

Nghiên cứu quy trình biến tính chất hấp phụ sinh học rau ngót (*Sauropus androgynus*) để xử lý ion chì trong nước

Nguyễn Thị Mai¹, Bùi Văn Nhâm¹, Chu Thị Bảo Trân¹, Cao Mẫn Bình¹, Lê Văn Dũng², Vũ Anh Tuấn^{1*}

¹Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bách Khoa, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học Hậu cần Quân sự, Học viện Hậu cần, phường Ngọc Thụy, quận Long Biên, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/9/2024; ngày chuyển phân biện 15/9/2024; ngày nhận phân biện 15/10/2024; ngày chấp nhận đăng 20/10/2024

Tóm tắt:

Rau ngót, tên khoa học là *Sauropus androgynus* (SA) có chứa nhiều hợp chất như cellulose, hemicellulose, lignin và pectin, có khả năng tạo liên kết với các ion kim loại nhờ các nhóm chức như hydroxyl (-OH), carboxyl (-COOH), amit bậc 2 (-CONH), amin (-NH, NH₂). Tuy nhiên, bề mặt lá nguyên bản có ít vị trí hấp phụ. Nghiên cứu đã tiến hành biến đổi bề mặt của SA bằng cách sử dụng dung dịch NaOH để tạo ra một chất hấp phụ sinh học mới mang tên *Sauropus androgynus* biến tính (MSA). Kết quả cho thấy, hiệu suất hấp phụ của MSA đã tăng từ 49,64 lên đến 80% trong 30 phút, khi thực hiện ở điều kiện pH6 với 0,1 g vật liệu và ở nhiệt độ phòng. Để đặc trưng hình thái cấu trúc, nghiên cứu đã tiến hành phân tích mẫu vật bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) và phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR). Quá trình biến đổi bề mặt đã làm thay đổi rõ rệt cấu trúc và khả năng hấp phụ của MSA. Bên cạnh đó, điều kiện tối ưu để biến đổi bề mặt được xác định là nhiệt độ 40°C, thời gian khuấy trộn trong 2 giờ và nồng độ NaOH là 0,1 M. Những kết quả thực nghiệm này không chỉ chứng minh khả năng hấp phụ vượt trội của MSA so với SA mà còn mở ra tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo về việc cải tiến chất hấp phụ sinh học thông qua các kỹ thuật biến đổi bề mặt.

Từ khóa: biến tính bề mặt, chất hấp phụ sinh học, kim loại nặng, rau ngót, rau ngót biến tính.

Chỉ số phân loại: 1.4, 2.4, 2.7

Research on the process of modifying the bio-adsorbent of *Sauropus androgynus* to treat ion heavy metals Pb²⁺ in water

Thi Mai Nguyen¹, Van Nham Bui¹, Thi Bao Tran Chu¹, Man Binh Cao¹, Van Dung Le², Anh Tuan Vu^{1*}

¹School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet Street, Bach Khoa Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

²Military Logistics Scientific Research Institute, Military Academy of Logistics, Ngoc Thuy Ward, Long Bien District, Hanoi, Vietnam

Received 12 September 2024; revised 15 October 2024; accepted 20 October 2024

Abstract:

Sauropus androgynus (SA) leaves contain many compounds such as cellulose, hemicellulose, lignin and pectin, which can form bonds with metal ions thanks to functional groups such as hydroxyl (-OH), carboxyl (-COOH), secondary amides (-CONH), amines (-NH, NH₂). However, the intact leaf surface only provides a few adsorption sites. In this study, the surface of SA leaves was modified with NaOH solution, resulting in a new biological adsorbent referred to as modified *Sauropus androgynus* (MSA). The results showed that the adsorption performance of MSA increased from 49.64 to 80% within 30 min at a pH6, using 0.1 g of material at room temperature. To characterise the structural morphology, the samples were analysed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). The surface modification process significantly changed the structure and adsorption capacity of MSA. In addition, a temperature of 40°C, a stirring time of 2 hours and a NaOH concentration of 0.1 M were determined as optimal conditions for surface modification. These experimental results not only demonstrated that the adsorption capacity of MSA was significantly superior to that of the SA, but also highlighted the further potential studies on the improvement of biological adsorbents through surface modification techniques.

Keywords: bio-adsorbent, heavy metal, modification of *Sauropus androgynus*, *Sauropus androgynus*, surface modification.

Classification numbers: 1.4, 2.4, 2.7

*Tác giả liên hệ: Email: tuan.vuanh@hust.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Ngày nay, sự phát triển mạnh mẽ của các hoạt động kinh tế - kỹ thuật làm cho đời sống con người ngày càng được nâng cao, nhưng mặt trái của nó là thải ra môi trường nhiều chất độc hại. Trong đó, nước thải công nghiệp, vốn là nguồn phát thải mang theo vô số hóa chất độc hại và một hiểm họa mang tên “kim loại nặng”. Nguy hiểm hơn, nước thải chứa kim loại nặng thường được xả trực tiếp ra sông, hồ và đại dương mà không qua xử lý [1, 2]. Các ion kim loại này không thể bị phân hủy hoặc phá hủy và chúng tích tụ trong môi trường ảnh hưởng nghiêm trọng đến hệ sinh thái và sức khỏe con người.

Ion chì (Pb^{2+}) là một trong những ion kim loại nặng phổ biến có trong nước thải. Ô nhiễm chì trong các sông, hồ và suối xảy ra chủ yếu do các hoạt động khai thác, luyện kim, sản xuất ắc quy, sản xuất sơn, đồ gốm sứ, nhựa, mực in. Tính ổn định, độc tính cao và khả năng thay thế các kim loại khác trong enzym người khiến chì trở nên vô cùng nguy hiểm. Theo Tổ chức Y tế Thế giới, nồng độ tối đa cho phép của Pb^{2+} trong nước sinh hoạt là 0,05 mg/l. Khi vượt quá ngưỡng cho phép, nó gây tổn thương hệ tuần hoàn, hệ thống tim mạch, hệ thần kinh và gây ung thư [3].

Hiện nay, có một số phương pháp thường được sử dụng để loại bỏ Pb^{2+} trong nước như trao đổi ion, kết tủa hóa học, thẩm thấu màng và xử lý sinh học được cho là không hiệu quả và tốn kém, đặc biệt, khi xử lý nước thải có nồng độ Pb^{2+} cao [4-6]. Mặt khác, sự hấp phụ đã nổi lên như một giải pháp thay thế tiềm năng cho các công nghệ hóa lý thông thường. Hấp phụ là một quá trình phân tách hiệu quả có ưu điểm về chi phí, thiết kế đơn giản và dễ vận hành [2]. Song thực tế chứng minh rằng, không phải tất cả các chất hấp phụ đều có khả năng loại bỏ Pb^{2+} tốt, và do đó, việc tìm kiếm chất hấp phụ hiệu quả, chi phí thấp, thân thiện môi trường với hiệu suất hấp phụ cao vẫn là một thách thức.

SA thường mọc tự nhiên ở các khu vực nhiệt đới trên toàn thế giới. Một số nghiên cứu cho thấy, lá của cây này có nhiều chất có hoạt tính sinh học như terpenoid, steroid, tannin, phenol, alkaloid, flavonoid, axit béo và dầu dễ bay hơi [7]. Trong số này, có chứa nhiều các nhóm chức như hydroxyl, carboxyl, amit và amin có khả năng liên kết với Pb^{2+} thông qua lực tương tác tĩnh điện và liên kết phối trí. Tuy nhiên, bề mặt lá còn nguyên vẹn, cấu trúc cellulose chặt chẽ, tạo ra ít khoảng trống, lỗ rỗng và khe hở. Để khắc phục những vấn đề này, các biện pháp như sửa đổi chất hấp phụ sinh học thô để tăng cường khả năng phản ứng bề mặt của chúng đã được đề xuất.

Nghiên cứu này tập trung vào khả năng loại bỏ Pb^{2+} bằng việc sử dụng lá SA, được tăng cường hiệu quả hấp

phụ thông qua biến đổi bề mặt bằng natri hydroxit (NaOH). Mẫu vật liệu được chuẩn bị và được đặc trưng bằng SEM và FT-IR. Hiệu suất của vật liệu trước và sau khi biến tính được đo lường bằng cách xử lý Pb^{2+} trong môi trường nước. Quy trình tổng hợp vật liệu được nghiên cứu thông qua việc điều chỉnh nhiệt độ, thời gian khuấy và hàm lượng NaOH sử dụng để biến tính bề mặt.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất

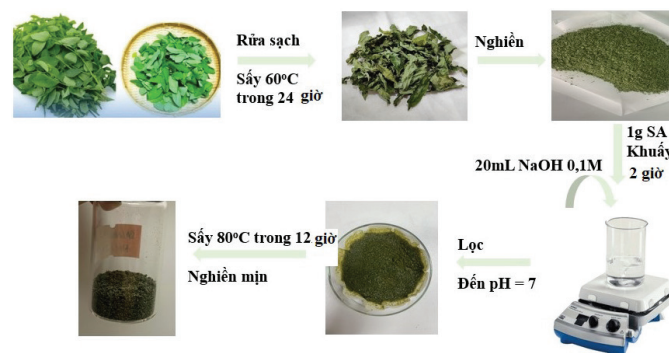
SA được thu mua trong siêu thị Winmart trên địa bàn phố Lê Thanh Nghị, phường Bách Khoa, quận Hai Bà Trưng, TP Hà Nội. Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu này là: chì (II) nitrat ($Pb(NO_3)_2$, 99,5%), sodium hydroxit (NaOH, 96%), sodium acetat trihydrat ($CH_3COONa.3H_2O$, 99%), ammonia (NH_3 , 25-28%), 4-(2-pyridylazo)-rezoxin (PAR, $C_{11}H_8N_3NaO_2.H_2O$, 99%). Nước cất được sử dụng trong suốt quá trình tổng hợp vật liệu và đánh giá khả năng hấp phụ kim loại nặng.

2.2. Các phương pháp đặc trưng vật liệu

Hình thái cấu trúc của các mẫu vật liệu được quan sát bằng SEM (JEOL-7600F). Các liên kết và dao động tương ứng của các mẫu vật liệu được xác định bằng FT-IR (Madison, WI).

2.3. Tổng hợp vật liệu

Lá SA được tuốt, thu gom lại, rửa sạch nhiều lần bằng nước thường và nước cất cho đến khi hết bụi bẩn. Sau đó, mẫu sẽ được sấy ở $60^\circ C$ trong 24 giờ. Cuối cùng, mẫu được đem đi nghiền mịn thủ công bằng cối. MSA được tổng hợp bằng cách cân chính xác 1g SA cho vào cốc có mô chứa 20 ml NaOH và khuấy với tốc độ quay 250 vòng/phút trong 2 giờ để đảm bảo bề mặt rau đã được biến tính đồng đều. Mẫu sau khi biến tính được lọc và rửa bằng nước cất nhiều lần cho đến khi pH bằng 7. Cuối cùng, mẫu được đem đi sấy ở $80^\circ C$ trong 12 giờ, được lưu giữ bảo quản ở lọ khô, sạch, kín cho đến khi sẵn sàng sử dụng (hình 1).



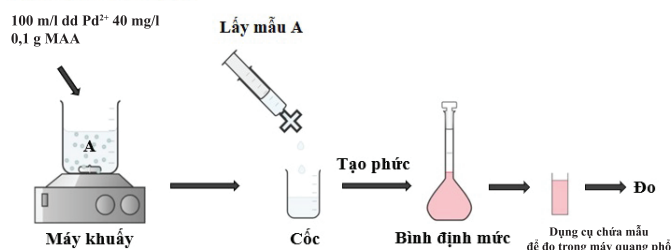
Hình 1. Quy trình tổng hợp vật liệu từ rau ngót biến tính.

2.4. Phương pháp, quy trình đánh giá khả năng hấp phụ của vật liệu

Để đánh giá khả năng hấp phụ Pb^{2+} thì vật liệu đã được tiến hành đo trên máy quang phổ hấp thụ UV-vis NIR Cary 500. Hiệu quả được đánh giá thông qua khả năng hấp phụ Pb^{2+} của vật liệu MSA. Đầu tiên, 0,1g chất hấp phụ MSA được thêm vào cốc có chứa 100 ml dung dịch Pb^{2+} với nồng độ là 40 mg/l và siêu âm cho vật liệu phân tán đều trong dung dịch. Hỗn hợp (A) này được khuấy trộn liên tục, sau những khoảng thời gian nhất định lấy 4-5 ml bằng xylanh ra lọc qua filter, đem đi tạo phức. Bình tạo phức gồm 1 ml dung dịch mẫu Pb^{2+} , 3 ml dung dịch CH_3COONa 0,1 M, 2 ml dung dịch NH_3 0,1 M, 2 ml dung dịch PAR 100 mg/l ở pH=5,5-5,8 và định mức lên 25 ml. Sau khi tạo thành phức $Pb(II)$ -PAR, dung dịch được đem đi phân tích trên thiết bị đo quang phổ UV-Vis ở bước sóng xác định là 520 nm được mô tả ở hình 2 [8]. Hiệu suất hấp phụ của ion kim loại nặng Pb^{2+} được tính theo công thức sau [2]:

$$\%H = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \%$$

trong đó: C_0 và C_t tương ứng là nồng độ kim loại nặng (mg/l) ở thời điểm ban đầu ($t=0$), sau thời gian t (phút).



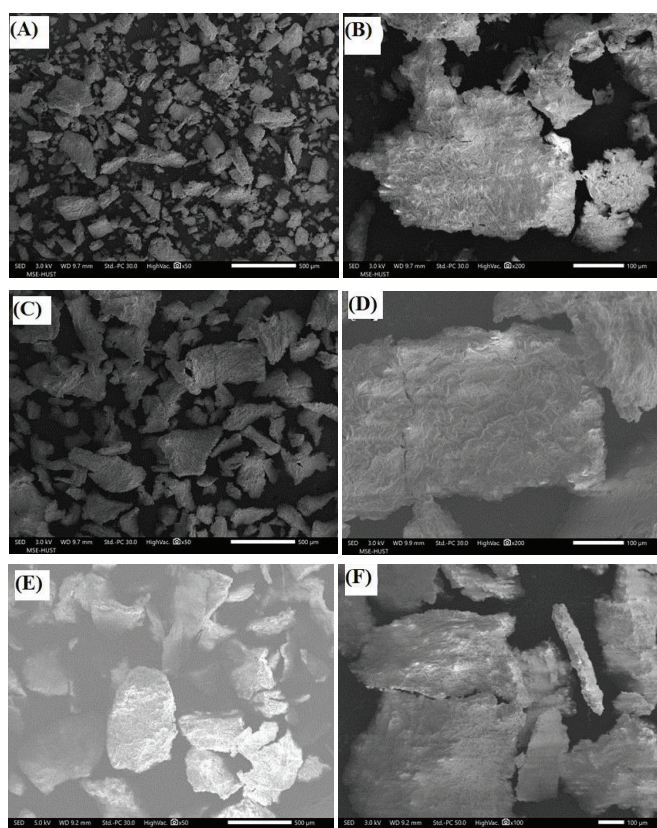
Hình 2. Sơ đồ đánh giá khả năng xử lý kim loại nặng của vật liệu từ rau ngót biến tính.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc trưng của vật liệu

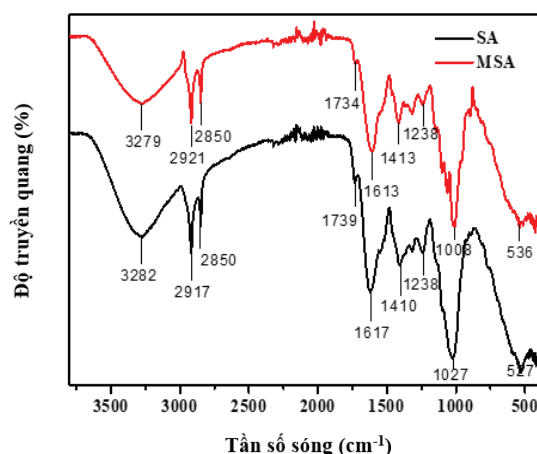
Hình thái cấu trúc bề mặt của vật liệu trước và sau khi biến tính là một trong những đặc trưng rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, ảnh SEM đã được phân tích và kết quả được trình bày trong hình 3.

Trước khi biến tính hình 3 (A, B), bề mặt với cấu trúc không đồng nhất, xếp chồng chéo lên nhau tạo ra ít khoảng trống hấp phụ. Sau khi biến tính hình 3 (C, D), các mảnh vỡ có xu hướng tập hợp lại với nhau thành những mảng lớn có cấu trúc xốp với những nếp gấp đều đặn hơn làm tăng diện tích bề mặt, các vị trí sẵn có để hấp phụ, tạo nhiều cơ hội hơn cho các ion kim loại tương tác và được giữ lại bởi



Hình 3. Ảnh từ kính hiển vi điện tử quét phát xạ ở các độ phóng đại khác nhau để thấy rõ bề mặt của vật liệu: (A, B) Rau ngót; (C, D) Rau ngót biến tính trước khi hấp phụ; (E, F) Rau ngót biến tính sau khi hấp phụ ion chì.

chất hấp phụ sinh học. Sau khi hấp phụ hình 3 (E, F), quan sát thấy sự thay đổi do các vị trí liên kết sau khi tương tác với Pb^{2+} làm bề mặt của chất hấp phụ sinh học trở nên sáng hơn, mịn hơn và độ xốp giảm. Bên cạnh đó, cấu trúc tổng thể không thay đổi, chứng tỏ rằng cấu trúc MSA ổn định sau khi hấp phụ Pb^{2+} .

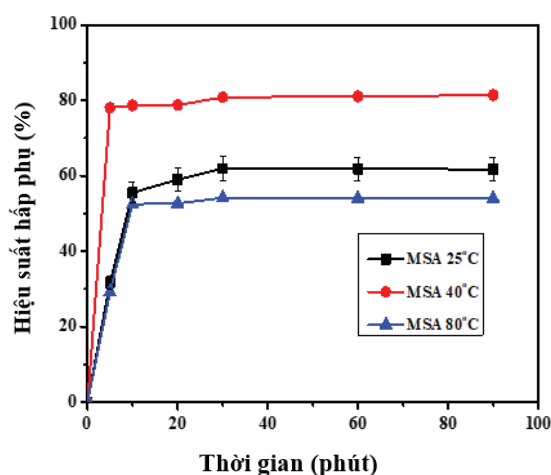


Hình 4. Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier của rau ngót và rau ngót biến tính.

Tiếp theo, liên kết và dao động của mẫu vật liệu được xác định bằng máy FT-IR ở hình 4. Tần số dao động khoảng 3282 cm^{-1} có thể phản ánh nhóm (-OH) kéo dài hoặc (-NH₂, -NH) kéo dài. Dải hấp thụ của nhóm (-OH) trong axit carboxylic rộng do sự tạo liên kết hydro mạnh giữa các phân tử axit, và nó có thể chồng lấn lên dải hấp thụ của nhóm (-NH) trong amit bậc 2. Dải yếu ở 2917 cm^{-1} cho thấy sự có mặt của liên kết (Csp³-H) trong nhóm methyl (-CH₃) [9, 10]. Dao động uốn 1729 cm^{-1} được gán cho liên kết (-C=O) trong nhóm (-COOH) [10, 11]. Cuối cùng, dải dao động trung bình ở 1617 cm^{-1} xác nhận sự tồn tại của liên kết (-C=O), và dải dao động của (C-N) được quan sát ở 1027 cm^{-1} trong amit bậc 2 (-CONH) [12]. Sau khi biến tính bề mặt SA bằng NaOH, xuất hiện những thay đổi nhỏ về tần số dao động được quan sát thấy: các dải kéo dài (-OH) hoặc (-NH), (C-H), (-C=O), (C-N) ở mức 3279 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} , 1613 cm^{-1} , 1008 cm^{-1} . Sự dịch chuyển này cho thấy, sau khi biến tính các nhóm chức này có thể tham gia quá trình hấp phụ ion Pb²⁺ trong nước.

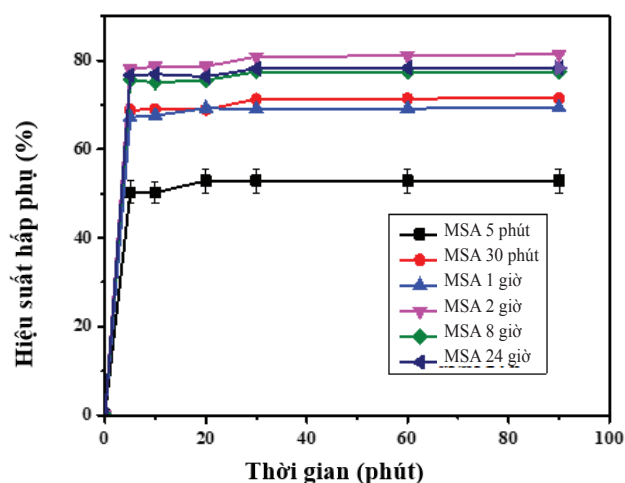
3.2. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình tổng hợp vật liệu

Khảo sát nhiệt độ của quá trình biến tính bề mặt rau ngót: Từ hình 5, kết quả cho thấy 40°C là nhiệt độ tối ưu cho quá trình biến tính. Ở 40°C , tốc độ phản ứng vừa phải đảm bảo quá trình biến tính bề mặt diễn ra một cách ổn định và đồng đều, cung cấp năng lượng để kích thích sự tương tác giữa các phân tử cấu trúc. Ngược lại, ở 80°C , năng lượng cao có thể gây phá vỡ cấu trúc của SA, làm mất đi một số nhóm chức hữu ích. Trong khi đó, ở 30°C , năng lượng không đủ để thúc đẩy quá trình biến tính hiệu quả, dẫn đến tốc độ phản ứng chậm và hiệu quả thấp.



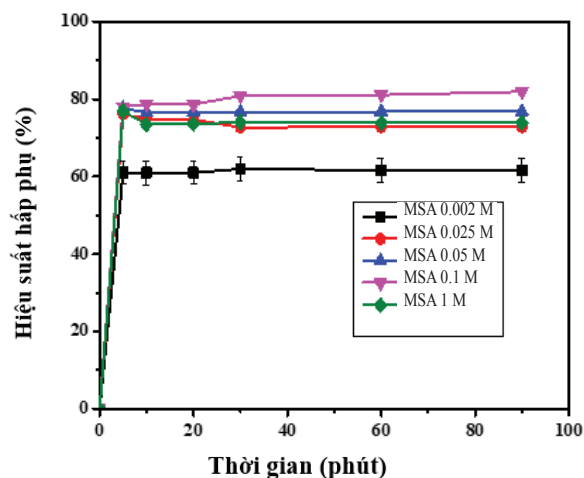
Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ ban đầu.

Khảo sát thời gian khuấy của dung dịch: Hình 6 cho thấy, khuấy trong 2 giờ với tốc độ khuấy 250 vòng/phút là tối ưu, giúp NaOH di chuyển và tiếp xúc đồng đều trên bề mặt SA. Tuy nhiên, nếu khuấy quá lâu, ở 8 giờ hoặc 24 giờ, có thể ăn mòn dẫn đến phá vỡ cấu trúc xốp của bề mặt. Ngược lại, nếu khuấy trong thời gian quá ngắn, quá trình biến tính không đồng đều và kém hiệu quả.



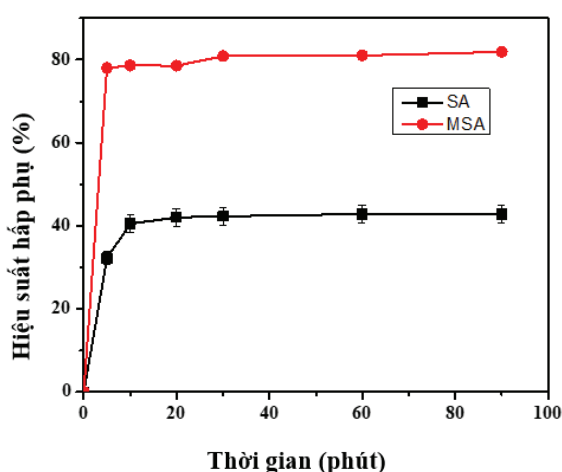
Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian khuấy của dung dịch.

Khảo sát nồng độ NaOH dùng để biến tính: Kết quả hình 7 cho thấy, nồng độ NaOH 0,1 M được xác định là tối ưu để biến tính bề mặt rau ngót, đạt hiệu suất hấp phụ kim loại nặng cao nhất. Nồng độ này đủ để phá vỡ cấu trúc tế bào, tăng diện tích bề mặt và tạo nhiều vị trí hấp phụ kim loại. Tuy nhiên, nồng độ NaOH vượt quá 0,1 M có thể gây ma sát và ăn mòn mạnh, làm mất các nhóm chức hữu cơ hữu ích, trong khi nồng độ thấp hơn không đủ để phá vỡ hoàn toàn cấu trúc bề mặt, dẫn đến ít vị trí hấp phụ và hiệu suất thấp hơn.



Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH dùng để biến tính.

Hiệu suất hấp phụ ion chì của vật liệu trước và sau khi biến tính: Kết quả từ hình 8 cho thấy, sau khi biến tính ở điều kiện tối ưu, hiệu suất hấp phụ tăng từ 49,64 lên 80% sau 30 phút và gần như đạt trạng thái hấp phụ bão hòa sau 60 phút với hiệu suất hấp phụ là 81,93%, ở pH=6, khối lượng vật liệu là 0,1 g, nồng độ Pb^{2+} ban đầu là 40 ppm và nhiệt độ phòng. Quá trình biến tính đã làm bề mặt SA trở nên sạch hơn, loại bỏ các tạp chất và phá vỡ cấu trúc cellulose, tạo ra nhiều lỗ rỗng, khe hở và nếp gấp trên bề mặt. Những thay đổi này cung cấp nhiều điểm hấp phụ hơn, làm cho các nhóm chức trên bề mặt trở nên hoạt động hơn và làm tăng hiệu suất hấp phụ Pb^{2+} .



Hình 8. Hiệu suất hấp phụ ion chì trước và sau khi biến tính bề mặt.

4. Kết luận

Nhìn chung, trong nghiên cứu này đã tổng hợp thành công chất hấp phụ sinh học MSA biến tính bề mặt. Các đặc trưng của vật liệu đã được phân tích, chứng tỏ sau khi biến tính bề mặt có sự thay đổi rõ rệt. Cấu trúc bề mặt xốp với những nếp gấp đều đặn tạo ra nhiều lỗ rỗng, khe hở làm tăng vị trí liên kết với ion kim loại. Quá trình biến tính bề mặt tối ưu nhất ở nhiệt độ dung dịch NaOH ban đầu là 40°C, thời gian khuấy 2 giờ và nồng độ NaOH là 0,1 M. Vật liệu MSA cho thấy hiệu suất hấp phụ cao lên đến trên 80% sau 30 phút hấp phụ. Đây là một vật liệu đầy hứa hẹn, tạo cơ sở cho các nghiên cứu trong tương lai về nâng cao khả năng hấp phụ của kim loại nặng thông qua biến tính bề mặt.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Bộ Giáo dục và Đào tạo tài trợ thông qua đề tài khoa học công nghệ mã số CT2022.04. BKA.01. Các tác giả trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.T. Vu, V.T. Vu (2018), "Preparation of MgO for removal of dyes and heavy metal from aqueous solution: Facially controlling the morphology, kinetic, isotherms and thermal dynamic investigations", *Indian J. Sci. Technol.*, **11(41)**, DOI: 10.17485/ijst/2018/v11i41/131018.
- [2] V.D. Nguyen, V.T. Cuong, T.H. Nguyen, et al. (2024), "Preparation of novel CS/SiO₂-EDTA nanocomposite from ash of rice straw pellets for enhanced removal efficiency of heavy metal ions in aqueous medium", *Journal of Water Process Engineering*, **60**, DOI: 10.1016/j.jwpe.2024.105175.
- [3] M.S. Collin, M.S. Collin, S.K. Venkatraman, et al. (2022), "Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects on human: A review", *Journal of Hazardous Materials Advances*, **7**, DOI: 10.1016/j.hazadv.2022.100094.
- [4] A. Dabrowski, Z. Hubicki, P. Podkościelny, et al. (2004), "Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method", *Chemosphere*, **56(2)**, pp.91-106, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.03.006.
- [5] M.M. Brbooti, B.A. Abid, N.M.A. Shuwaiki (2011), "Removal of heavy metals using chemicals precipitation", *Eng. Technol. J.*, **29(3)**, pp.595-612.
- [6] Y. Cui, Q. Ge, X.Y. Liu, et al. (2014), "Novel forward osmosis process to effectively remove heavy metal ions", *Journal of Membrane Science*, **467**, pp.188-194, DOI: 10.1016/j.memsci.2024.05.034.
- [7] B.D. Zhang, J.X. Cheng, C.F. Zhang, et al. (2020), "*Sauropus androgynus* L. Merr.-A phytochemical, pharmacological and toxicological review", *Journal of Ethnopharmacology*, **257**, DOI: 10.1016/j.jep.2020.112778.
- [8] L.Q. Vo, A.T. Vu, T.D. Le, et al. (2024), "Fe₃O₄/graphene oxide/chitosan nanocomposite: A smart nanosorbent for lead (II) ion removal from contaminated water", *ACS Omega*, **9(15)**, pp.17506-17517, DOI: 10.1021/acsomega.4c00486.
- [9] C.W. Chieng, N.A.H.M. Zaidi, N. Priyantha, et al. (2021), "Adsorption characteristics of sauropus androgynus and its base modified form toward cationic crystal violet dye", *Desalination Water Treatment*, **210**, pp.446-460, DOI: 10.5004/dwt.2021.26576.
- [10] F.S. Parker (1971), "Amides and amines", *Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology, and Medicine*, Springer, pp.165-172.
- [11] K.I. Takei, R. Takahashi, T. Noguchi (2008), "Correlation between the hydrogen-bond structures and the CO stretching frequencies of carboxylic acids as studied by density functional theory calculations: Theoretical basis for interpretation of infrared bands of carboxylic groups in proteins", *The Journal of Physical Chemistry*, **112(21)**, pp.6725-6731, DOI: 10.1021/jp801151k.
- [12] F. Secundo, N. Guerrieri (2005), "ATR-FT/IR study on the interactions between gliadins and dextrin and their effects on protein secondary structure", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **53(5)**, pp.1757-1764, DOI: 10.1021/jf049061x.