



## **Desenvolvimento de recheio de filtro a base de celulose microcristalina funcionalizada com nanopartículas de prata para desinfecção da água**

**Ana Cristina Exterkoetter<sup>1</sup>, Luciano André Deitos Koslowski<sup>2</sup>, Cristiane Jost<sup>3</sup>,  
Lara Martholly Di Martos<sup>4</sup>, André Lourenço Nogueira<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>UNIVILLE (engenheira.ace@gmail.com); <sup>2</sup>UDESC (lucianoandre@yahoo.com); <sup>3</sup>UFSC (cristiane.jost@gmail.com); <sup>4</sup>UFSC (laramartholly@gmail.com); <sup>5</sup>UNIVILLE (nogueira.a.l@hotmail.com)

### **Resumo**

Vários métodos têm sido estudados como alternativas para desinfecção da água, dentre eles a utilização de metais como a prata, principalmente na sua forma nanoestruturada. A incorporação dessas nanopartículas em algum substrato é indispensável para que sua aplicação como meio filtrante para desinfecção da água seja eficiente. Este trabalho teve como objetivo sintetizar nanopartículas de prata usando o aminoetil-aminopropil-trimetoxissilano (AES) como estabilizante e agente de acoplamento para incorporar estas nanoestruturas em partículas de celulose microcristalina objetivando o uso destas como recheio de filtro para uso na desinfecção da água. Entre as diferentes quantidades de AES avaliadas, a de 10,8 mmol.L<sup>-1</sup> foi a que resultou na maior concentração de nanopartículas de prata, com a menor dispersão de tamanhos e melhor estabilidade coloidal ao longo do tempo. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram que as nanopartículas sintetizadas com esta concentração de AES apresentaram geometria tendendo à esférica, e tamanho médio próximo a 5,0 nm. A funcionalização da celulose com as nanopartículas de prata foi comprovada por análises de microscopia eletrônica de varredura com efeito de campo (MEV-FEG), espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de massa com plasma induzido acoplado (ICP-MS). Ensaio de microbiológicos mostraram que o recheio de filtro produzido apresentou excelente atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Desinfecção de água, Nanopartículas de Prata, Micropartículas de Celulose.

Área Temática: Tecnologias Ambientais

## **Development of filter filling based on microcrystalline cellulose functionalized with silver nanoparticles for water disinfection**

### **Abstract**

*Several methods have been studied as alternatives for water disinfection. Among them, the use of metals such as silver, mainly in its nanostructured form have gained great attention. The incorporation of these nanoparticles in a substrate is indispensable to be applied as an antibacterial filter medium for water disinfection. This work aimed to synthesize silver nanoparticles using the (aminoethyl-aminopropyl-trimethoxysilane (AES) as stabilizer and coupling agent to incorporate these nanostructures onto the microcrystalline cellulose particles. In this way, such functionalized natural particles as an antibacterial filter filling*



*capable to disinfect water. Among the different amounts of AES tested, the concentration of 10.8 mmol.L<sup>-1</sup> resulted in a higher concentration of silver nanoparticles with smaller dispersion of sizes, and better colloidal stability along the time. Transmission electron microscopy (TEM) images revealed that the nanoparticles synthesized with this concentration of AES presented a geometry tending to spherical and an average size close to 5.0 nm. The functionalization of the cellulose microparticles with silver nanoparticles was confirmed by field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and induced coupled plasma mass spectrometry with (ICP-MS). Microbiological tests showed that the produced filter filling had an excellent antibacterial activity.*

*Key words: Water Disinfection, Silver Nanoparticles, Cellulose Microparticles.*

*Theme Area: Environmental Technologies*

## 1 Introdução

A preocupação com a qualidade da água potável vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, fator este vinculado ao aumento significativo da poluição mundial. Estudos vêm sendo realizados para viabilizar a utilização de tecnologias alternativas no tratamento da água para consumo. Neste contexto, destaca-se o emprego de agentes oxidantes em diversos processos químicos, tais como: ozônio, cloroaminas, dióxido de cloro, iodo, bromo e peróxido de hidrogênio.

A ação biocida das nanopartículas de prata, assim como a de outros óxidos metálicos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, deve-se principalmente à sua alta reatividade (SOUZA, 2007). Estudos realizados por Melaiye *et al.* (2004) mostraram que o mecanismo de ação dos íons Ag<sup>+</sup> contra a bactéria Gram-negativa *E.coli* inibe a cadeia respiratória, interferindo diretamente na replicação do DNA da bactéria e inativando as proteínas celulares.

Para que as nanopartículas de prata possam ser utilizadas na desinfecção da água, é necessária sua incorporação em algum substrato. A celulose, em especial, é um composto natural, biodegradável, renovável, atóxico e ecologicamente correto, o que a torna atrativa para uso no desenvolvimento de recheios filtros com propriedades antibacterianas e apelo de sustentabilidade.

O presente trabalho apresenta uma proposta para o desenvolvimento de um recheio de filtro, constituído por micropartículas de celulose funcionalizadas com nanopartículas de prata, visando seu uso na desinfecção de água para o consumo. Para isso, nanopartículas de prata foram sintetizadas empregando um aminosilano para atuar como agente estabilizante e agente de acoplamento destas nanoestruturas na superfície de micropartículas de celulose.

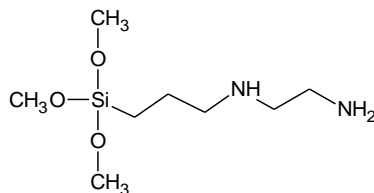
## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Síntese das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram preparadas utilizando-se nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>, Cennabras, pureza > 99 %) como sal precursor, o aminoetil-aminopropil-trimetoxissilano (AES, Xiameter OFS-6020, Dow Corning, 70-90 % m) como agente estabilizante, e o borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>, Cinética, P.A.) como agente redutor dos íons metálicos (Ag<sup>+</sup>). Na Figura 1 é apresentada a estrutura química da molécula de AES. Todos os reagentes foram utilizados conforme recebidos, sem purificação prévia.



Figura 1 – Estrutura química do AES (3-(2-aminoetilaminopropil)timetoxisilano).



Inicialmente, o  $\text{AgNO}_3$  (0,0157g) e o agente estabilizante (AES) foram adicionados em água deionizada (90 mL), e mantidos sob agitação durante 48 horas (600 rpm,  $20^\circ\text{C}$ ). Diferentes concentrações do AES (2,7; 5,4; 10,8 e  $21,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) foram utilizadas para avaliar a sua influência sobre a estabilidade coloidal e propriedades morfológicas das nanoestruturas. As sínteses foram conduzidas sob agitação de 600 rpm e temperatura de  $20^\circ\text{C}$  em um reator de 100 mL fabricado em vidro boro-silicato, conectado a um banho termocriostático para controlar a temperatura do meio reacional.

A solução de  $\text{NaBH}_4$  (10 mL com concentração de  $0,46 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), preparada no momento da síntese e mantida em banho de gelo, foi adicionada à solução de nitrato de prata e estabilizante (AES) a uma vazão de aproximadamente  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$  por meio de uma bureta graduada de vidro. Após o término da dosagem da solução do agente redutor, o sistema foi mantido sob agitação por mais 30 minutos para garantir o consumo de todos os reagentes.

Ao término da síntese, cerca de 10 mL da dispersão coloidal produzida foi armazenada em frascos de cor âmbar para posterior caracterização. O restante foi destinado à funcionalização da celulose microcristalina. Todas as reações foram feitas em triplicata a fim de comprovar sua reprodutibilidade.

## 2.2 Caracterização das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram caracterizadas por espectrofotometria de UV-Vis (Shimadzu UV – 1601PC) para avaliar as propriedades ópticas de absorbância da luz. Estas análises foram conduzidas ao longo do tempo para avaliação da estabilidade da dispersão coloidal ao longo do tempo. Para isso, as amostras foram diluídas em água deionizada na razão de 1:7 (v/v) e, em seguida, submetidas a leituras de absorção em uma cubeta de vidro com caminho óptico de 10 mm.

Com o propósito de avaliar a forma geométrica e estimar o tamanho médio e a dispersão de tamanhos das nanopartículas, análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram conduzidas em um microscópio JEOL JEM-2100 operando com tensão de 200 kV. Para esta análise, 10 gotas da dispersão coloidal concentrada foram gotejadas em *grids* de cobre de 300 *mesh* recobertos com filme de carbono.

## 2.3 Funcionalização da celulose microcristalina

Após a síntese, 1,0 g das micropartículas de celulose microcristalina (Blanver, com diâmetro médio de  $200 \mu\text{m}$ ) foi adicionada em 10, 20 e 100 mL de dispersão coloidal sob agitação de 700 rpm por 1 hora. Estas suspensões foram mantidas em repouso até a decantação das micropartículas de celulose, até que o sobrenadante apresentasse coloração transparente. A celulose funcionalizada foi seca em estufa ( $50^\circ\text{C}$  por 24 horas) e curada a  $120^\circ\text{C}$  por 180 minutos.

## 2.4 Caracterização da Celulose

A celulose microcristalina foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) para visualização da dispersão das nanoestruturas de prata na superfície das micropartículas de celulose. Para estas análises, variou-se a razão entre



o volume da dispersão de prata coloidal e a massa de celulose microcristalina (10, 20 e 100 mL.g<sup>-1</sup>), mantendo fixa a concentração de AES utilizada na síntese (10,8 mmol.L<sup>-1</sup>). Desta forma, foi possível obter partículas de celulose contendo três concentrações distintas de nanopartículas de prata.

Análises de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas para identificação dos grupos funcionais presentes na celulose funcionalizada que comprovassem a ocorrência das ligações químicas entre as nanopartículas de prata e o substrato celulósico. As análises de FTIR foram conduzidas antes e depois da cura para se avaliar a influência desta etapa na adsorção química das nanopartículas de prata na superfície das micropartículas de celulose. Estas análises foram realizadas em um equipamento da PerkinElmer, utilizando o método de Reflexão Total Atenuada (ATR), com 32 varreduras de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>.

Análises de espectrometria de massa com fonte de plasma induzido acoplado (ICP-MS) foram realizadas no equipamento Optima 8300 da marca PerkinElmer, para quantificação da prata incorporada na superfície da celulose microcristalina. Para avaliar a influência da quantidade de nanopartículas de prata na estabilidade térmica do recheio de filtro produzido, Análises Termogravimétricas (TGA) da celulose funcionalizada foram conduzidas.

## 2.5 Avaliação da Atividade Bacteriana

Os testes de avaliação da atividade antibacteriana das micropartículas de celulose funcionalizadas com as nanopartículas de prata foram realizados com base na norma ASTM E2149 – “Determinação da Atividade Antimicrobiana de Agentes Antimicrobianos sob Condições de Contatos Dinâmicos”. A bactéria Gram negativa *Escherichia coli* e a Gram positiva *Staphylococcus aureus* foram selecionadas para os ensaios pelo fato destas bactérias estarem diretamente relacionadas aos problemas de saúde gerados pelo consumo de água contaminada.

O teste antibacteriano foi realizado diluindo-se a solução de inóculo até se atingir uma leitura de absorbância de  $0,28 \pm 0,01$  em 475 nm. A amostra foi submetida a diluição seriada até se alcançar uma diluição de  $1,5 - 3,0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Para se avaliar a eficiência antibacteriana micropartículas de celulose funcionalizadas com as nanopartículas de prata produzidas, outras três amostras foram preparadas em Erlenmeyers diferentes, cada uma contendo 50 mL do inóculo e distintas massas de celulose funcionalizada com nanopartículas de prata (0,039; 0,024 e 0,0078 g). As amostras foram agitadas em *shaker* por até 20 minutos a uma temperatura controlada em 37 °C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a técnica de diluição seriada para que se pudesse ter uma quantidade de colônias na placa de Petri factível de ser contada. Em triplicatas, alíquotas de 0,1 mL foram espalhadas sobre a superfície do ágar nas placas de Petri, com auxílio de uma alça triangular de vidro Drigalski, até a completa absorção.

## 3 Resultados e Análise dos Resultados

As imagens de MET foram processadas no software aberto *ImageJ* para estimar as características de tamanho das nanopartículas de prata (diâmetro médio e distribuição de tamanho das partículas – DTP). As nanopartículas obtidas a partir das sínteses conduzidas com diferentes concentrações de AES apresentaram uma geometria tendendo à esférica, e tamanhos médios menores que 9 nm.

Na Tabela 1 são apresentados os diâmetros médios e seus respectivos desvios padrão das nanopartículas produzidas com distintas concentrações de AES. Estes resultados corroboram com aqueles reportados por Zhang *et al.* (2013) e Nogueira *et al.* (2014), nos quais



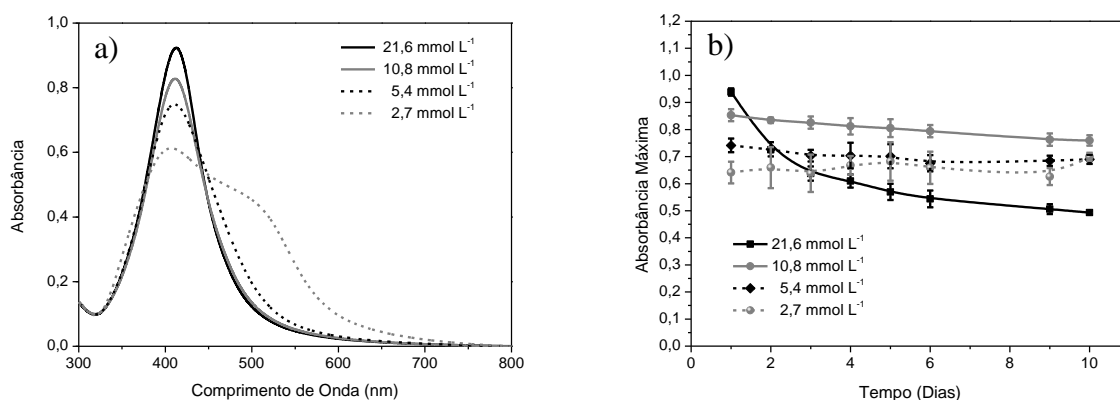
os autores observaram que quanto maior a concentração do estabilizante empregado na síntese, menores tendem a ser os tamanhos das nanopartículas formadas.

Tabela 1 – Diâmetro médio e desvio padrão das nanopartículas de prata sintetizadas com diferentes concentrações de AES.

| [AES]<br>(mmol.L <sup>-1</sup> ) | Diâmetro<br>Médio (nm) | Desvio<br>Padrão<br>(nm) |
|----------------------------------|------------------------|--------------------------|
| 2,7                              | 8,1                    | ± 5,3                    |
| 5,4                              | 5,8                    | ± 2,6                    |
| 10,8                             | 5,4                    | ± 2,5                    |
| 21,6                             | 5,3                    | ± 1,9                    |

Na Figura 2a são apresentados os espectros de absorvância obtidos logo após a realização das sínteses conduzidas com as quatro concentrações do estabilizante AES (2,7, 5,4, 10,8 e 21,6 mmol.L<sup>-1</sup>). Na Figura 2b são apresentados os resultados das absorvâncias máximas medidas ao longo do tempo, com seus respectivos desvios padrão obtidos a partir das triplicatas dos experimentos.

Figura 2 – Resultados de espectrofotometria de UV-Vis das nanopartículas de prata produzidas com diferentes concentrações de AES: a) espectros de absorvância obtidos logo após a realização das sínteses (primeiro dia); b) absorvância máxima ao longo de 10 dias.



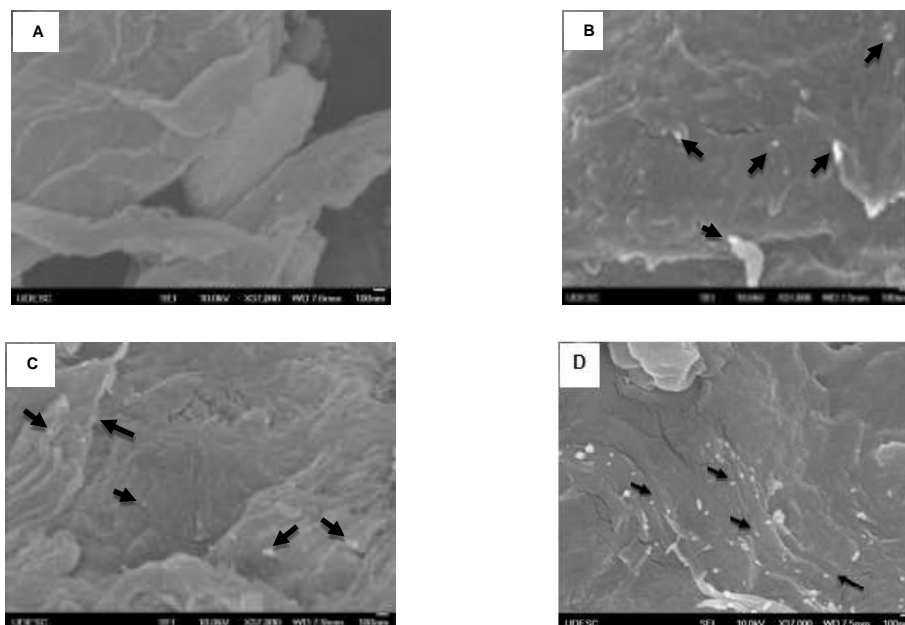
Conforme os resultados apresentados na Figura 2a (espectros medidos logo após as sínteses), percebe-se que o aumento da concentração de AES levou à obtenção de espectros com maiores picos de absorvância de luz. Os resultados mostrados na Figura 2b permitem avaliar, através da absorvância máxima, a estabilidade da dispersão de prata coloidal ao longo tempo produzidas com diferentes concentrações de AES. A partir destes resultados, verificou-se que a concentração de AES de 10,8 mmol.L<sup>-1</sup> foi a que resultou na melhor estabilidade coloidal ao longo do tempo e na maior concentração de nanopartículas. Por esta razão, as nanopartículas de prata sintetizadas com 10,8 mmol.L<sup>-1</sup> de AES foram selecionadas para serem incorporadas nas micropartículas de celulose.

Análises de MEV-FEG foram realizadas para as amostras de celulose funcionalizadas com as distintas quantidades de nanopartículas de prata visando identificar a presença e a dispersão das mesmas na superfície das micropartículas de celulose (Figura 3). Nas imagens mostradas nas Figuras 3b, 3c e 3d, verifica-se a presença de pontos mais claros que sugerem a presença das nanopartículas de prata, uma vez que materiais metálicos tendem a apresentar fluorescência quando submetidos ao feixe de elétrons durante análise de MEV-FEG (DEDAVID, 2007).





Figura 3 – Análises MEV-FEG variando as proporções entre o volume da dispersão de prata coloidal e a massa de celulose microcristalina: a) celulose pura - P0:1 (0 mL.g<sup>-1</sup>); b) P10:1 (10 mL.g<sup>-1</sup>); c) P20:1 (20 mL.g<sup>-1</sup>); d) P100:1 (100 mL.g<sup>-1</sup>).



O processo de mistura dos reagentes por 48 horas antes da síntese (AgNO<sub>3</sub>, AES e água deionizada) é de extrema importância, pois o contato entre o aminosilano e a água permite que ocorra a reação de hidrólise dos grupos metoxisilano (Si-O-CH<sub>3</sub>) contidos no AES para formar os grupos reativos silanol (Si-OH) (Grasset *et al.*, 2003, Matinlinna *et al.*, 2006). Na presença de superfícies ricas em hidroxilas (OH), como é o caso da celulose, os grupos silanol sofrem uma reação de condensação, o que resulta na ligação entre a molécula do aminosilano com a superfície da celulose (Si-O-C). Como as nanopartículas de prata encontram-se ligadas aos átomos de nitrogênio dos grupos funcionais amina do AES por ligações de coordenação (Fantini *et al.*, 2005), as mesmas acabam sendo quimicamente incorporadas na superfície da celulose, o que faz com que o AES atue como um agente de acoplamento entre a nanop prata e a celulose.

As análises de (FTIR) foram conduzidas buscando identificar as ligações químicas entre o substrato (celulose) e as nanopartículas formadas, tendo o aminosilano AES como molécula ligante (Figura 4). A partir dos espectros, percebe-se a presença das bandas que representam picos característicos da celulose e 3338 (O-H), 2892 (C-H), 1388 (CH<sub>2</sub>) e 1030 (C-O-C) cm<sup>-1</sup>. A existência de picos em aproximadamente 1246 e 1257 cm<sup>-1</sup> podem significar a ligação Si-O-C (Huang *et al.*, 2014) formada entre o aminosilano e a celulose.

Análises de ICP-MS foram conduzidas com o objetivo de identificar a quantidade de nanopartículas de prata presente em cada amostra. As amostras de celulose funcionalizada selecionadas para esta análise foram aquelas preparadas com distintas proporções entre o volume da dispersão de prata coloidal e a massa de celulose (10:1, 20:1 e 100:1 mL.g<sup>-1</sup>), contendo nanopartículas de prata sintetizadas com diferentes concentrações do AES (5,4, 10,8 e 21,6 mmol.L<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos podem ser verificados na Tabela 2. De acordo com estes resultados, o uso da concentração de AES de 10,8 mmol.L<sup>-1</sup> resultou nos maiores valores de nanop prata incorporada por massa de celulose. Já o uso da maior concentração de AES (21,6 mmol.L<sup>-1</sup>) foi o que resultou na menor quantidade de nanop prata incorporada por massa de celulose. Este resultado é mais evidente para as amostras de celulose funcionalizadas produzidas na proporção de 100:1 entre o volume de prata coloidal e a massa de celulose.



Figura 4 – Espectros de FTIR das amostras de celulose pura e funcionalizadas, secas a temperatura ambiente e curada em estufa: a) espectros completos, b) ampliação para visualização das bandas de ligação na região entre 600 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

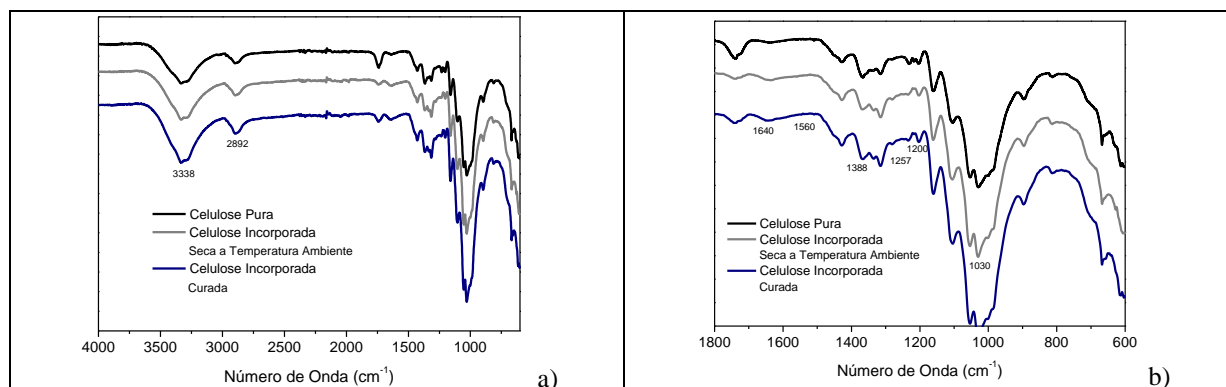


Tabela 2 – Quantidade de prata incorporada nas amostras de celulose funcionalizada.

| Amostra       | Quantidade de prata na celulose ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) |
|---------------|--|
| P100:1 – 5,4  | $5,35 \pm 0,6$   |
| P100:1 – 10,8 | $6,44 \pm 0,8$   |
| P100:1 – 21,6 | $1,79 \pm 0,4$   |
| P20:1 – 5,4   | $1,69 \pm 0,5$   |
| P20:1 – 10,8  | $1,87 \pm 0,1$   |
| P20:1 – 21,6  | $1,65 \pm 0,1$   |
| P10:1 – 5,4   | $0,68 \pm 0,2$   |
| P10:1 – 10,8  | $1,10 \pm 0,2$   |
| P10:1 – 21,6  | $0,80 \pm 0,0$   |

As análises de atividade antibacteriana foram realizadas para a amostra com maior proporção entre o volume de dispersão de prata coloidal e a massa de celulose (100:1  $\text{mL.g}^{-1}$ ), e a melhor concentração de AES constatada pelas análises mostradas nesse trabalho (10,8  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). As concentrações de nanopartículas de prata selecionadas para se proceder com a avaliação de atividade antibacteriana foi de 5 ppm, 3 ppm e 1 ppm. Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL para a *Escherichia coli*, observou-se que em ambos os tratamentos (3 ppm e 5 ppm), houve uma redução de mais de 98% nos 15 minutos de contato, passando para 100% de redução na concentração 5 ppm em 20 min. de contato. A melhor ação antibacteriana para *Staphylococcus aureus* pode ser observada nas concentrações de 3 e 5 ppm, onde em apenas 20 minutos foi possível eliminar praticamente 100% das bactérias presentes no meio.

#### 4 Conclusão

Nanopartículas de prata foram sintetizadas com sucesso utilizando o aminoetil-aminopropil-trimetoxisilano (AES) como agente estabilizante. Entre as concentrações de AES testadas, a de 10,8  $\text{mmol.L}^{-1}$  foi a que resultou na maior concentração de nanopartículas de prata e maior estabilidade coloidal ao longo do tempo. O uso do AES como agente estabilizante resultou na produção de nanopartículas de prata com forma geométrica tendendo à esférica, e tamanhos médios menores que 9 nm.



A funcionalização das partículas de celulose microcristalina com as nanopartículas de prata foi comprovada inicialmente por observação visual (aquisição de coloração amarronzada pelas micropartículas de celulose, originalmente de cor branca), e depois por análise de MEV-FEG e FTIR.

Os espectros de FTIR apresentam pequenos picos que apontam para a formação da ligação covalente Si-O-C, o que evidencia a incorporação química das nanopartículas de prata por meio de moléculas do aminosilano aminoetil-aminopropil-trimetoxissilano (AES).

Os ensaios microbiológicos comprovaram a ação antibacteriana do recheio de filtro desenvolvido, porém mais estudos necessitam ser realizados para se determinar uma quantidade ótima de recheio em relação ao volume de água contaminada de forma a permitir a construção de um filtro cujo tempo de residência seja adequado para a completa letalidade das bactérias presentes no meio.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia Eletrônica de Varredura: Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Edipucrs – Porto Alegre. p. 13, 2007.

FRATTINI A.; PELLEGRINI N.; NICASTRO D.; SANCTIS O. Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. Mater. Chem. Phys. v. 94, p. 148, 2005.

GRASSET, F.; SAITO N.; LI, D.; PARK, D.; SAKAGUCHI, I.; OHASHI, N.; HANEDA, H.; ROISINEL, T.; MORNET, S.; DUGNET, E. J. Alloys Compd. p. 360, 2003.

HUANG, J.; LI, C.; GRAY, D. Functionalization of cellulose nanocrystal films via “thiolene” click reaction. Royal Soc. of Chem. v. 4, p. 65-69, 2014.

MELAIYE, A. et al. Formation of water-soluble pincer (I) – carbene complexes: A novel antimicrobial agent. J. Medicine Chem. v. 47(4), p. 973-977, 2004.

NOGUEIRA, A. L.; MACHADO, R. A. F.; SOUZA, A. Z.; MARINELLO, F.; FRANCO, C. V.; DUTRA, G. B. Synthesis and characterization of silver nanoparticles produced of a bifunctional stabilizing agent. Ind. & Eng. Chem. Res. v. 53, p. 3426-3434, 2014.

SOUZA, J. D. C. Materiais compósitos biocidas baseados em resinas reticuladas contendo nanopartículas de prata. Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ. p. 16-29, 2007.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, Guidelines for Drinking-Water Quality. WHO Library Cataloguing in Publication Data, 2nd ed, Geneva, 1996.

ZHANG, H.; OYANEDEL-CRAVER, V. Comparison of the bacterial removal performance of silver nanoparticles and a polymer based quaternary amine functionalized silsesquioxane coated point-of-use ceramic water filters. J. Hazard. Mat. v. 260, p. 272-277, 2013.