

Estudo do efeito da modificação de superfície de Fe_3O_4 e $CoFe_2O_4$ para aplicação como carreador de fármaco

(*Study of the effect of surface modification of Fe_3O_4 and $CoFe_2O_4$ for application as a drug delivery*)

P. M. A. G. Araújo^{1*}, N. G. Araújo², M. R. Silva³, S. M. C. M. Bicalho⁴, A. C. F. M. Costa¹

¹Universidade Federal de Campina Grande, Departamento de Engenharia de Materiais, 58429-140, Campina Grande, PB, Brasil

²Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, João Pessoa, PB, Brasil

³Universidade Federal de Itajubá, Departamento de Física, Itajubá, MG, Brasil

⁴JHS Biomateriais, Sabará, MG, Brasil

Resumo

Neste trabalho foram propostos obter e caracterizar o Fe_3O_4 e o $CoFe_2O_4$ associados ao tetraetilortossilicato (TEOS) e do 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTS), visando avaliar o efeito da modificação de superfície das partículas magnéticas sobre as propriedades estrutural, morfológica e magnéticas para aplicação como carreador de fármaco. As amostras foram caracterizadas por difração de raios X, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, análise textural, microscopia eletrônica de varredura e medidas magnéticas. A partir dos resultados observou-se que o Fe_3O_4 e o $CoFe_2O_4$ foram sintetizados com sucesso. A presença da fase principal do Fe_3O_4 foi notada no sistema obtido com o Fe_3O_4/SiO_2 e $CoFe_2O_4$ no sistema obtido com o $CoFe_2O_4/SiO_2$. A formação dos híbridos (*core-shell*) foi confirmada pela presença de bandas características da sílica. Os sistemas obtidos com o Fe_3O_4 apresentaram diâmetros de partícula superiores aos formados com o $CoFe_2O_4$, ambos formados de aglomerados de tamanho e formato irregulares e com comportamento típico de materiais ferrimagnéticos.

Palavras-chave: modificação de superfície, Fe_3O_4 , $CoFe_2O_4$, carreador de fármaco.

Abstract

*In this work, the obtention and characterization of Fe_3O_4 and $CoFe_2O_4$ associated to tetraethyl orthosilicate (TEOS) and 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTS) were proposed, aiming to evaluate the effect of surface modification of magnetic particles on structural, morphological and magnetic properties for application as a drug carrier. The samples were characterized by X-ray diffraction, Fourier-transform infrared spectroscopy, textural analysis, scanning electron microscopy and magnetic measurements. The results showed that Fe_3O_4 and $CoFe_2O_4$ were synthesized successfully. The presence of the Fe_3O_4 main phase was observed in the system obtained with Fe_3O_4/SiO_2 and $CoFe_2O_4$ in the system obtained with $CoFe_2O_4/SiO_2$. The formation of hybrids (*core-shell*) was confirmed by the presence of characteristic bands of silica. The systems obtained with Fe_3O_4 had larger particle diameters than those formed with $CoFe_2O_4$, both formed by agglomerates of irregular size and shape and with typical behavior of ferrimagnetic materials.*

Keywords: surface modification, Fe_3O_4 , $CoFe_2O_4$, drug delivery.

INTRODUÇÃO

Tem sido realizada pesquisa científica voltada para a obtenção de nanopartículas magnéticas (NPMs), as quais devido às suas excelentes propriedades magnéticas e elétricas despertam o interesse na área biomédica e farmacêutica. Entretanto, estes materiais apresentam como desvantagem a sua hidrofobicidade e a falta de grupos funcionais para conexão direta com biomoléculas [1]. Entre os nanomateriais inorgânicos, as nanopartículas magnéticas à base de óxido de ferro têm sido alvo de uma variedade de estudos *in vitro* e em aplicações *in vivo*. Baseado em suas propriedades

físicas, químicas, térmicas e mecânicas, estas nanopartículas oferecem um elevado potencial em várias aplicações biomédicas [2], entre as principais podem ser citadas: carreadores de fármaco, aplicações na área farmacêutica, biológica, entre outras. Porém, são evidenciados nos estudos *in vivo* e/ou *in vitro* feitos com nanopartículas para aplicação biomédica que estas devem ter sua superfície modificada para que haja boa biocompatibilidade. Em geral, alto grau de biocompatibilidade ocorre quando o material interage com o corpo sem induzir respostas tóxicas, imunogênicas, trombogênicas e carcinogênicas e contribui para a imunoestimulação e imunossupressão [3]. De modo particular, no que diz respeito à utilização de nanopartículas para liberação de fármaco o grande desafio é controlar

*pascally.guerra@gmail.com

a velocidade com que este é liberado no corpo. Portanto, existe uma procura na engenharia para obtenção de novos sistemas de segmentação de carreadores que apresentem melhor estabilidade no plasma humano, sendo ainda capaz de levar de forma eficiente e segura agentes terapêuticos ao alvo [4].

Diversos tipos de nanopartículas vêm sendo estudadas para aplicação na biomedicina em busca de obter biossensores como, por exemplo: γ -Fe₂O₃ [5]; ferritas mistas Ni-Zn [6]; NiFe₂O₄ [7]; ferrita de cobalto [8]; e Fe₃O₄ [9]. Entre estas a magnetita (Fe₃O₄) e a ferrita de cobalto (CoFe₂O₄) destacam-se por não apresentarem toxicidade, serem fortemente atraídas por um ímã e serem facilmente revestidas com a sílica (SiO₂), formando estruturas *core-shell*, e com isso apresentam aglomeração reduzida formando híbridos Fe₃O₄/SiO₂ e CoFe₂O₄/SiO₂, que apresentam grupos reativos capazes de se ligarem com biomoléculas e fármacos. A superfície de um material é conhecida por ser excepcionalmente reativa, com propriedades diferentes a partir da sua constituição. Portanto, o objetivo é alterar as propriedades da superfície para melhorar o desempenho biológico sem mudar as propriedades do material [10]. As propriedades da superfície afetam significativamente o desempenho biológico de um biomaterial. Essas incluem a energia, as cargas, a molhabilidade, a superfície química e a topografia [11].

Entre os materiais utilizados para modificação de superfície destaca-se o tetraetilortossilicato (TEOS) que é um material livre de haleto [12], é líquido e geralmente usado como um precursor para formar redes inorgânicas de sílica, também usado para aumentar a hidrofiliabilidade de nanopartículas magnéticas (NPMs), apresenta baixo custo e fácil manuseio. Este organoalcoxissilano, assim como o 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTS), o tetrametilortossilicato (TMOS) e o polidimetoxissiloxano (PDMS), tem sido utilizado em mecanismos reacionais envolvendo hidrólise ácida e policondensação posterior com polímero inorgânico [13], sendo portanto precursor da sílica que apresenta grupos funcionais silanol (Si-OH) que permite que as nanopartículas dispersem em água ou em solventes polares. Outra função do grupo Si-OH é que fornece sítio de ligação entre as nanopartículas e propriedades de bioconjugação aplicáveis na área biomédica, sobretudo na liberação controlada de fármaco. Assim, neste trabalho propõem-se sintetizar o Fe₃O₄ e o CoFe₂O₄ associados ao TEOS e APTS para obtenção dos híbridos Fe₃O₄/SiO₂ e CoFe₂O₄/SiO₂ visando avaliar o efeito da modificação de superfície nas propriedades estrutural, morfológicas e magnéticas para aplicação como carreador de fármaco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados na obtenção de Fe₃O₄ e CoFe₂O₄ e posterior formação dos híbridos Fe₃O₄/SiO₂ e CoFe₂O₄/SiO₂ foram: nitrato de ferro nono-hidratado [Fe(NO₃)₃.9H₂O] PA 99%; nitrato de cobalto II tri-hidratado [Co(NO₃)₂.3H₂O] PA 98%; glicina (C₂H₅NO₂) PA 98,5%; ureia [CO(NH₂)₂]

PA 98%; tetraetilortossilicato [Si(OC₂H₅)₄] PA 99,99%; 3-aminopropiltrimetoxissilano [H₂N(CH₂)₃Si(OCH₃)₃] PA 97%; álcool etílico absoluto, PA 99,5%; e solução de amônia 1 M, PA 99,9%.

Para obtenção do Fe₃O₄ e CoFe₂O₄ foi utilizada a técnica de reação por combustão baseada nos conceitos da química dos propelentes e explosivos de modo a favorecer a relação estequiométrica oxidante/combustível, $\Phi_c=1$ [14], para se estabelecer a estequiometria da fase de interesse. Duas rotas foram utilizadas. Rota 1: para a obtenção do Fe₃O₄ foi utilizado um reator de micro-ondas (RMW-3, Inovetech) como fonte de aquecimento para a reação. A síntese foi conduzida em atmosfera inerte de N₂ com fluxo constante de 900 mL/s, tempo de gás de arraste (purga) de 5 min e tempo de exposição de 2 min. O recipiente utilizado foi um cadinho de sílica vítrea com capacidade de 200 mL e como combustível a glicina. Rota 2: para obtenção do CoFe₂O₄ foi utilizado um reator cônico [15] acoplado ao recipiente de aço inoxidável com capacidade de 2 L e capacidade de produção em bateladas de 10 g do produto. A reação ocorreu em atmosfera oxidante e o combustível utilizado para síntese foi a ureia.

Após a síntese, os produtos das reações (flocos porosos) foram desaglomerados em peneira ABNT 325 (45 μ m) e submetidos à modificação da superfície. Para tanto, foi preparado um fluido magnético com 2,5 g de NPMs (Fe₃O₄ e CoFe₂O₄) e 100 mL de etanol, sob agitação ultrassônica por 30 min. O revestimento com TEOS (tetraetilortossilicato) e APTS (3-aminopropiltrimetoxissilano) foi baseado na metodologia proposta em [16] com modificações, como descrito a seguir. As partículas foram separadas externamente por um ímã de neodímio e decantadas, sendo em seguida lavadas com etanol e água deionizada. Posteriormente foram centrifugadas e secas à temperatura ambiente durante 12 h. Após essa etapa foram adicionados 4 mL de APTS (correspondendo a 50,66% de APTS em relação às NPMs) a 4 g do híbrido e novamente agitadas mecanicamente por 6 h a 60 °C, seguida de lavagem com etanol e água deionizada para se obter um pH 7.0. As partículas magnéticas foram novamente separadas externamente por um ímã e decantadas, sendo em seguida lavadas com etanol e água deionizada, obtendo-se assim os híbridos Fe₃O₄/SiO₂ e CoFe₂O₄/SiO₂, revestidos com grupos OH e NH₂ reativos. A quantidade do fármaco Ciproflonax adicionada aos híbridos foi baseada na metodologia proposta em [17], em que se obteve um carreador de fármaco formado por NPMs de Fe₃O₄/SiO₂-doxorrubicina para tratamento do câncer. Em um balão de três bocas de fundo redondo de 500 mL foram adicionados 3 mL de TEOS (correspondendo a 35,91% de TEOS em relação às partículas) a 6 mL do fluido magnético. Aos híbridos Fe₃O₄/TEOS (100 g) foram adicionados 100 mL de APTS e por gotejamento duas gotas de ácido acético glacial como catalisador. O fármaco (γ) Ciproflonax (10 mg) foi adicionado à dispersão coloidal, sendo agitada mecanicamente por 6 h a 60 °C e a reação de conjugação do fármaco foi processada durante 48 h à temperatura ambiente. Os carreadores de fármaco CoFe₂O₄/SiO₂ e Fe₃O₄/SiO₂ foram designados por

C γ e F γ , respectivamente.

As fases presentes, a cristalinidade e o tamanho de cristalito nas amostras foram determinados a partir dos dados de difração de raios X (DRX) obtidos com um difratômetro (D2 Phaser, Bruker; radiação CuK α). Os espectros de FTIR foram obtidos na região do infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR) em um espectrômetro (660-IR, Varian), usando o método de transmissão com porta amostra da Pike e KBr como agente dispersante. Para a análise de distribuição de tamanho de partícula foi utilizado o analisador de nanopartículas (SZ-100, Horiba Scientific) na faixa de 0,3 nm a 8 μ m, com base na técnica de dispersão dinâmica da luz. A morfologia e a estimativa do tamanho das partículas, bem como a presença de aglomerados, foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV, FEG, Philips). A caracterização magnética foi feita

utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (VSM, mod. 7404, Lake Shore), com campo magnético máximo aplicado de 13700 G à temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1 encontram-se ilustrados os difratogramas de raios X das partículas de CoFe₂O₄ e Fe₃O₄ como sintetizadas por reação de combustão, revestidas com o TEOS e com o TEOS/APTS que formaram o material híbrido CoFe₂O₄/SiO₂ e Fe₃O₄/SiO₂ e os carreadores de fármaco que foram designados por C γ e F γ . Mediante os difratogramas de raios X do CoFe₂O₄ revestido com TEOS e com TEOS e APTS (material híbrido), Fig. 1a, observou-se a formação da fase ferrita CoFe₂O₄ e traços de Fe₂O₃ (hematita) identificados mediante os arquivos cristalográficos JCPDF

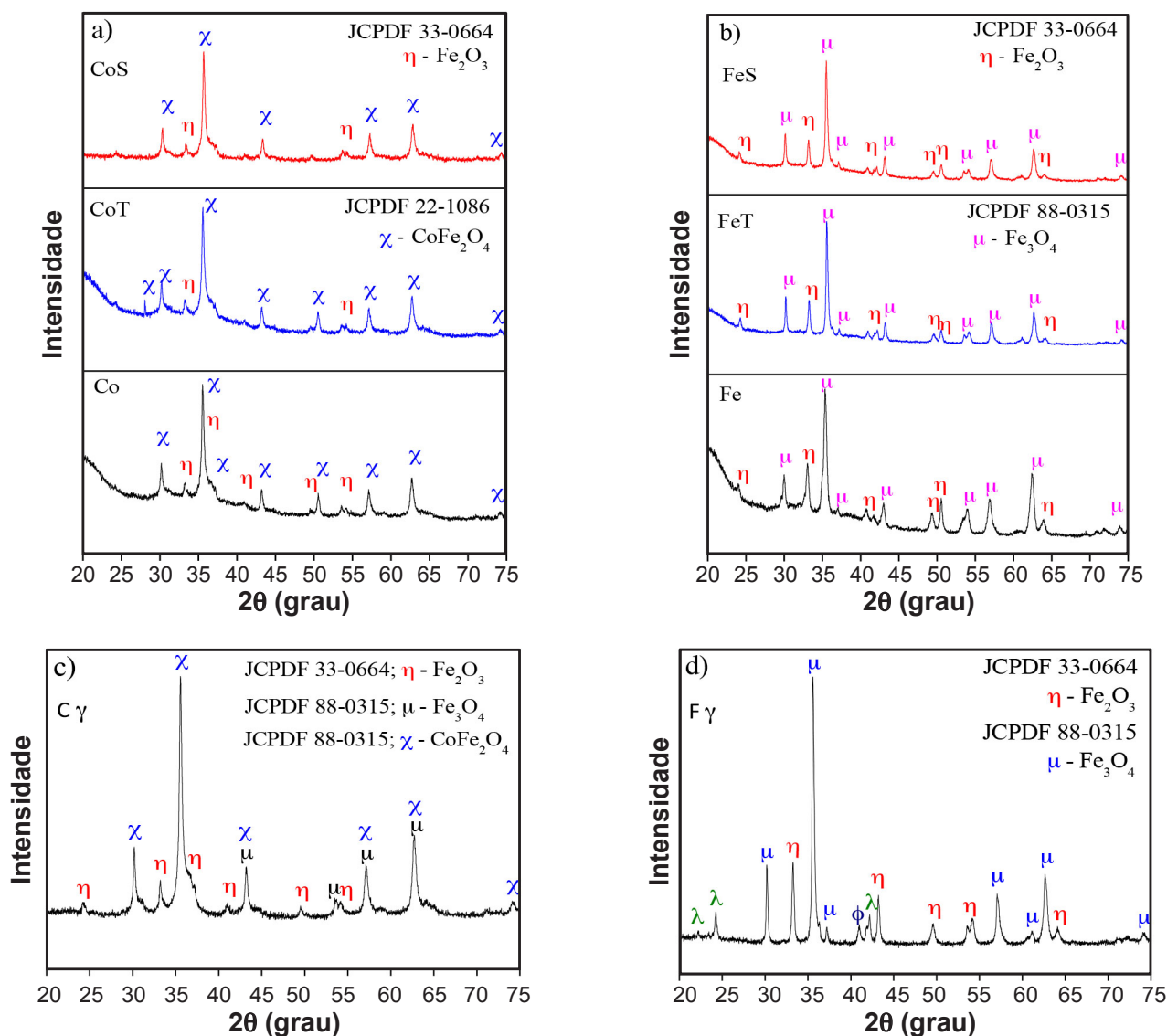


Figura 1: Difratogramas de raios X de amostras: a) CoFe₂O₄ (Co), CoFe₂O₄/TEOS (CoT), CoFe₂O₄/SiO₂ (CoS); b) Fe₃O₄ (Fe), Fe₃O₄/TEOS (FeT), Fe₃O₄/SiO₂ (FeS); e carreadores de fármaco: c) CoFe₂O₄/SiO₂ (C γ), d) Fe₃O₄/SiO₂ (F γ).

[Figure 1: XRD patterns of samples: a) CoFe₂O₄ (Co), CoFe₂O₄/TEOS (CoT), CoFe₂O₄/SiO₂ (CoS); b) Fe₃O₄ (Fe), Fe₃O₄/TEOS (FeT), Fe₃O₄/SiO₂ (FeS); and drug carriers: c) CoFe₂O₄/SiO₂ (C γ), d) Fe₃O₄/SiO₂ (F γ).]

Tabela I - Cristalinidade e tamanho de cristalito das amostras preparadas.

[Table I - Crystallinity and crystallite size of the prepared samples.]

Amostra	Cristalinidade (%)	Tamanho de cristalito (nm)
Co	66	31
CoT	65	31
CoS	64	30
C γ	66	31
Fe	74	25
FeT	78	35
FeS	78	36
F γ	65	31

NPMs: Co - CoFe₂O₄; CoT - CoFe₂O₄/TEOS; CoS - CoFe₂O₄/SiO₂; Fe - Fe₃O₄; FeT - Fe₃O₄/TEOS; FeS - Fe₃O₄/SiO₂. Carreadores de fármaco: C γ - CoFe₂O₄/SiO₂; F γ - Fe₃O₄/SiO₂.

22-1086 e JCPDF 33-0664, respectivamente. Pôde-se observar para todos os difratogramas a presença de picos com alta intensidade e elevada largura basal para todas as reflexões, demonstrando a cristalinidade das amostras e sua reprodutibilidade. Resultado semelhante ao obtido neste trabalho também foi observado em [18], no qual foi estudado o efeito da matriz de sílica amorfa nas propriedades estrutural, magnética e dielétrica de nanocompósitos de ferrita de cobalto/sílica (CoFe₂O₄)_{1-y}/(SiO₂)_y (y = 10, 30, 50 e 60%), e em [19], no qual foi estudada a obtenção de materiais nanoestruturados híbridos de CoFe₂O₄ revestidos por biopolímeros polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG) com a finalidade de aplicações biomédicas.

Na Fig. 1b para o Fe₃O₄ sintetizado revestido com TEOS e com TEOS e APTS (híbrido), observa-se a formação da fase principal referente ao Fe₃O₄ (μ) identificada mediante o arquivo JCPDF 88-0315 e picos de traços da segunda fase referente à hematita Fe₂O₃ (η) identificada pelo arquivo JCPDF 33-0664. Pôde-se observar para todos os difratogramas a presença de picos com alta intensidade e elevada largura basal para todas as reflexões, demonstrando a cristalinidade das amostras. Isso indicou a eficiência da técnica de combustão em um reator de micro-ondas e atmosfera de nitrogênio para possibilitar a obtenção desses sistemas com característica cristalina. Verificou-se que a presença do TEOS ou mesmo do TEOS associado ao APTS como fonte de SiO₂ usado para revestir as partículas também não interferiu na sua estrutura. Este resultado corrobora com os resultados observados em [20], no qual foi preparado o híbrido Fe₃O₄/APTES para imobilização da GOX, em [21], no qual foram preparadas e caracterizadas nanopartículas revestidas de sílica usando Fe₃O₄ como precursor de ferrofluidos, e em [22], no qual foram sintetizadas nanopartículas de Fe₃O₄ silanizadas *core-shell* para aplicação em hipertermia.

Na Fig. 1c, para o carreador C γ , observa-se a formação das fases ferrita CoFe₂O₄ e Fe₂O₃ (hematita) e traços

da magnetita Fe₃O₄ identificadas mediante os arquivos cristalográficos JCPDF 22-1086, JCPDF 33-0664 e JCPDF 88-0315, respectivamente. Por meio da Fig. 1d, para o híbrido Fe₃O₄/SiO₂: γ (F γ), observa-se a formação da fase principal referente ao Fe₃O₄ (μ) identificada mediante o arquivo JCPDF 88-0315 e picos de traços da segunda fase referente à hematita Fe₂O₃ (η), identificada pelo arquivo JCPDF 33-0664. Pôde-se observar para os difratogramas dos carreadores CoFe₂O₄/SiO₂: γ (C γ) e Fe₃O₄/SiO₂: γ (F γ), Figs. 1c e 1d, a presença de picos com alta intensidade e elevada largura basal para todas as reflexões, demonstrando a cristalinidade das amostras. Para o carreador CoFe₂O₄/SiO₂ (C γ) não foi observado pico referente ao fármaco (γ), entretanto para o carreador Fe₃O₄/SiO₂ (F γ), Fig. 1d, picos foram observados em 18,34° e 19,21° referentes à fase C₁₅H₁₂ClN₃O (λ) e em 40,94° referente à fase C₁₁H₁₆N₃O₂ (ϕ) do fármaco Ciproflonax. Esse resultado denotou que houve uma pequena mudança na estrutura das partículas hibridizadas de Fe₃O₄ e estas conjugaram com maior eficiência o fármaco que as partículas de CoFe₂O₄.

A Tabela I exhibe os dados estruturais de cristalinidade e tamanho de cristalito para o pico de maior intensidade (311), primeira ordem de difração, obtidos a partir dos resultados de DRX para o CoFe₂O₄ e o Fe₃O₄, revestidos com TEOS e com TEOS e APTS (híbrido), e dos carreadores de fármaco CoFe₂O₄/SiO₂ (C γ) e Fe₃O₄/SiO₂ (F γ). Pôde-se observar de forma geral que os valores de cristalinidade e tamanho de cristalito se mantiveram praticamente inalterados, indicando que o revestimento não ocasionou alterações na estrutura das amostras em estudo. Por meio de DRX foi observada a formação da estrutura de espinélio cúbico nanocristalino do CoFe₂O₄ e ausência de picos de SiO₂ devido à estrutura amorfa.

Na Fig. 2a encontram-se os espectros vibracionais na região do infravermelho, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, do CoFe₂O₄ como sintetizado por reação de combustão (Co), revestido com TEOS, CoFe₂O₄/TEOS (CoT), e com TEOS e APTS, CoFe₂O₄/SiO₂ (CoS). Verificou-se para o CoFe₂O₄ (Co) duas bandas fracas de absorção, atribuídas ao estiramento do grupo O-H, devido à água livre e/ou absorvida por volta de 1630 e 3660 cm⁻¹. Na faixa de 1000-500 cm⁻¹, as bandas no infravermelho dos sólidos são geralmente caracterizadas por vibrações de íons na rede do cristal. As principais bandas estão por volta de 566 e 440 cm⁻¹ correspondente aos estiramentos Fe-O- e Co-O- dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura cristalina do espinélio inverso. Pôde-se observar a presença destas duas bandas características da estrutura do espinélio para o CoFe₂O₄ (Co) sintetizado e revestido com TEOS e APTS. Para a amostra CoT, revestida com o TEOS, observou-se, além das duas bandas de estiramentos Fe-O- e Co-O- dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura cristalina do espinélio inverso, uma banda de absorção larga em torno de 3770-1781 cm⁻¹ atribuída à sobreposição nos estiramentos dos grupos funcionais O-H e/ou Si-OH e bandas em 2352 e 1553 cm⁻¹ correspondentes aos grupos CO e NO, respectivamente. Observou-se também a presença de bandas em torno de 1109 cm⁻¹, que

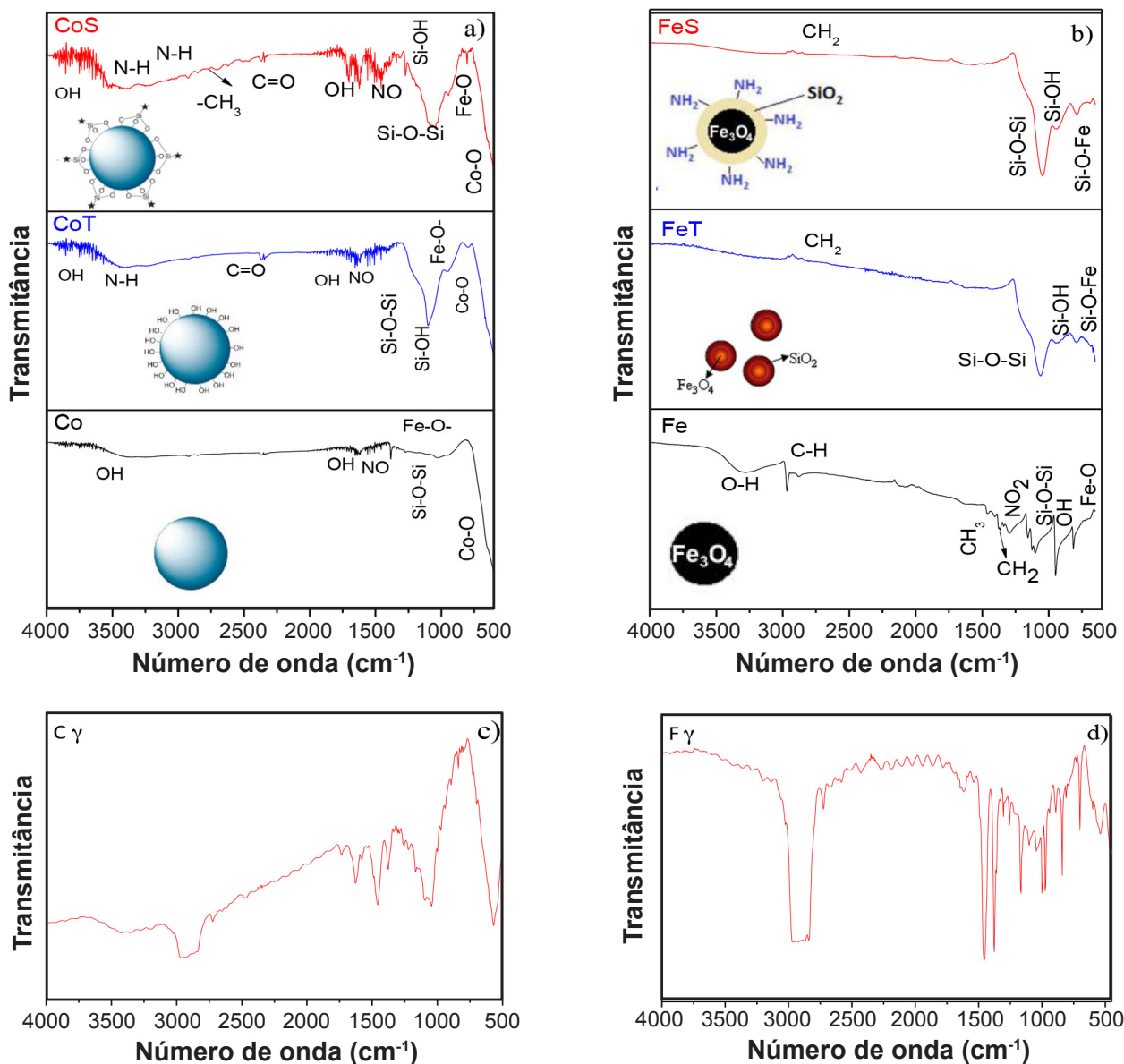


Figura 2: Espectros de FTIR de amostras: a) CoFe_2O_4 (Co), $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{TEOS}$ (CoT), $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (CoS); b) Fe_3O_4 (Fe), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TEOS}$ (FeT), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (FeS); e carreadores de fármaco: c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (C γ), d) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (F γ).

[Figure 2: FTIR spectra of samples: a) CoFe_2O_4 (Co), $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{TEOS}$ (CoT), $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (CoS); b) Fe_3O_4 (Fe), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TEOS}$ (FeT), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (FeS); and drug carriers: c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (C γ), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (F γ).]

correspondeu ao estiramento assimétrico do grupo -O-Si-O-, e em 1350, 970 e 794 cm^{-1} , provenientes de grupos silanóis resultantes do revestimento com o TEOS, precursor da sílica (SiO_2). Também para a amostra CoS modificada com TEOS e APTS simultaneamente, observou-se que as bandas de absorção largas se encontraram em torno de 3808-1692 cm^{-1} atribuídas à sobreposição nos estiramentos dos grupos funcionais O-H e/ou Si-OH e bandas em 2339 e 1477 cm^{-1} correspondentes aos grupos CO e NO, respectivamente. Observou-se também a presença de bandas em torno de 1060 cm^{-1} , que correspondeu ao estiramento assimétrico do grupo -O-Si-O-, e em 1300, 945 e 794 cm^{-1} , provenientes de grupos silanóis resultantes do revestimento com TEOS e APTS, precursores da sílica (SiO_2). As bandas no intervalo de 566 e 477 cm^{-1} corresponderam aos estiramentos Fe-O-

e Co-O- dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura cristalina do espinélio inverso. A presença das bandas Fe-O- e Co-O- características dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura cristalina do espinélio obtidas neste trabalho corroborou os resultados obtidos em [23], no qual se promoveu a encapsulação de CoFe_2O_4 magnético em nanocompósitos de SiO_2 usando hidroxiapatita como moldes para carreador de fármaco e foram observadas uma ampla banda em 3416 cm^{-1} , devido à água absorvida sobre a superfície, e bandas em 798 e 885 cm^{-1} , causadas pelas vibrações (alongamento) das coordenações tetraédricas e octaédricas dos íons CO^{2+} e Fe^{3+} .

Na Fig. 2b pode-se notar por meio dos espectros de FTIR para as partículas de Fe_3O_4 (Fe), conforme sintetizadas por reação de combustão, uma banda larga

Tabela II - Número de onda e bandas de absorção referente aos híbridos $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2:\gamma$ ($\text{C}\gamma$) e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2:\gamma$ ($\text{F}\gamma$).
 [Table II - Wavenumber and absorption bands of the drug carriers $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2:\gamma$ ($\text{C}\gamma$) and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2:\gamma$ ($\text{F}\gamma$).]

$\text{C}\gamma$		$\text{F}\gamma$	
Número de onda (cm^{-1})	Banda de absorção	Número de onda (cm^{-1})	Banda de absorção
2886	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$	2915	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$
2722	$\text{CH}_2\text{-N}$	2724	$\text{CH}_2\text{-N}$
1732; 1624; 3400	Si-OH	2506	COOH
1455	CH_3 ; C-X (X=F, Cl)	1455	CH_3 ; C-X (X=F, Cl)
1378	NO	1370	CH_2 ; C-X (X=F, Cl)
1332	C-X (X=F, Cl)	1303; 1251	CH_3 ; C-F
1284; 1302	COOH; C-F	1166	$\text{CH}_3\text{-F}_3$
1215; 1253		1103	C-N; C-F
1163	C-N; C-F	1043; 1001	ν_{as} Si-O-Si
1044	ν_{as} Si-O-Si	979; 3450	C-X (X=F, Cl); Si-OH
836	Fe-O-Si	888	$\text{RCH}=\text{CH}_2$
568	Co-O-	839	Benzeno monossustituído
		726,67; 730	ν_{o} Si-O-Fe
		698	Benzeno monossustituído
		540	Fe-O e Co-O

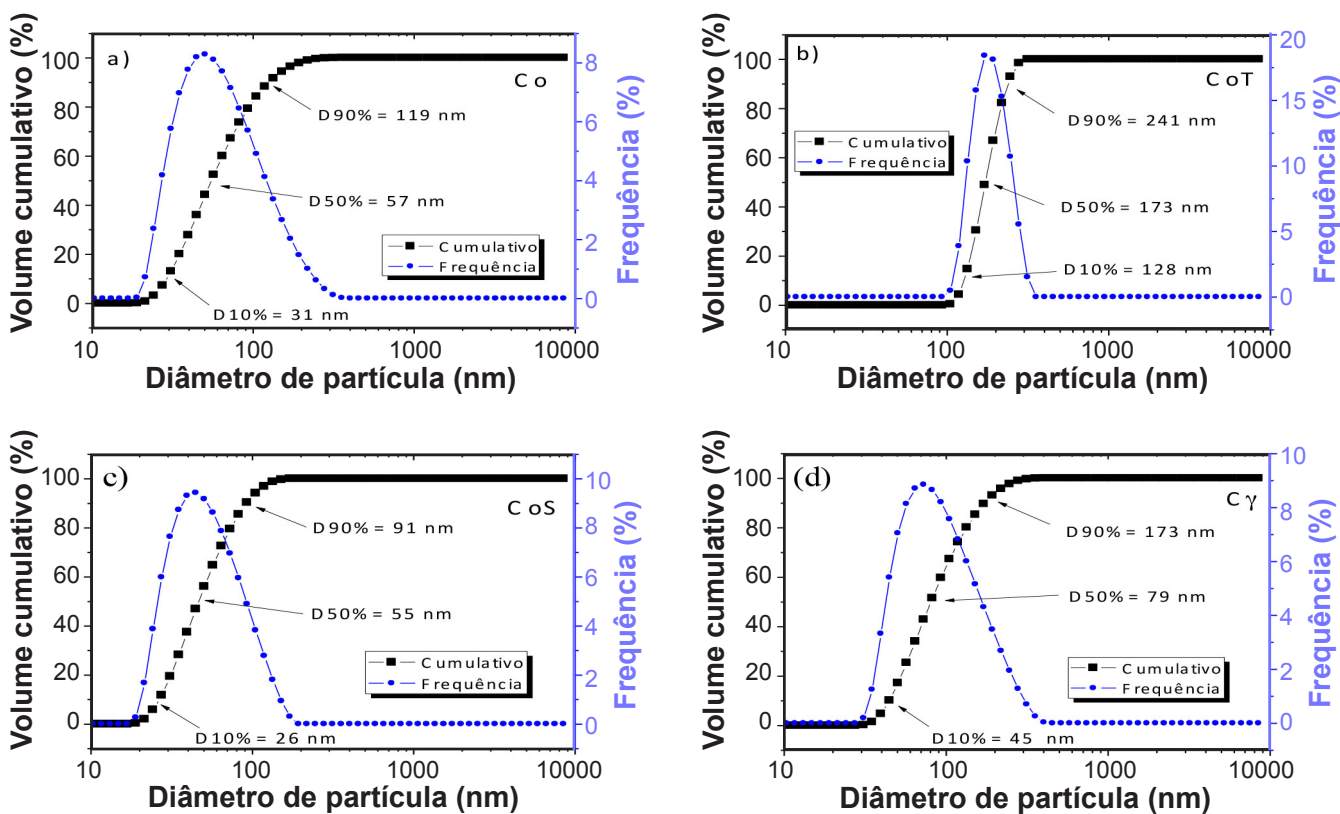


Figura 3: Curvas de distribuição granulométrica das amostras: (a) Co; (b) CoT; (c) CoS; e (d) $\text{C}\gamma$.
 [Figure 3: Particle size distribution curves of samples: (a) Co; (b) CoT; (c) CoS; and (d) $\text{C}\gamma$.]

em torno de 3290 cm^{-1} correspondente às vibrações dos grupos O-H, hidroxilas livres ou ligados ao hidrogênio, resultante da água fisicamente adsorvida. As bandas em torno de 1343 , 2969 e 1366 cm^{-1} foram relacionadas com as

vibrações de estiramento do grupo CH_2 . A banda em torno de 1375 cm^{-1} correspondeu ao grupo CH_3 e em 1098 cm^{-1} ao grupo NO_2 ; em 1121 cm^{-1} observou-se uma banda referente ao grupo Si-O-Si proveniente das impurezas dos reagentes

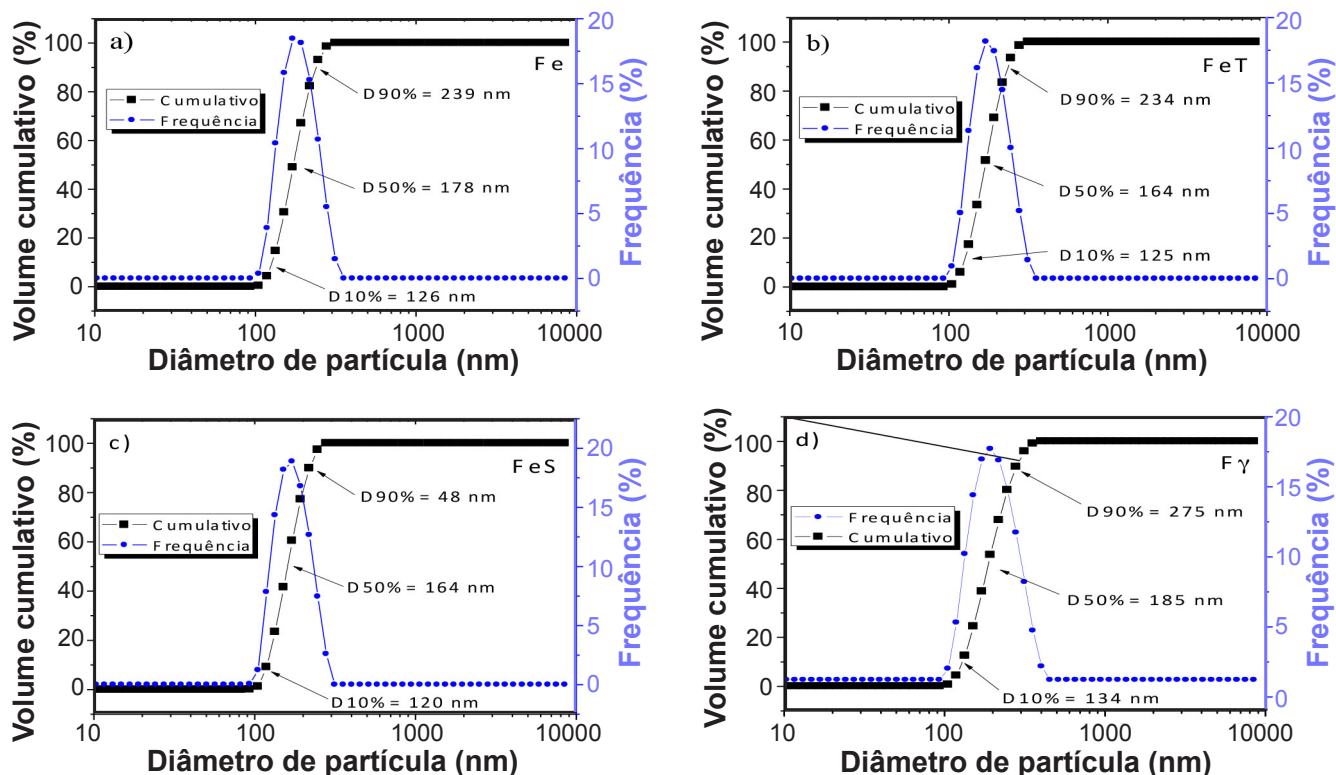


Figura 4: Curvas de distribuição granulométrica das amostras: (a) Fe; (b) FeT; (c) FeS; e (d) F γ .

[Figure 4: Particle size distribution curves of samples: (a) Fe; (b) FeT; (c) FeS; and (d) F γ .]

Tabela III - Diâmetros das partículas das amostras de acordo com os índices de distribuição.

[Table III - Diameters of the particles of the samples according to the distribution indices.]

Amostra	D10% (nm)	D50% (nm)	D90% (nm)
Co	31	57	119
CoT	128	173	241
CoS	26	55	91
C γ	45	79	173
Fe	126	178	239
FeT	125	164	234
FeS	120	164	226
F γ	134	185	275

precursores do Fe₃O₄. A banda de absorção em torno de 1390 cm⁻¹ observada é característica dos grupos O-H. A presença da magnetita foi observada pela forte banda em 804-923 cm⁻¹, característica da vibração Fe-O-. Para o Fe₃O₄ revestido com o TEOS (FeT), verificou-se a presença de bandas referentes ao grupo OH, possivelmente sobrepostas pelas bandas do SiO₂ e formando os grupos Si-OH. Pôde-se visualizar também uma pequena banda em torno de 2957 cm⁻¹ referente ao grupo CH₂. Em 1056 cm⁻¹ pôde-se observar uma banda referente ao estiramento assimétrico da

ligação Si-O-Si e em 960 e 816 cm⁻¹ bandas características da vibração Fe-O-. As NPMs de Fe₃O₄ revestidas com o TEOS e APTS (FeS), por sua vez, apresentaram uma banda de NO em 2933 cm⁻¹; em 1450 cm⁻¹ observou-se a banda referente ao grupo Si-OH e em 1043 cm⁻¹ a banda referente ao estiramento assimétrico da ligação do grupo Si-O-Si. As bandas características da vibração Fe-O- foram observadas em 804 e 923 cm⁻¹. Para as amostras de Fe₃O₄ revestidas com TEOS (FeT) e TEOS e APTS, Fe₃O₄/SiO₂ (FeS), pôde-se observar que, além das bandas visualizadas para o Fe₃O₄ como sintetizado (Fe), observou-se a presença de grupos reativos capazes de promover a conjugação entre as NPMs ao fármaco e às biomoléculas. A Tabela II exibe de forma detalhada os números de onda e as bandas de absorção dos espectros de FTIR dos carreadores de fármaco apresentados nas Figs. 2c e 2d para CoFe₂O₄/SiO₂: γ (C γ) e Fe₃O₄/SiO₂: γ (F γ), respectivamente, por meio dos quais observa-se que o fármaco Ciproflonax (γ) foi conjugado com eficiência nos híbridos CoFe₂O₄/SiO₂ e Fe₃O₄/SiO₂ formando carreadores de fármaco CoFe₂O₄/SiO₂ (C γ) e Fe₃O₄/SiO₂ (F γ).

Na Fig. 3 apresentam-se as curvas de distribuição dos diâmetros equivalentes das partículas em função do volume cumulativo das amostras Co, CoT, CoS e C γ . Com relação às partículas de CoFe₂O₄ (Co) observou-se uma distribuição larga, assimétrica e monomodal, com tamanho mediano de partícula (D50%) de 69 nm. Após o revestimento com o TEOS, amostra CoT, observou-se um aumento no tamanho de partícula, porém com distribuição mais estreita e tamanho D50% de 173 nm, resultando em um aumento

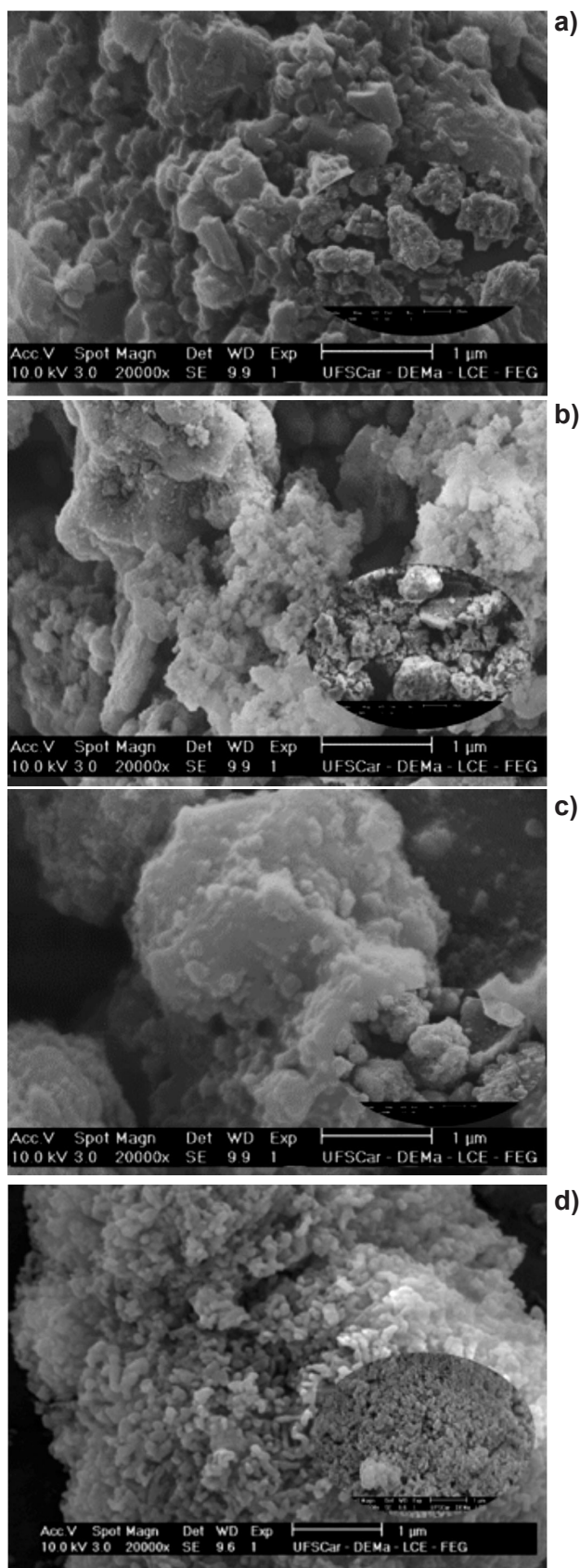


Figura 5: Micrografias de MEV das amostras: (a) CoFe_2O_4 (Co); (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{TEOS}$ (CoT); (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (CoS); e (d) C_γ .
 [Figure 5: SEM micrographs of samples: (a) CoFe_2O_4 (Co); (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{TEOS}$ (CoT); (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (CoS); and (d) C_γ .]

a) em torno de 60%. Esse aumento era esperado, visto que o TEOS promove a adesão entre as partículas pela redução da tensão superficial via ligação covalente. Após a adição de TEOS e APTS, amostra CoS, observou-se que a adição do APTS praticamente não ocasionou variação no tamanho de partícula ($D_{50\%}$) comparando com a amostra sem revestimento Co, enquanto que o carreador C_γ apresentou distribuição de partícula larga, monomodal e assimétrica e diâmetro mediano de partícula ($D_{50\%}$) de 79 nm.

Na Fig. 4 observam-se as curvas de distribuição dos diâmetros equivalentes das partículas em função do volume cumulativo das amostras Fe, FeT, FeS e F_γ . Observou-se de modo geral que as amostras apresentaram curvas de distribuição de partícula estreita, monomodal e simétrica, com tamanho mediano de partícula ($D_{50\%}$) de 178, 164 e 164 nm para as amostras Fe, FeT e FeS, respectivamente, ou seja, uma pequena redução em torno de 8% quando se compara a amostra sem revestimento com as amostras após revestimento com TEOS ou com TEOS e APTS simultaneamente. Esse resultado mostrou que as partículas de magnetita estavam muito aglomeradas com forte ligação interpartícula, o que dificultou a dispersão das amostras. O carreador F_γ , por sua vez, apresentou distribuição monomodal e simétrica, com tamanho mediano de partícula ($D_{50\%}$) de 185 nm.

A Tabela III expressa os diâmetros de partícula das amostras em estudo de acordo com os índices de distribuição de tamanho de partícula $D_{10\%}$, $D_{50\%}$ e $D_{90\%}$ obtidos a partir das Figs. 3 e 4. Os parâmetros $D_{10\%}$ e $D_{90\%}$ estão relacionados aos diâmetros de corte na curva de distribuição acumulada em 10% e 90%, respectivamente, enquanto que o parâmetro $D_{50\%}$ está relacionado à mediana da distribuição. Observou-se que o Fe_3O_4 e o carreador F_γ apresentaram diâmetros de partícula superiores aos obtidos com o CoFe_2O_4 , como pode-se observar de forma mais detalhada na análise de MEV. As Figs. 5 e 6 ilustram as micrografias referentes às amostras de CoFe_2O_4 e Fe_3O_4 como sintetizadas por reação de combustão, revestidas com o TEOS (CoT e FeT), com o TEOS e APTS (CoS e FeS) e dos carreadores C_γ e F_γ . Para as amostras da ferrita de CoFe_2O_4 sem e após revestimento (Figs. 5a a 5c), pôde-se observar de modo geral que a morfologia para as três amostras foi praticamente semelhante, ou seja, formação de aglomerados sem morfologia específica, de tamanho irregular. Não foram observadas mudanças significativas com a presença do revestimento com TEOS ou com TEOS seguido do APTS, enquanto que a morfologia do carreador C_γ apresentou aglomerados de forma irregular e formação de poucos poros distribuídos em toda a amostra (Fig. 5d).

Para as amostras da magnetita (Fe_3O_4) sem e após revestimento (Figs. 6a a 6c) também não se observaram mudanças perceptíveis na morfologia após o revestimento com TEOS ou com TEOS e o APTS. Notou-se de modo geral a formação de aglomerados esponjosos. Esse comportamento é típico de materiais formados com glicina, que durante o processo de síntese de combustão libera gases, uma vez que a natureza da aglomeração é regida por entalpia

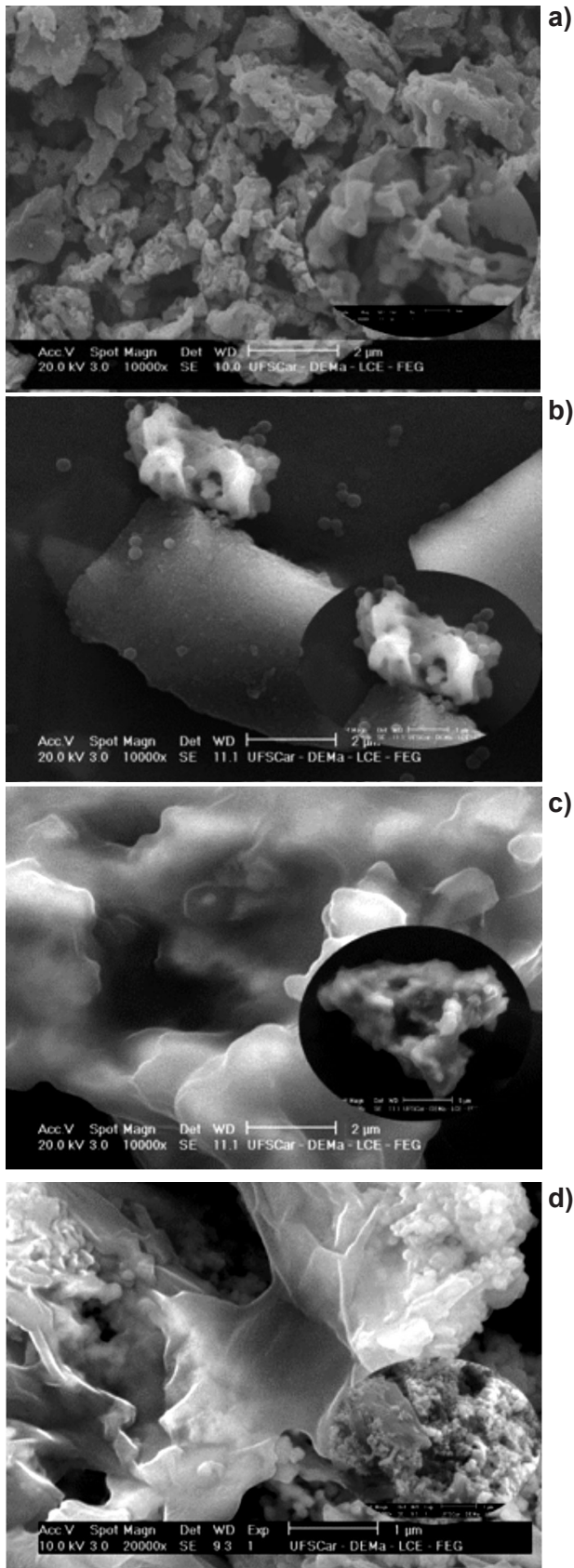


Figura 6: Micrografias de MEV das amostras: (a) Fe_3O_4 (Fe); (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TEOS}$ (FeT); (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (FeS); e (d) $\text{F}\gamma$.
 [Figure 6: SEM micrographs of samples: (a) Fe_3O_4 (Fe); (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TEOS}$ (FeT); (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (FeS); and (d) $\text{F}\gamma$.]

e temperatura da chama gerada durante a combustão, que por sua vez são dependentes da natureza do combustível e da relação agente oxidante/agente redutor. Foi possível notar, após o revestimento das amostras de Fe_3O_4 com o TEOS e TEOS/APTS, a presença de aglomerados mais compactos e interligados devido ao revestimento com o SiO_2 e formação de estrutura *core-shell* ocasionando uma diminuição dos poros. O carreador $\text{F}\gamma$ (Fig. 6d) também apresentou morfologia que demonstrou a formação de aglomerados esponjosos de formato irregular.

A Fig. 7 ilustra o comportamento da magnetização (M) em função do campo magnético aplicado (H) por meio do laço de histerese para: CoFe_2O_4 (Co) e Fe_3O_4 (Fe) conforme sintetizados e após revestimento com o TEOS (CoT e FeT) e com TEOS e APTS simultaneamente (CoS e FeS) e dos carreadores $\text{C}\gamma$ e $\text{F}\gamma$. Para estas amostras observou-se um comportamento típico de materiais ferrimagnéticos, com formação de um laço (curva) de histerese bem definido, onde as amostras apresentaram uma magnetização de saturação (M_s), uma magnetização remanente (M_r) e um campo coercitivo (H_c , campo necessário para desmagnetizar o material). A diferença entre o CoFe_2O_4 e o Fe_3O_4 foi no tipo de material magnético. A magnetita (Fe_3O_4) é um material magnético mole, que magnetiza e desmagnetiza com baixos valores de campo aplicado, em torno de 258 Oe (Fig. 7b), enquanto a ferrita de CoFe_2O_4 é um material magnético duro, que magnetiza e desmagnetiza com valores de campo aplicado elevado, em torno de 1190 Oe (Fig. 7a). Esse comportamento ferrimagnético de materiais magnéticos duros ou moles é bem estabelecido na literatura. De acordo com [24], as ferritas duras são consideradas magnetos permanentes, ou seja, materiais difíceis de serem magnetizados e desmagnetizados, retendo a magnetização mesmo depois da remoção do campo magnético. As ferritas moles são materiais considerados magnetos não permanentes ou de alta permeabilidade, ou seja, materiais que são facilmente magnetizados e desmagnetizados. Interessante ressaltar que a ferrita de CoFe_2O_4 é a única ferrita do tipo espinélio inverso que apresenta comportamento de material magnético duro, ou seja, que apresenta valor da coercividade na ordem de $2,5 \cdot 10^4$ Oe [25]. Todas as demais ferritas dessa classe se comportam como material magnético mole. Analisando o comportamento das amostras em estudo após o revestimento com TEOS e com TEOS e APTS simultaneamente, verificou-se de forma geral que o comportamento foi o mesmo, ou seja, uma redução da magnetização de saturação após o revestimento. Para a amostra CoFe_2O_4 (Co) essa redução foi de 11,50 e 1,25% e para a amostra Fe_3O_4 (Fe) a redução foi de 11,26 e 24,92%, respectivamente. Apesar da redução na magnetização de saturação, o comportamento ferrimagnético do material foi mantido. Os valores no campo desmagnetizante (campo coercitivo, H_c) praticamente se mantiveram inalterados. Isso é muito importante, pois indica que o revestimento não compromete o magnetismo das amostras.

Todos os parâmetros magnéticos (magnetização de saturação - M_s , magnetização remanente - M_r , campo

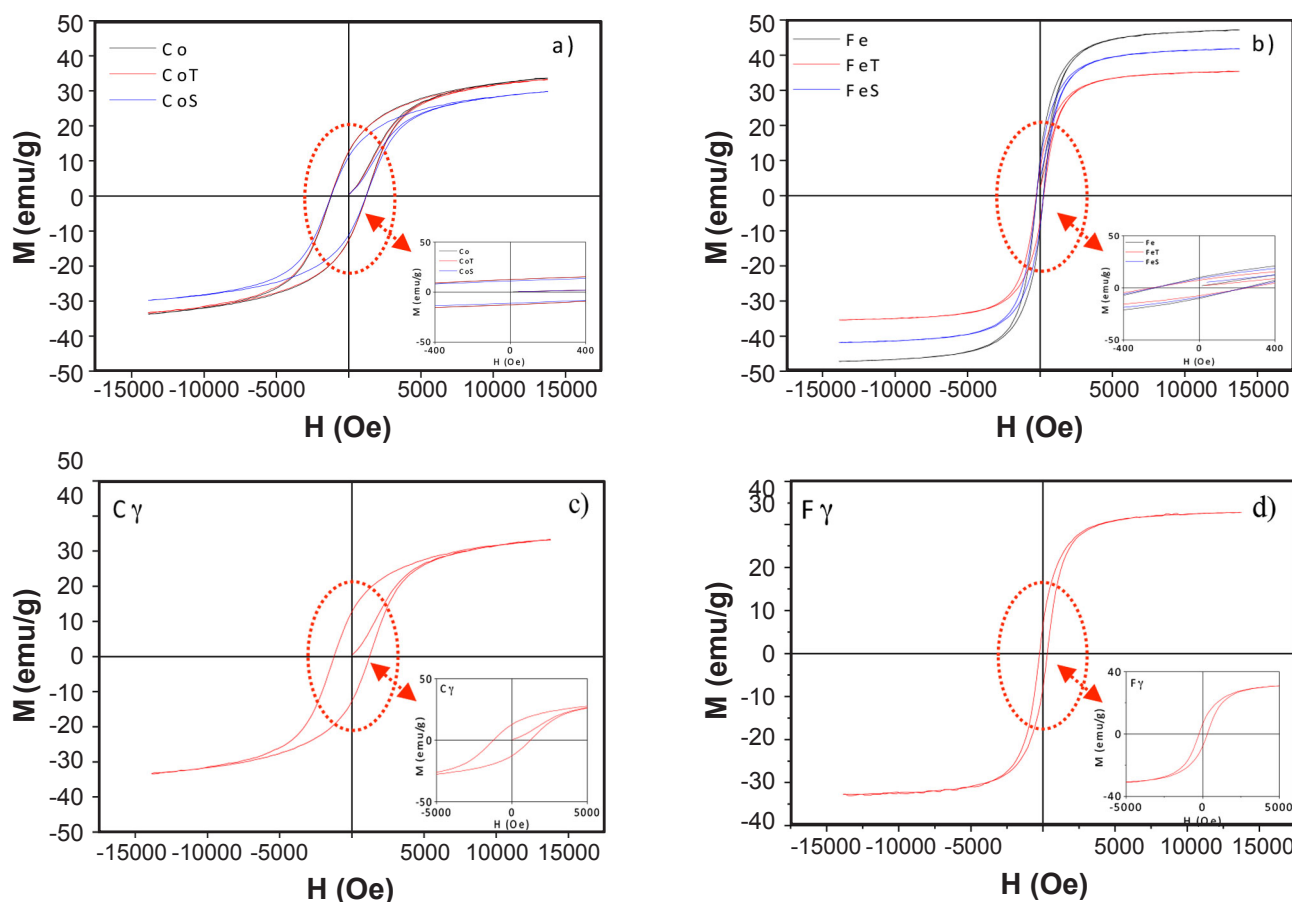


Figura 7: Curvas de histerese magnética para amostras: a) CoFe_2O_4 (Co), $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{TEOS}$ (CoT), $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (CoS); b) Fe_3O_4 (Fe), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TEOS}$ (FeT) e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (FeS); e carreadores: c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (C γ), d) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (F γ).

[Figure 7: Magnetic hysteresis curves for samples: a) CoFe_2O_4 (Co), $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{TEOS}$ (CoT), $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (CoS); b) Fe_3O_4 (Fe), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TEOS}$ (FeT), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (FeS); and drug carriers: c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (C γ), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (F γ).]

Tabela IV - Parâmetros magnéticos (magnetização de saturação - Ms, magnetização remanente - Mr, campo coercivo - Hc) das amostras preparadas.

[Table IV - Magnetic parameters (saturation magnetization - Ms, remanent magnetization - Mr, coercive field - Hc) of the prepared samples.]

Amostra	Ms (emu/g)	Mr (emu/g)	Hc (Oe)	Mr/Ms
Co	33,65	12,55	1200,2	0,37
CoT	29,78	11,13	1216,7	0,37
CoS	33,23	12,71	1231,0	0,38
C γ	30,00	11,00	1216,0	0,37
Fe	47,15	9,95	234,4	0,21
FeT	41,84	8,88	242,2	0,21
FeS	35,40	7,47	252,9	0,21
F γ	32,90	7,013	260,3	0,21

NPMs: Co - CoFe_2O_4 ; CoT - $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{TEOS}$; CoS - $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$; Fe - Fe_3O_4 ; FeT - $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TEOS}$; FeS - $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$. Carreadores de fármaco: C γ - $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$; F γ - $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.

coercivo - Hc) determinados a partir da curva de M x H (magnetização em função do campo aplicado) estão descritos para todas as amostras na Tabela IV. Com base nestes resultados, observou-se que tanto o Fe_3O_4 quanto o CoFe_2O_4 em estudo, mesmo após o revestimento com o TEOS e APTS precursores do SiO_2 e os carreadores de fármaco obtidos C γ e F γ , mantiveram suas características magnéticas. Porém o carreador F γ obtido com o Fe_3O_4 apresentou magnetização de saturação de 8,81% superior ao carreador C γ obtido com o CoFe_2O_4 . Neste sentido, observou-se que o revestimento das NPMs proporcionou a obtenção de uma superfície biocompatível com alta hidrofiliabilidade decorrente da presença de grupos -Si-O-, que permite a inserção de grupos hidrófilos funcionais, tais como amina e hidroxila, que apresentam elevada afinidade com a água e podem interagir com as espécies biológicas, tais como enzimas, proteínas, aminoácidos, DNA e fármacos. É importante ressaltar ainda que altos valores de magnetização de saturação é um dos pré-requisitos para maximizar a eficiência de segmentação de nanopartículas usando um campo magnético externo. Considerando as análises magnéticas, observou-se que todas as NPMs possuíram propriedades magnéticas suficientes

para exibir uma resposta magnética suficientemente alta para direcionar as partículas conjugadas ao fármaco em um local específico no corpo, sendo adequado para aplicação como carreador de fármaco.

CONCLUSÕES

As partículas de Fe_3O_4 e CoFe_2O_4 foram sintetizadas com sucesso e associadas ao TEOS e APTS formando híbridos $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (*core-shell*), indicando que a técnica de reação de combustão foi favorável à obtenção de material reproduzível. Pelo DRX observou-se a presença da fase principal da magnetita para o sistema $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ e do carreador $\text{F}\gamma$ e ferrita de cobalto para o sistema $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ e do carreador $\text{C}\gamma$; em ambos os casos observaram-se traços da segunda fase da hematita. A obtenção dos híbridos foi confirmada pela presença das bandas características da sílica ($-\text{Si}-\text{O}-$) que permitiu a conjugação do fármaco Ciproflonax evidenciada pela presença de bandas características do fármaco, comprovando a eficiência da obtenção dos carreadores $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2:\gamma$ ($\text{C}\gamma$) e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2:\gamma$ ($\text{F}\gamma$). Por meio da distribuição granulométrica observou-se que os sistemas obtidos com o Fe_3O_4 apresentaram diâmetro de partícula superiores aos sistemas formados com o CoFe_2O_4 . Morfológicamente, tanto os sistemas obtidos com o Fe_3O_4 quanto com o CoFe_2O_4 apresentaram aglomerados de tamanho e formato irregulares. Magneticamente observou-se que os sistemas obtidos com o CoFe_2O_4 e o Fe_3O_4 , sem e após modificação de superfície e os carreadores, apresentaram um comportamento típico de materiais ferrimagnéticos, com formação de histerese bem definida, onde o carreador $\text{F}\gamma$ obtido com o Fe_3O_4 apresentou magnetização de saturação 8,81% superior ao carreador $\text{C}\gamma$ obtido com o CoFe_2O_4 . Considerando as análises magnéticas observou-se que todas as NPMs possuíram propriedades magnéticas suficientes para exibir uma resposta magnética suficientemente alta quando expostas a um campo magnético externo para direcionar as partículas para um local específico no corpo, sendo adequadas para aplicação como carreador de fármaco.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPG-CEMAT), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC).

REFERÊNCIAS

- [1] A. Gnach, A. Bednarkiewicz, *Nano Today* **7** (2012) 532.
- [2] S.R. Bhattarai, B.K.C. Remant, H. Aryal, M.S. Santos, H. Khil, Y. Kim, *Carbohydr. Polym.* **69** (2007) 467.
- [3] S. Naahidi, M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, P. Chen, *J. Control. Release* **166** (2013) 182.
- [4] B.K. Sodipo, A.A. Abdul, *J. Magn. Magn. Mater.* **416** (2016) 275.
- [5] K.-J. Lee, J.-H. An, J.-S. Shin, D.-H. Kim, H.-S. Yoo, C.-K. Cho, *Curr. Appl. Phys.* **11** (2011) 467.
- [6] W.-S. Lee, Y.-C. Chen, H.-P. Chen, T.-H. Chen, C.-Y. Cheng, *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **49** (2016) 600.
- [7] J. Singh, M. Srivastava, P. Kalita, B.D. Malhotra, *Process Biochem.* **47** (2012) 2189.
- [8] J.H. Ryu, S. Hong, H. Lee, *Acta Biomater.* **27** (2015) 101.
- [9] S. Sundar, R. Mariappan, S. Piraman, *Powder Technol.* **266** (2014) 321.
- [10] G. Soon, B. Pinguan-Murphy, K.W. Lai, S.A. Akbar, *Ceram. Int.* **42** (2016) 12543.
- [11] X. Liu, J.Y. Lim, H.J. Donahue, R. Dhurjati, A.M. Mastro, E.A. Vogler, *Biomaterials* **28** (2007) 4535.
- [12] S. Shekar, A.J. Smith, J. William, M.M. Kraft, W. Wagner, *Comput. Chem. Eng.* **43** (2012) 130.
- [13] A. Ananth, G. Arthanareeswaran, H. Wang, *Desalination* **287** (2012) 61.
- [14] S.R. Jain, K.C. Adiga, V.P. Verneker, *Flame* **40** (1981) 71.
- [15] A.C.F.M. Costa, R.H.G.A. Kiminami, “Dispositivo para produção de nanomateriais cerâmicos em larga escala por reação de combustão e processo contínuo de produção dos nanomateriais”, *Rev. Propr. Ind., INPI, Patente n° BR 10 2012 002181-3*, dep. 25/01/2012.
- [16] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **26** (1968) 62.
- [17] S. Sadighian, K. Rostamizadeh, H. Hosseini-Monfared, M. Hamidi, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **117** (2014) 406.
- [18] K. Nadeem, H. Krenn, W. Sarwar, M. Mumtaz, *Appl. Surf. Sci.* **288** (2014) 677.
- [19] C.I. Covaliu, I. Jitaru, G. Paraschiv, E. Vasile, S. Biriş, L. Diamandescu, V. Ionita, H. Iovu, *Powder Technol.* **237** (2013) 415.
- [20] T.C.P. França, B.B. Dantas, K.M.S. Viana, P.T.A. Santos, A.C.F.M. Costa, *Mater. Sci. Forum* **798-799** (2014) 460.
- [21] R.-Y. Hong, J.-H. Li, S.-Z. Zhang, H.-Z. Li, Y. Zheng, J.-M. Ding, D.-G. Wei, *Appl. Surf. Sci.* **255** (2009) 3485.
- [22] J. Majeed, L. Pradhan, R.S. Ningthoujam, R.K. Vatsa, D. Bahadur, A.K. Tyagi, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **122** (2014) 396.
- [23] W. Pon-on, N. Charoenphandhu, I.-M. Tang, P. Jongwattapanisan, N. Krishnamra, R. Hoonsawatf, *Mater. Chem. Phys.* **131** (2011) 485.
- [24] A.C.F.M. Costa, N.L. Freitas, K.M.S. Viana, in: *Cerâm. Magn. Aplic. Proc. Quím. Ênf. Biodies.* **22** (2015) 519.
- [25] R.C. O’Handley, *Modern magnetic materials-principles and applications*, John Wiley Sons, New York (1942) 129. (*Rec. 25/11/2017, Rev. 02/03/2018, Ac. 08/03/2018*)