

Fotocatálise heterogênea de *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* desencadeada pela ação da luz UV e branca em espátulas com revestimento de nanopartículas TiO₂ e Ag

Cecilia Helena Soares PORTO^a, Ary dos Santos PINTO^b, Elson LONGO^c,
Antonio Carlos PIZZOLITO^d, Sizenando de Toledo PORTO NETO^e

^aPós-graduando em Odontologia, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

^bDepartamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

^cLaboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica, Instituto de Química,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

^dDepartamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

^eDepartamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

Porto CHS, Pinto AS, Longo E, Pizzolito AC, Porto Neto ST. Heterogeneous photocatalysis of *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* activated by the action of UV and visible light on dental instruments with TiO₂ and Ag nanoparticles coating. Rev Odontol UNESP. 2011; 40(1): 1-5.

Resumo

Nanotecnologia, ciência do minúsculo, gera produtos capazes de manipular átomos e moléculas com aplicação no processo de esterilização de instrumentais odontológicos. **Objetivo:** Avaliar a ação autolimpante e esterilizante do processo de fotocatalise heterogênea desencadeado pela ação da luz UV e branca sobre o recobrimento de instrumentos odontológicos com nanopartículas de TiO₂ e Ag. **Material e método:** Foram realizados testes bacteriológicos em espátulas odontológicas revestidas com nanopartículas de TiO₂ e Ag (uma ou três camadas) e contaminadas com 10 mcrl dos microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Após contaminação, as espátulas foram expostas à luz UV e branca por 120 minutos, transferidas para tubos contendo meio BHI e incubadas a 35-37 °C. Foram feitas leituras em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas para verificação do crescimento das bactérias e testes de controle e recuperação. **Resultado:** A *Pseudomonas aeruginosa* foi inativada após exposição de 120 minutos à luz UV, indicando a ocorrência do processo de fotocatalise heterogênea no recobrimento de nanopartículas de TiO₂ e Ag das espátulas. A *Pseudomonas aeruginosa* não foi inativada pela exposição à luz branca e o *Enterococcus faecalis* não foi inativado pela exposição à luz UV e à branca nas espátulas de cimento odontológico recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag, nas leituras de até 96 horas, ocorrendo o crescimento bacteriano. **Conclusão:** Não houve influência do revestimento das espátulas com uma ou três camadas de nanopartículas de TiO₂ e Ag nos resultados. A fotocatalise heterogênea da *Pseudomonas aeruginosa* foi confirmada pela exposição à luz UV da espátula com revestimento de TiO₂ e Ag, mas não pela luz branca. A fotocatalise heterogênea do *Enterococcus faecalis* não foi confirmada tanto pela exposição do TiO₂ e Ag à luz UV como à branca.

Palavras-chave: Nanopartículas de dióxido de titânio e prata; fotocatalise heterogênea; esterilização de instrumentais odontológicos; testes bacteriológicos; luz ultravioleta e branca.

Abstract

Nanotechnology, the science of minuscule, has developed products which are able to manipulate atoms and molecules that could be applied in the sterilization process of dental instruments. **Objectives:** The objective of the present study was to evaluate the self-cleaning action of TiO₂ and Ag nanoparticles coating on dental instruments by the photocatalysis process under UV and visible light irradiation. **Material and method:** Microbiologic tests were done using dental cement spatulas coated with TiO₂ and Ag nanoparticles (one or three layers), and contaminated with 10 mcrl of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*, respectively. After contamination, they were exposed to ultraviolet light and visible light for 120 minutes. Next, they were transferred to and stored in test tubes

with BHI (Brain Heart Infusion) and incubated in 35 to 37 °C. Checking times for bacterial growth and for control and retrieval tests were done at: 24, 48, 72 and 96 hours. **Result:** The *Pseudomonas aeruginosa* was inactive after 120 minutes of ultraviolet light irradiation, thus confirming the heterogeneous photocatalytic activity of TiO₂ and Ag. The *Pseudomonas aeruginosa* was not inactivated under visible light irradiation and the *Enterococcus faecalis* was not inactivated under UV and visible light irradiation of the dental cement spatulas coated with TiO₂ and Ag nanoparticles in the readings to 96 hours, showing bacterial growth. **Conclusion:** There were no influence of one or three layers of TiO₂ and Ag nanoparticles coating of the spatulas in the results. The heterogeneous photocatalysis activity of TiO₂ and Ag under UV light irradiation was confirmed for *Pseudomonas aeruginosa* but not under visible light. *Enterococcus faecalis* did not confirmed the photocatalytic activity of TiO₂ and Ag under UV light irradiation and visible lights irradiation.

Keywords: Silver and titanium dioxide nanoparticles; heterogen fotocatalises; dental instruments sterilization; bacterial tests; visible and ultraviolet light.

INTRODUÇÃO

A grande prevalência de doenças infecciosas motiva a classe odontológica a buscar mais informações na tentativa de minimizar as chances de contaminação entre pacientes e profissionais envolvidos nos atendimentos. A prevenção da disseminação de microrganismos tem se mostrado eficaz; entretanto, o cirurgião-dentista e toda a equipe estão vulneráveis a muitas doenças infecciosas por trabalharem em contato com secreções e mucosas.

A esterilização em Ortodontia, como em Odontologia, tem recebido especial atenção nos últimos anos e merece bastante destaque a busca por novos métodos de esterilização. Richard¹ verificou que os ortodontistas têm a segunda incidência de hepatite infecciosa entre os profissionais da Odontologia e que a saliva é tão contaminante quanto o sangue, sendo os aerossóis dentais e o instrumental odontológico os principais transmissores de microrganismos, que podem sobreviver durante várias semanas, representando um importante risco de infecção cruzada nos procedimentos de rotina.

O Ministério da Saúde² recomenda, para a esterilização de instrumentos clínicos, o uso da autoclave por gravidade a 121 °C (1 atm de pressão) por 20 minutos e da autoclave por autovácuo a 132 °C por 4 minutos. Para a estufa de esterilização, 160 °C por 2 horas ou 170 °C por 1 hora.

Entre os meios de esterilização existentes no mercado, sem dúvida nenhuma a autoclave e a estufa são os que oferecem maiores vantagens dentro do consultório ortodôntico em relação a tempo de esterilização e baixo custo. Porém, esses métodos causam corrosão e danos ao instrumental metálico de corte, limitando sua real efetividade³⁻⁵. Embora a autoclave química seja recomendada na literatura, têm sido relatados problemas, como custo e dificuldade de instalação, bem como na aquisição dos produtos químicos a serem utilizados e quanto ao seu vapor resultante, tóxico, que deve ser ventilado para fora do ambiente, havendo assim a necessidade de uma instalação complexa para operar esse aparelho¹.

O advento de novos materiais que utilizam método de recobrimento com nanopartículas de óxido de titânio (TiO₂) para aplicação em processo de esterilização de materiais tais como água, vidro e cerâmica tem se mostrado promissor. Nesta nova forma autolimpante, o instrumental é revestido por

filme nanométrico de dióxido de titânio (TiO₂), que agrega propriedades bactericidas à sua superfície. Essas propriedades são ativadas na presença da luz ultravioleta (UV), cuja radiação interage com o dióxido de titânio, que degrada a matéria orgânica por um processo denominado de fotocatalise heterogênea.

Segundo Pruden, Ollis⁶, o princípio da fotocatalise heterogênea envolve a ativação de um semicondutor (geralmente TiO₂) por luz solar ou artificial. Um semicondutor é caracterizado por bandas de valência (BV) e bandas de condução (BC), sendo a região entre estas chamada de *bandgap*. A absorção de fótons com energia superior à energia do *bandgap* resulta na promoção de um elétron de banda de valência para banda de condução, com geração concomitante de uma lacuna (h⁺) na banda de valência. Essas lacunas mostram potenciais bastante positivos, na faixa de +2,0 a +3,5 V medidos contra um eletrodo de calomelano saturado, dependendo do semicondutor e do pH. Esse potencial é suficientemente positivo para gerar radicais hidroxilas (OH) a partir de moléculas de água absorvidas na superfície do semicondutor e, subsequentemente, oxidar o contaminante orgânico. A eficiência da fotocatalise depende da competição entre o processo em que o elétron é retirado da superfície do semicondutor e o processo de recombinação do par elétron/lacuna, que resultam na liberação de calor. Wong et al.⁷ demonstraram que o mecanismo de degradação não se dá exclusivamente por meio do radical hidroxila, mas também por meio de outros radicais derivados do oxigênio, tais como O₂ e H₂O, formados pela captura de elétrons fotogerados. Um dos aspectos interessantes da fotocatalise heterogênea é a possibilidade de utilização de luz solar para ativação do semicondutor. A degradação de contaminantes orgânicos (fenol, hidrocarbonetos clorados, clorofenóis, inseticidas, corantes e outros) na presença de TiO₂ iluminado com luz solar é limitada pela absorção desse semicondutor de radiações de até 385 nm (que corresponde a aproximadamente 3% do espectro solar no nível do mar) devido ao seu *bandgap* de 3,2 eV. Novos fotocatalisadores que apresentem maior absorção na região da luz visível são necessários para o desenvolvimento da fotocatalise utilizando luz solar e aumentando sua eficiência.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a ação autolimpante e esterilizante pelo processo de fotocatalise heterogênea desencadeado pela ação da luz UV e branca sobre o recobrimento de instrumentos odontológicos com nanopartículas de TiO₂ e Ag,

MATERIAL E MÉTODO

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas espátulas de cimentação odontológicas nº 24, as quais receberam o revestimento de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e 5% de prata (Ag) por imersão em recipiente contendo um polímero líquido à base de água e íons de titânio à temperatura ambiente, levadas a um forno com temperatura entre 300 e 400 °C. O tratamento térmico foi realizado de forma que os íons de titânio se transformassem em dióxido de titânio. Entre quatro e seis horas, formou-se um filme nanoestruturado na superfície das espátulas, incorporando uma película de recobrimento. O *coating* foi realizado pela firma NANOX Tecnologia S/A, do Centro Multidisciplinar para Desenvolvimento de Materiais Cerâmicos (CMDMC), um dos dez Centros de Pesquisa de Inovação e Difusão (CEPID) da FAPESP.

As espátulas utilizadas para o ensaio foram as de cimentação nº 24, marca Mocar, de aço inox 420, com baixo teor de carbono para não enferrujar. Essas espátulas receberam dois tipos de tratamento: Nanox A, com uma camada, e Nanox B, com três camadas. Após o processo de recobrimento, as espátulas foram lavadas, enxaguadas, secas com papel absorvente e empacotadas, cinco a cinco, em embalagem plástica para serem esterilizadas em autoclave da Dabi-Atlante, modelo Speedclave M7, a 120 °C por 20 minutos.

A coleta dos microrganismos para o procedimento de contaminação das espátulas durante a realização dos experimentos seguiu as seguintes regras: uso de luvas descartáveis pelo instrumentador a fim de manter a cadeia asséptica durante a realização dos ensaios e o instrumental livre de qualquer tipo de contaminação antes do procedimento. Para que a área de trabalho (caixa de madeira, com 0,50 × 0,32 × 0,31 mm, revestida de papel alumínio) estivesse asséptica, a luz ultravioleta foi ligada internamente por 30 minutos. A padronização do inóculo utilizado foi uma cultura em BHI com turvação padrão de 10⁶ ufc.mL⁻¹ (unidade formadora de colônia) da amostra bacteriana. A contaminação foi realizada com os seguintes indicadores biológicos:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Cada grupo ensaiado teve cinco amostras contaminadas pelas bactérias indicadas, acima mencionadas. Uma face das espátulas foi contaminada com alça calibrada descartável de 10 mcrl, que carrega uma suspensão de bactérias na escala de MacFarland 0,5 que corresponde a 15.000 ufc.mL⁻¹.

Um conjunto de cinco espátulas foi exposto à luz UV e outro conjunto de cinco espátulas foi exposto à luz branca, ambos por 120 minutos, tempo este definido como base para ativação da ação antimicrobiana das nanopartículas de TiO₂ e Ag após ensaios prévios. A luz UV foi emitida por uma lâmpada Starlux 15w-F 15T18, base G 13, tubo T8, comprimento de onda de 365nm, com vida útil de 4.000 horas, posicionada a uma distância de 10 cm da superfície das espátulas que foram dispostas lado a lado dentro da caixa. A luz branca foi emitida por lâmpada Osram 15w/765 daylight recicable Germany CE, comprimento de onda

de 438 nm, em meio ambiente, posicionada a uma distância de 10 cm da superfície das espátulas a fim de que ambos os grupos recebessem a incidência de luz perpendicularmente. A luz UV e a luz branca deveriam ativar as nanopartículas revestidas com o dióxido de titânio (TiO₂, que é o semicondutor), que reveste as espátulas, e que deveriam conferir a propriedade antimicrobiana ao produto.

As espátulas, após a ação da luz, foram removidas da caixa e inseridas individualmente no meio de cultura em tubo (20 × 200 mm) contendo *Brain Heart Infusion* (BHI-DIFCO).

Os tubos de cultura foram levados à incubação em estufa bacteriológica FAVEM Ltda, modelo retilínea, a 35-37 °C. Foram realizadas leituras diárias até 96 horas para verificar a possível ocorrência de crescimento das bactérias que causariam turvação do meio de cultura. A leitura final teve como referencial a presença ou não de turvação.

Para cada microrganismo ensaiado, foram realizados dois controles positivos para comprovar a viabilidade da cepa e um controle negativo para comprovar a esterilidade inicial da espátula. Assim, um dos controles positivos foi realizado com espátula revestida com nanopartículas, esterilizada e submetida à contaminação microbiana, mas não à ativação da luz UV ou branca; o outro controle positivo foi feito da mesma maneira que o primeiro, com exceção de que as espátulas não estavam revestidas com nanopartículas. O controle negativo foi realizado utilizando uma espátula revestida com nanopartículas, esterilizada, mas que não tinha sido contaminada com nenhum indicador biológico e nem sido submetida à luz UV.

A análise microbiológica foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara - UNESP e sob a orientação do Centro Multidisciplinar para o Desenvolvimento de Materiais Cerâmicos (CMDMC) - Instituto de Química do Campus de Araraquara (LIEC), Universidade de São Carlos e Faculdade de Odontologia Campus de Araraquara - UNESP.

RESULTADO

Todos os testes realizados com microrganismos *Enterococcus faecalis* foram positivos para crescimento das bactérias, independentemente do tipo de recobrimento e exposição à luz branca ou à UV (Tabela 1).

Nos testes realizados com o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* com exposição à luz branca, verificou-se crescimento positivo, e negativo para a exposição à luz UV, independentemente do recobrimento, uma ou três camadas, que não interferiram nos resultados (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Foi comprovada a ação autolimpante e esterilizante de espátulas contaminadas com o microrganismo (bactéria) *Pseudomonas aeruginosa* pelo processo de fotocatalise heterogênea desencadeado pela ação da luz UV e branca sobre o recobrimento deste

Tabela 1. Fotocatálise heterogênea da *Enterococcus faecalis* em instrumentais odontológicos revestidos com nanopartículas de dióxido de titânio e prata (*coating*) com 120 minutos de exposição à luz branca e à luz UV

Exposição à luz	1 Camada recobrimento Nanox A				3 Camadas recobrimento Nanox B			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Luz branca	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Luz UV	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabela 2. Fotocatálise heterogênea da *Pseudomonas aeruginosa* em instrumentais odontológicos revestidos com nanopartículas de dióxido de titânio e prata (*coating*) com 120 minutos de exposição à luz branca e à luz UV

Exposição à luz	1 Camada recobrimento Nanox A				3 Camadas recobrimento Nanox B			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Luz branca	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Luz UV	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

instrumento odontológico com nanopartículas de TiO₂ e Ag. A ação antimicrobiana das nanopartículas pode ser verificada, pois não houve crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* após 24 horas de incubação no meio de cultura. Por outro lado, não se verificou esta ação autolimpante e esterilizante no microrganismo *Enterococcus faecalis*, uma vez que ocorreu turvação do meio de cultura, comprovando a ocorrência do crescimento microbiano após 24 horas de incubação a uma temperatura de 35-37 °C.

Foi reportada por Fernandez, Pizarro¹⁰ a grande sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* à exposição à luz UV-A (365 nm, 120 kJ.m⁻².h⁻¹), que se mostrou eficaz na eliminação desse microrganismo. O mesmo não foi observado para a *Escherichia coli*, que não foi afetada em sua viabilidade. Assim sendo, a ação microbicida do processo fotocatalítico com TiO₂ revelou que os vírus são mais sensíveis ao processo, seguidos pelas células bacterianas, e estas pelos esporos bacterianos. Este resultado sugeriu que diferentes microrganismos respondem de maneiras diferentes ao fotocatalizador TiO₂ devido às suas diferenças estruturais, particularmente no que diz respeito à complexidade e à espessura do seu envelope celular. Desta forma, este achado de Fernandez, Pizarro¹⁰ é concordante com os resultados deste trabalho, pois a *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou crescimento enquanto ocorreu crescimento do microrganismo *Enterococcus faecalis*.

Conforme informaram Toledo, Castro⁹ e Tosa, Hirata¹¹, as bactérias exibem vários sistemas enzimáticos para reparar o DNA que contenham dímeros pirimídicos. Um sistema de fotorreativação é formado por uma enzima capaz de clivar os dímeros pirimídicos. Esta enzima é ativada pela luz visível, de modo que as células “mortas” ou inativadas pela luz ultravioleta podem ser reativadas pela exposição à luz intensa de onda em torno de 400 nm. Isso explica o ocorrido no presente trabalho, quando o conjunto com cinco espátulas foi exposto à luz branca (ao meio ambiente) emitida por lâmpada Osram 15w/765,

daylight recicable Germany CE, por 120 minutos. Esta lâmpada tem comprimento de onda que vai de 400 a 800 nm, que pode promover uma reativação das células “mortas”.

No presente trabalho, as espátulas receberam revestimento de nanopartículas de dióxido de titânio e 5% de prata por imersão. Conforme informaram Hu et al.¹² e Falaras et al.¹³, ocorre uma melhora da eficiência da fotocatalise com o emprego de prata, pois esta aumenta o nível de oxidação das células. Encontrou-se subsídio no trabalho de Huang et al.⁸, que explicaram que a ação oxidativa exercida pelo processo UV - TiO₂ promove danos na parede celular e na membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade celular e permitindo o fluxo livre do conteúdo intracelular, que conduz finalmente à morte celular.

A utilização de uma ou três camadas de revestimento (*coating*) com as nanopartículas de TiO₂ e Ag não interferiu nos resultados, indicando que a fotocatalise heterogênea ativada pela luz UV não foi influenciada pela espessura da camada de nanopartículas. Entretanto, de acordo com Simões et al.¹⁴, essa película não é estável em aço inox, pois sofre uma abrasão de 30% no seu *coating*.

CONCLUSÃO

- A *Pseudomonas aeruginosa* foi inativada pela exposição à luz UV das espátulas de cimento odontológica recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag, indicando a ocorrência do processo de fotocatalise heterogênea.
- A *Pseudomonas aeruginosa* não foi inativada pela exposição à luz branca das espátulas de cimento odontológica recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag.
- O *Enterococcus faecalis* não foi inativado pela exposição à luz UV e à branca das espátulas de cimento odontológico recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag.
- A utilização de uma ou três camadas de revestimento com nanopartículas de TiO₂ e Ag não interferiu no processo de fotocatalise heterogênea.

REFERÊNCIAS

1. Richard JA. Sterilization in orthodontics. *J Clin Orthod.* 1987; 21: 326-36.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente transmissíveis/AIDS. Hepatite, AIDS e herpes na prática odontológica. Brasília; 1994.
3. Crawford JJ. Sterilization, disinfection and assepsis in dentistry. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1977.
4. Masunaga MI. Sterilization, disinfection and corrosion of instruments-part 3. *J Clin Orthod.* 1987; 21: 231-2.
5. Gandini Jr LG, Souza RS, Martins JCR, Sakima T, Gandini MREAS. Controle da Infecção cruzada em ortodontia. Parte 1. Hepatite B, desinfecção e aparatologia pessoal. *Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 1997; 2: 77-82.
6. Pruden AL, Ollis, DF. Degradation of chloroform by photoassisted heterogeneous catalysis in dilute aqueous suspensions of titanium dioxide. *Environ Sci Technol.* 1983; 17: 628.
7. Wong JCS, Linsebigler A, Lu G, Fan J, Yates JTJr. Photooxidation of CH₃ Cl on TiO₂(110) single cristal and powdered TiO₂. *J PhysChem.* 1995; 9: 335.
8. Huang Z, Maness P-H, Blake DM, Wolfrum EJ, Smolinski SL. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2000; 130: 163-70.
9. Toledo MRE, Castro AFP. Outras bactérias aeróbias e anaeróbias. In: Trabulsi LR. *Microbiologia.* 2^a ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1998. p. 176.
10. Fernandez RO, Pizarro RA. Lethal effect induced in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to ultraviolet A radiation. *Photochem Photobiol.* 1996; 64: 334-9.
11. Tosa K, Hirata T. Photoreactivation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* following UV disinfection. *Water Res.* 1999; 33: 361-6.
12. Hu C, Guo J, Qu J, Hu X. Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AGI/TiO₂ under visible light irradiation. *Langmuir.* 2007; 23: 4982-7.
13. Falaras P, Arabatziz IM, Stergiopoulos T, Bernard MC. Enhanced activity of silver modified thin-film TiO₂ photocatalysts. *Int J Photoenergy.* 2003, 5: 123-9.
14. Simões LGP, Araujo AL, Minozzi DT, Longo E. Aço inox bactericida. *Rev Esc Minas.* 2007; 60: 1-11.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Cecília Helena Soares Porto
Pós-graduando em Odontologia, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil
e-mail: ceciliaporto@uol.com.br

Recebido: 01/11/2010

Aceito: 31/12/2010