estabilidade.

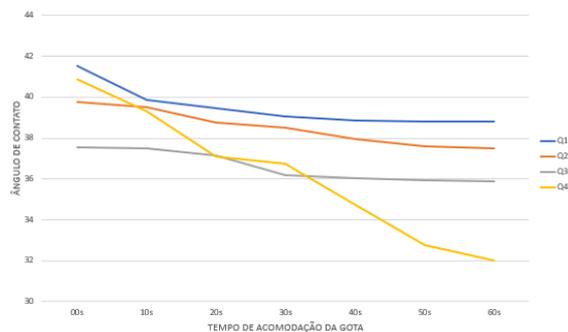


Figura 2 - Dinâmica entre o ângulo de contato de membrana pura e com própolis a nas diferentes concentrações.

Pode-se observar que as membranas tiveram a sua hidrofiliabilidade aumentada proporcional a porcentagem de própolis adicionada a membrana, o extrato alcoólico da própolis é uma substância solúvel em água isso se dá a grande quantidade de grupos polares presentes em sua composição.

A hidrofiliabilidade é um dos fatores que afetam a citocompatibilidade dos biomateriais. A adesão e crescimento celular nas superfícies são considerados como sendo fortemente influenciados pelo balanço hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, frequentemente descritos como molhabilidade [15].

3.3 Energia de superfície

A tensão superficial é um efeito físico que ocorre na interface entre duas fases químicas, isto faz com que os átomos da superfície tenham, em média, maior coesão do que no interior. Assim, a superfície de um líquido pode ser compreendida como uma fina película que reveste toda sua extensão.

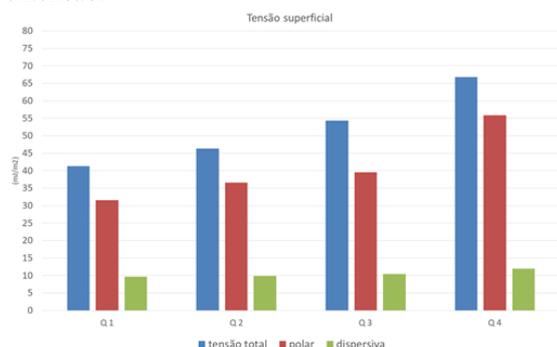


Figura 3 - Energia superficial das membranas de quitosana pura e com própolis.

Analisando a figura 3 verifica-se que a quitosana pura (Q1), quitosana/própolis 2,85% (Q2), quitosana/própolis 4% (Q3) e quitosana/própolis 15% (Q4). A membrana pura foi a que apresentou menor energia em relação as membranas de quitosana com o extrato etanólico de própolis. Observa-se que houve um aumento na polaridade a medida que se aumentou a porcentagem de própolis adicionado a membrana de quitosana. A polaridade é proporcional a tensão superficial total, ou seja, à medida que a polaridade aumenta a energia de superfície aumenta fazendo assim com que o líquido sofra uma maior absorção.

A energia de superfície é um indicador da química da superfície, em termos das interações que podem ocorrer. Sabe-se que a energia de superfície afeta fortemente as interações biológicas, tais como a adesão, proliferação e a morfologia celular [16].

O ângulo de contato de um material tem forte relação com a energia superficial. Um líquido como a água tende a se espalhar sobre uma superfície com alta energia superficial e por outro lado formar gotas sobre uma superfície de baixa energia superficial [17].

3.3 Citotoxicidade

O sistema de teste de *Allium cepa* é bem aceito para o estudo de efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade para soluções aquosas de própolis, as raízes ficam em contato direto com a substância, permitindo a avaliação de concentrações diferentes. As alterações cromossômicas e a divisão celular meristemáticas da raiz da cebola são frequentemente utilizadas para determinar a toxicidade da substância.

Após um período de 24 horas as raízes selecionadas dos bulbos foram remediadas, a tabela abaixo relaciona a média de crescimento.

	00h	24h	48h
Bulbo 1	Cm das raízes	Cm das raízes	Cm das raízes
R1	0,8	0,8	-
R2	1,0	1,0	1,0
R3	0,5	0,5	0,7
Bulbo 2			
R1	0,6	0,6	0,6
R2	0,7	-	-
R3	0,9	0,9	0,9
Bulbo 3			
R1	0,9	0,9	0,9
R2	0,6	0,6	0,6
R3	0,9	0,9	0,9

Tabela 1 - Raízes dos bulbos de *Allium cepa*

Na medida do comprimento em 24h as raízes não sofreram crescimento e a raiz 2 (R2) quebrou, no tempo de 48h no bulbo 1 a raiz 1 quebrou e a raiz 3 (R3) teve um crescimento de 0,2 cm, as demais não sofreram alterações.

A nível celular, a concentração da própolis

avaliada não apresentou efeitos citotóxicos, como observado pela não redução significativa do IM do mesmo ($49,9 \pm 3,3$; $50,9 \pm 3,3$) quando comparado com o controle negativo ($56,2 \pm 3,2$; $56,6 \pm 2,6$) para os 02 tempos de exposições (TE) analisados, respectivamente. A análise estatística de cada fase do ciclo celular comprovou que realmente a substância avaliada não interfere na dinâmica da divisão celular como pode ser observado quando se compara ao controle negativo (CN) para os 02 TE. O controle positivo interferiu significativamente na

divisão celular para os 02 TE como era esperado, porém a própolis quando comparado ao CP se mostrou estatisticamente diferente ao mesmo, ratificando sua não citotoxicidade. Além de não ser citotóxico, a própolis também não foi mutagênica ($1,6 \pm 2,0$; $2,0 \pm 0,1$) para as células meristemáticas avaliadas nos 02 TE analisados, respectivamente, como observado pelos valores não significantes quando comparados com o CN ($2,0 \pm 0,1$; $1,6 \pm 1,1$) (Tabela 2).

Tratamento	Concentração	TE (h)	Fases do ciclo celular				IM (%)	AC	
			Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase			Telófase
CN	-		443,0 ± 19,1	450,6 ± 13,5	47,6 ± 4,1	30,0 ± 2,6	28,6 ± 2,5	56,2 ± 3,2	2,0 ± 0,1
CP	6 µg/mL	24h	887,3 ± 8,0 ^a	53,6 ± 7,0 ^a	29,6 ± 4,7 ^a	18,3 ± 1,1 ^a	12,3 ± 1,5	11,4 ± 0,7 ^a	31,3 ± 2,3 ^a
Própolis	15%		500,6 ± 23,0 ^b	434,0 ± 11,5 ^b	35,6 ± 8,1	18,0 ± 7,2	11,6 ± 2,8	49,9 ± 3,3 ^b	1,6 ± 2,0 ^b
CN	-		427,6 ± 22,5	481,3 ± 34,6	42,3 ± 10,0	24,6 ± 9,0	24,0 ± 8,5	56,6 ± 2,6	1,6 ± 1,1
CP	6 µg/mL	48h	860,0 ± 3,4 ^a	73,0 ± 5,3 ^a	30,0 ± 6,9	21,0 ± 5,1	16,0 ± 1,7	14,6 ± 3,0 ^a	37,0 ± 4,3 ^a
Própolis	15%		496,3 ± 22,5 ^b	428,3 ± 24,2 ^b	40,0 ± 4,5	26,6 ± 5,7	14,6 ± 5,0	50,9 ± 3,3 ^b	2,0 ± 0,1 ^b

Tabela 01 - Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico da própolis a 15% em células meristemáticas de *Allium cepa*.

CN: Controle negativo (Água destilada). CP: Controle positivo (CuSO₄: Sulfato de cobre). TE: Tempo de exposição. IM: Índice Mitótico. AC: Alterações cromossômicas. One-way ANOVA para IM e AC e Two-way ANOVA para fases do ciclo celular com pós-teste de Tukey. Valores de significância ($p < 0,01$), ^acomparado ao CN; ^bcomparado ao CP. ($p < 0,01$).

IV. CONCLUSÕES

Foi possível obter e caracterizar as membranas de quitosana com extrato alcoólico de própolis. A adição de própolis a membrana não trouxe alteração a sua morfologia. Entretanto as membranas com extrato de própolis tiveram um aumento da hidrofiliabilidade, devido ao aumento da componente polar, observou-se que para a concentração utilizadas as membranas não apresentaram efeito citotóxico. Com os resultados obtidos as membranas de quitosana/própolis possuem características superficiais adequadas para utilização como biomateriais.

ACKNOWLEDGEMENTS

LaBioMat - IFPI, LabMat - IFPI, Laboratório de Pesquisa 1 - UFPI, FAPEPI

REFERÊNCIAS

- [1]. ANDERSON, D. G.; PUTNAM, D.; LAVIK, E. B.; MAHMOOD, T. A.; LANGER, R. Biomaterial microarrays: rapid, microscale screening of polymer-cell interaction. *Biomaterials*. V. 26, p. 4892-4897, 2005.
- [2]. ZAGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, v. 2, p. 204-226, 2015.
- [3]. MI, F. L.; SHYU, S. S.; WU, Y. B.; LEE, S. T.; SHYONG, J. Y.; Huang, R. N. Fabrication dressing. *Biomaterials*. v. 22, p. 165-173, 2001.
- [4]. KALAYCIOĞLU, Z.; TORLAK, E.; AKIN-EVINGÜ, G.; OZEN, I.; ERIM, F. B. Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 101, p. 882-888. 2017.
- [5]. SOGUT, E.; SEYDIM, A. C. Development of Chitosan and Polycaprolactone based active bilayer films enhanced with nanocellulose and grape seed extract. *Carbohydrate Polymers*. v. 195, p. 180-188. 2018.
- [6]. SHAHBAZI, Y. Development of Chitosan and Polycaprolactone based active bilayer films enhanced with nanocellulose and grape seed extract. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 99, p. 746-753, 2017.

- [7]. LUSTOSA, S. R.; et al. Propolis: updates on chemistry and pharmacology. *Rev. bras. farmacogn. vol.18 no.3 João Pessoa July/Sept. 2008*
- [8]. SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim. Nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- [9]. TORLAK, E.; SERT, D. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*. N. 60, p. 52-55, 2013.
- [10]. ELBAZ, N. M.; KHALIL, I. A.; RABOU, A. A.; EL-SHERBINY. I. M. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of própolis. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 92, p. 254-269, 2016.
- [11]. TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M .C.; MIORIN P. L.; PASIN F. R.; TSVETKOVA I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. N. 3(2), p. 249-254, 2006.
- [12]. PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINE, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*. N. 2, p. 997-1003, 2002.
- [13]. MACEDO, H.R.A. Tratamento térmico do titânio e suas conseqüências sobre as propriedades físico-químicas e de biocompatibilidade. Tese Dourotado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- [14]. MAZZEO, D.E.C; FERNANES, T.C.C; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the Allium cepa test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process *Chemosphere* v. 85, p.13-18, 2011.
- [15]. ESPOSITO, A. R.; LUCCHESI, C.; FERREIRA, B. M.P.; DUEK, E. A. R. Estudo da interação células vero/PLGA após a modificação da superfície por plasma de oxigênio. *Rev. Mat.* v. 12, n.1, p.164-167, 2007.
- [16]. PONSONNET, L.; COMTE, V.; OTHMANE, A.; LAGNEAU, C.; LISSAC, M.; JAFFREZIC, N. *Materials Science and Engineering*. v. 21, p. 157, 2002.
- [17]. SHIFTCLIFE, N. J.; MCHALE, G.; ATHERTON, S.; NEWTN, M. I. Na intruduction to superhydrofobicity, *Advances in colloid and interface Science*. v. 161, n. 1-2, p. 124-138, 2010.