

CAPÍTULO

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA B- LAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

Edmagda de Barros
PEREIRA¹ Felipe Mateus Oliveira de
MEDEIROS¹
Gessyllane de Lima
MELO¹ Maria Daniela Silva
BUONAFINA² Henrique John
Pereira NEVES³

¹ Graduandos do curso de Biomedicina, Centro Universitário Tabosa de Almeida – ASCES|UNITA; ² Doutoranda do Departamento de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, ³ Orientador, Doutor, Departamento de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, (henriquejohn@yahoo.com.br).

RESUMO: Nos últimos anos, as infecções fúngicas graves causadas por fungos considerado não patogênicos aumentaram consideravelmente e passaram a ser de grande importância devida suas elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Leveduras do gênero *Candida* são importantes agentes de infecções oportunistas, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Os agentes antifúngicos disponíveis no mercado são restritos a um pequeno número de fármacos. Esses fatos associados ao aumento da

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

frequência de resistência de espécies de *Candida*, demonstram a necessidade de buscar por novas estratégias terapêuticas, onde os produtos naturais se destacam. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antifúngico da β -lapachona presente na *Tabebuia avellanedae* (Ipê roxo) sobre o crescimento de fungos oportunistas do gênero *Cândida spp.* Foi realizado a extração da betalapachona por meio da decocção, proveniente de fragmentos da casca do ipê roxo. A avaliação do efeito antifúngico foi obtida utilizando três espécies de *Candida spp.* Um antibiograma foi realizado, empregando discos de papel de 6mm de diâmetro embebidos com extrato da β -lapachona e com os respectivos antifúngicos, CiclopiraxOlamina, Nitrato de Miconazol e Fluconazol conhecidos por serem usados no tratamento contra Candidíase. De acordo com os resultados obtidos, β -lapachona apresentou atividade antifúngica frente a cepas de *Candida spp.* resistentes a azólicos, com concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 4 - 16 $\mu\text{g/mL}$. Esses resultados foram similares aos obtidos com o tratamento utilizando antifúngicos conhecidos. Dessa forma, este estudo infere que a β -lapachona foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *Candida spp.* apresentando uma nova alternativa para o tratamento de infecções fúngicas.

Palavras-chave: *Candida*; *Tabebuia avellanedae*; Infecções Oportunistas.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos considerados na maioria das

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

vezes oportunistas e estão presentes no solo, em matéria orgânica em decomposição e no ar. Estão comumente associados ao desenvolvimento de doenças, desde otites, infecções urinárias, onicomicoses, infecções oculares, até fungemias e em imunodeprimidos estas infecções geralmente são fatais. Sabe-se que, embora, várias espécies fúngicas sejam identificadas em infecções nos pacientes imunocomprometidos, causando infecções oportunistas, a candidíase, causada por espécies da levedura *Candida* sp são mais prevalentes, correspondendo cerca de 80% das infecções fúngicas (NAKAMURA et al., 2013; SOUSDALEFF, 2016).

Este fungo é uma levedura, que coloniza a flora normal do corpo humano, como por exemplo, pele, boca, intestino e vagina. Normalmente estes microrganismos comensais se tornam patogênicos quando ocorrem alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro, ou pelo comprometimento de barreiras anatômicas, por procedimentos invasivos e quando a flora bacteriana competidora é eliminada, devido ao uso prolongado de antibióticos (NAKAMURA et al., 2013).

O tratamento convencional da candidíase se dá, na maioria dos casos, pelos compostos azóis que são divididos em triazol e imidazol. Todavia, ainda existem falhas no tratamento de infecções micóticas o que tem chamado atenção para o grave mecanismo de resistência aos antifúngicos utilizados no tratamento dessas infecções. (ALBURQUEQUE, 2011).

Diante desse contexto, os produtos naturais se destacam, pois são bastante utilizados para obtenção de moléculas bioativas, as quais pesquisadores têm investido

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

tanto na identificação bem como nas suas propriedades e mecanismos de ação. Como alternativa de tratamento, tem-se a fitoterapia que consiste no conjunto de técnicas de utilização de plantas para tratamento de doenças e recuperação da saúde. (SCORZONI et al., 2016; (MEDEIROS et al., 2010).

Desse modo, devido aos riscos de infecções oportunistas causadas pela levedura *Candida sp.*, por parte de pessoas imunodeprimidas e o tratamento oferecido com medicamentos alopáticos promover efeitos colaterais adversos, algumas vezes agravando o quadro clínico do paciente, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antifúngico da β -lapachona presente na *Tabebuia avellanedae* (Ipê roxo) frente aos fungos oportunistas do gênero *Cândida*.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre agosto de 2017 e Janeiro de 2018. Sendo este de caráter experimental, descritivo, laboratorial.

Utilizou-se para extração da β -lapachona da planta *T. Avellanedae* fragmentos (cascas) do seu caule. Não foram utilizados na pesquisa as folhas, flores, plântulas e sementes da planta, por conter baixa concentração da β -lapachona.

Obteve-se o extrato contendo a β -lapachona através da decocção, usando 100 g do caule em 1000 mL de água destilada, em temperatura máxima de 100 °C até atingir a fervura, reduzindo posteriormente para 75 °C, aquecendo o sistema com uma manta de aquecimento, por um período de

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

aproximadamente 20 minutos. Ao final, a β -lapachona foi coletada por meio de uma pipeta e armazenada em eppendorf protegidos da luz com papel alumínio. Para a determinação do rendimento do óleo essencial extraído por hidrodestilação de cada 100g da planta pesou-se o eppendorf vazio em balança analítica e posteriormente os eppendorfs com a substância extraída, calculando o peso líquido, assim como o volume de β -lapachona produzida, posteriormente repetiu-se o processo para as massas de 200 g e 300 g da planta, para comparar e avaliar a eficiência do processo (KOCH;LEITZKE; MONZANI, 2014).

Foram utilizadas três espécies de fungos leveduriformes *Candida spp* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusie*), já disponibilizadas pelo setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Tabosa de Almeida – ASCES/UNITA, Caruaru-PE, as cepas já armazenadas em tubo de ensaio contendo meio sólido com ágar Sabouraud, foram repicadas a cada dois meses para manutenção do fungo.

De acordo com RIBEIRO (2011), realizou-se repiques de *Candida sp.* em ágar Sabouraud-dextrose para obter culturas de 24h e garantir a pureza e a viabilidade das cepas. A temperatura de incubação foi de 35°C. Preparou-se o inóculo escolhendo-se 05 colônias com cerca de 01mm de diâmetro e suspendeu-se em 05 mL de solução fisiológica estéril 0,85%. Agitou-se a suspensão padrão resultante em vortex durante 15 segundos e ajustou-se a densidade celular em espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente a uma solução padrão da escala de McFarland 0,5 de comprimento de onda de 530nm, obtendo-se suspensão-padrão de

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

levedura 1 a 5×10^6 células/mL. Após o crescimento dos inóculos, a suspensão foi semeada com swab de algodão sobre as placas de Petri contendo 15 ml de meio sólido ágar Sabouraud, com uma espessura de aproximadamente 4 mm, em seguida os discos utilizados para antibiograma, de 6mm de diâmetro, de papel, foram embebidos com o extrato da planta e com a diluição dos medicamentos alopáticos e impregnados em placa de Petri individuais para a avaliação da sensibilidade dos fungos ao extrato da B-lapachona e as drogas utilizadas. (KOCH; LEITZKE; MONZANI, 2014). Segundo Ribeiro (2011), foram usadas placas de petri com meio ágar Sabouraud, assim como discos de 6 mm de diâmetro esterilizados previamente.

Ainda de acordo com Ribeiro (2011), as placas foram incubadas à 35°C, sendo realizadas leituras visuais após 24h e 48h, em seguida, fazendo-se a observação visual e constatação se houve ou não inibição ao crescimento das leveduras pela técnica de presença ou ausência.

Os agentes antifúngicos utilizados neste estudo foram: fluconazol (FLC), o Ciclopirox Olamina (CPO) e Nitrato de Miconazol (NCM), o composto betalapachona (β -lap). Para avaliar a ocorrência de inibição do crescimento do fungo foram levados em consideração os seguintes pontos de corte: CIM ≥ 1 μ g/mL para Ciclopirax de Olamina e Nitrato de mizonazol e CIM ≥ 8 μ g/mL para fluconazol). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

Figura 1: Placa de Petri do antibiograma



Fonte: Própria autoria.

Realizou-se o armazenamento e avaliação dos dados pelo software Excel, através da construção de tabelas, que revelaram a eficiência da produção do extrato e inibição das leveduras.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Eficiência de Produção de Extrato

Com base na técnica utilizada para produção do extrato de β -lapachona, por decocção, utilizando-se massas da casca da planta, 100g, 200g e 300g, as massas obtidas da substância foram respectivamente 8g, 16g e 24g, aproximadamente, contudo, devido à alta toxicidade da substância, em relação aos experimentos in vivo, conforme Araújo et al. (2002), fez-se a utilização para os testes in vitro deste artigo com a massa de 8g da substância, ou seja 100 g de massa de casca para 1000mL de água.

2.2. Teste de Inibição do Extrato

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

Neste estudo, utilizaram-se amostras fornecidas pelo laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Tabosa de Almeida – ASCES/UNITA, contendo *Cândida albicans*, *Cândida krusei* e *Cândida tropicalis*.

Fazendo-se o teste por antibiograma com o Ciclopirox Olamina, Nitrato de Miconazol, Fluconazol e com o Extrato de β -lapachona, verificou-se atividade antifúngica de todas as substâncias para quase todas as espécies de leveduras, conforme se verifica a seguir na Tabela 3.

O CIM foi definido como a menor concentração do fármaco que produziu 50% de redução de crescimento fúngico após 24 horas de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-S4 do CLSI. Os valores do CIM são expressos em $\mu\text{g/mL}$. O CIM representa a média geométrica de três CIM determinados em diferentes dias. (Tabela 1 e 2)

Tabela 1 - Efeito antifúngico de β -lapachona frente a cepas de *Cândida* spp

CEPA	Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) β -Lapachona (triplicata)
<i>Cândida albicans</i>	16,0
<i>Cândida tropicalis</i>	8,0
<i>Cândia Krusie</i>	16,0

Fonte: Própria autoria

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

Tabela 2: Efeito antifúngico dos medicamentos (fluconazol, nitrato de miconazol e Ciclopirax de Olamina) frente a cepas de *Candida* spp.

CEPA	Valores de CIM ^b (µg/mL) Fluconazol	Valores de CIM ^b (µg/mL) Ciclopirax de Olamina	Valores de CIM ^b (µg/mL) Nitrato de Miconazol
<i>Cândida albicans</i>	8,0	16,00	16,0
<i>Cândida tropicalis</i>	1,0	8,0	16,0
<i>Cândida krusie</i>	8,0	16,0	8,0

Fonte: Própria autoria

Tabela 3. Atividade antifúngica das substâncias.

Substâncias	Espécies de Leveduras		
	<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Candida krusei</i> (2)	<i>Candia Tropicalis</i> (3)
β-lapachona	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Ciclopirox Olamina	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Nitrato de Miconazol	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Fluconazol	SENSÍVEL	SENSÍVEL	RESISTENTE

Fonte: Própria autoria

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se a batalapachona, que pode ser considerado um dos principais representantes do grupo de quinonas das tabebuias (SILVA et al., 2012), e já foi objeto de estudo em diversas neoplasias, como o câncer de próstata, tumores mamários e neoplasias de cólon e útero (GABRIEL; ARAUJO; NEPUCENO, 2017). Além de terem grande relevância, já que apresentam diversas propriedades, como: microbicida, tripanossomicida, viruscida e antitumoral (SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003).

A estrutura química da β -lapachona é, 2,2-dimetil-3,4-di-hidro benzo [h] cromeno-5,6-diona, é um produto natural que apresenta forma cristalina laranja-avermelhada com ponto de fusão característico entre 154,5 e 155,5°C e é estruturalmente estável em pH de 3 a 9. Tem sido, desde o início da década de 90, alvo de estudos no mundo todo devido ao excelente potencial farmacológico *in vitro* e *in vivo* (MEDEIROS, 2010).

A β -Lapachona apresenta inúmeras ações farmacológicas, tais, mostrando uma sensibilidade maior aos fungos de algumas espécies. (BARBOSA, 2011). Em estudos realizados por Medeiros (2010) foi vista a comprovação da atividade antifúngica por parte do lapachol como fitoterápico, onde a substância que se destaca nos testes realizados frente a estes fungos é a β -lapachona.

Medeiros (2010) avaliou a atividade antifúngica da β -lapachona frente ao *Cryptococcus neoformans* apresentando sensibilidade com concentração inibitória mínima (CMI) de 4mg/L e Concentração mínima fungicida (CMF) de 64 μ g/ml o que corrobora com nosso estudo ressaltando a atividade antifúngica do composto testado.

No entanto, contrapõe o estudo de Antunes et al. (2006)

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

onde a maioria das substâncias derivadas do lapachol entre elas a Betalapachona não mostrou potencial antimicrobiano diante das cepas de leveduras de *Candida* testadas. Porém β -lapachona apresentou halo de inibição de crescimento de 13 mm e 10 mm, respectivamente, evidenciando atividade antifúngica frente a uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, estes achados pode-se ser resultado da necessidade de se padronizar e aprofundar as técnicas de determinação de atividade antimicrobiana, de novas substâncias.

Tem sido relatado que a ação antifúngica é relacionada à capacidade da substância em atravessar a parede celular fúngica e ser inserido entre as cadeias de ácido gordo presente em sua membrana provocando alterações na sua fluidez e permeabilidade, interfere na síntese de ergosterol e induz estresse oxidativo em células eucariotas levando a apoptose (HUSSAIN, 2007). Outros estudos realizados mostram o seus efeitos principais no DNA induzindo a morte celular por apoptose ou necrose (SILVA et al., 2012; WISINTAINER et al., 2014).

Pode-se verificar ainda de acordo com os resultados que tanto a β -lapachona, quanto Ciclopirox Olamina e Nitrato de Miconazol apresentaram capacidade de inibir o crescimento das três espécies de leveduras, contudo, tratando-se do Fluconazol, o mesmo apresentou atividade inibitória apenas para a *C. albicans* e a *C. krusei*, mas não apresentou atividade/capacidade de inibir o crescimento da *C. tropicalis*, o que significa que a amostra desta levedura apresentava resistência ao Fluconazol, que apoia os achados de Albuquerque (2011) onde a resistência de algumas espécies de *Candida* aos antifúngicos azóis pode se dá por dois principais mecanismos. Primeiro é por meio de alterações na

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

enzima alvo citocromo P-450 lanosterol 14-desmetilase, com sua superexpressão ou mutação no gene ERG11. A mutação neste gene altera os aminoácidos da proteína citocromo P-450 14 α -desmetilase que resulta em uma menor afinidade aos antifúngicos azóis; o segundo mecanismo é por meio de bomba de efluxo, que diminui a quantidade de fármacos em seu interior.

As espécies de *Candida* exibem diferentes graus de sensibilidade aos antifúngicos mais comumente utilizados. Por exemplo, enquanto *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, com uma taxa de resistência global de 78,3%, *C. glabrata* exibe reduzida sensibilidade dose dependente com uma taxa de resistência de 15,7%. A resistência primária ao fluconazol é menor para *C. albicans* (1,4 % - 4 %), *C. parapsilosis* (1% – 7,5%) e *C. tropicalis* (4,1% - 22 %), nos Estados Unidos e Europa (ZHANG et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016).

Podem-se constatar as propriedades antifúngicas dessa planta *Tabebuia avellanedae*, para as espécies de levedura em estudo, apresentando um potencial de inibição relevante e semelhante aos medicamentos já existentes no mercado à disposição das pessoas, podendo-se produzir, por exemplo, colutórios para combater candidíase oral, tendo-se sua aplicação restrita por via oral ou venosa, devido a sua alta toxicidade.

3 CONCLUSÕES

A β -lapachona apresentou atividade antifúngica frente a isolados resistentes a azólicos de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* exercendo seus efeitos antifúngicos

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

através da produção de espécies reativas de oxigênio, disfunção mitocondrial e danos ao DNA, culminando na morte celular por apoptose.

Comparando os resultados do extrato com os resultados obtidos com os medicamentos disponíveis no mercado, pode-se concluir que a β - lapachona apresentou resultados semelhantes aos dos medicamentos, inclusive melhor do que o Fluconazol frente à *C. tropicalis*.

Pode-se verificar também que a utilização da β -lapachona deve ser tópica, tendo em vista que na literatura observou-se que ela tem elevada toxicidade, podendo levar até à quebra das hemácias, mesmo em baixas concentrações.

Verificou-se a necessidade de realização de um estudo aprofundado do mecanismo de ação da β - lapachona para melhorar sua utilização, controlando-se sua toxicidade e conseqüentemente apresentando-a como alternativa para tratamento de doenças causadas por fungos, por outros meios que não apenas uso tópico.

Uma boa aplicação da β - lapachona seria na produção de um enxaguante bucal, para combater candidíase oral, tendo em vista que atualmente no mercado muitos medicamentos não apresentam uma boa eficácia para tal finalidade e causam muitos efeitos colaterais, além de serem caros, principalmente quando comparados com o Pau D'arco Roxo que pode ser obtido em feiras livres e por baixo custo, acessível à comunidade mais carente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

- ALBURQUENQUE, O. C. et al . Susceptibilidad in vitro a anidulafungina en 100 cepas de especies de Candida aisladas previo a la introducción de esta equinocandina en Chile. **Rev. chil. infectol.**, Santiago , v. 28, n. 5, p.399-403, oct. 2011.
- ANTUNES, M.P et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes.- **Rev Bras Farmacogn**, Paraíba, v.16, n. 4, p. 517-524, out./dez. 2006.
- ARAUJO, E. L.; ALENCAR, J. L. B.; NETO, P. J. R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba, v. 12, supl. p. 57-59, 2002
- BARBOSA, I. de A. Desenvolvimento e Caracterização de nanocapsulas furtivas contendo betalapachona para terapia do câncer. **UFPE**. Recife, 2011.
- GABRIEL, G. H.; ARAUJO, E G.; NEPUCENO, L L. . Propriedades citotóxicas da beta lapachona em células de osteossarcoma in vitro. **UFG**, Goiânia 2017
- GONÇALVES, S.S. et al. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in Candida and Aspergillus. **Mycoses**, São Paulo n. 59, p.198-219, 2016.
- HUSSAIN et al. Lapachol: an overview. **Special Issue Reviews and Accounts**. USA, 2007.
- KOCH, D.; LEITZKE, M.; MONZANI, R. M. Extração de óleos essenciais por meio de hidrodestilação para controle de fitopatógenos. **IFC Eventos**, 2014.
- MEDEIROS, C. et.al. Atividade antifúngica da betalapachona na Criptococose experimental. **Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco**. 62f, Recife, 2010.
- NAKAMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. de. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. **Rev. SOBECC**, São Paulo. jul./set. 2013.
- RIBEIRO, M. C.; STELATO, M. . Microbiologia prática: aplicações de aprendizagem de microbiologia básica– bactérias, fungos e vírus: Antibiograma. 2 ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2011. 224 p.
- SCORZONI, Liliane et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal Of Microbiological Methods**. Canadá, p. 68-78. abr.2016.
- SILVA, A. M. P. et al. Biological activity of naphthoquinones from

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BETALAPACHONA FRENTE AOS FUNGOS OPORTUNISTAS

bignoniaceaespecies. **Revfitos**, Recife, v. 7, n. 4, p. 207-2015, jan. 2012.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Revista Química Nova**, vol. 26, n 3, 407-416, 2003.

SOUSDALEFF, M. Caracterização de fungos de ar indoor e ar outdoor dos laboratórios da UTFPR Campus Campo Mourão/PR. **UTFPR** Campo Mourão, 2016.

WISINTAINER, G.N.S. et al. Biflorin: an o-naphthoquinone of clinical significance. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p. 1907-1914, Dec. 2014.

ZHANG, L.etal. Development of fluconazole resistance in a series of Candida parapsilosis isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 15, p.340-347, 2015.