



Ingeniería Científica
Bionanomolecular, S.A. de C.V.



Micropipeta Classic



Contacto:
Conmutador (33)36288333
Visite nuestra página web <http://icb.mx>
E-mail atencionclientes@icb-mx.com

Manual de
Usuario

TABLA DE CONTENIDO:

1. Descripción del Producto	1
2. Pantalla Digital	1
3. Materia Prima	1
4. Operación de la Micropipeta	2
5. Expulsión de la Punta	2
6. Técnica de Pipeteo	3
7. Técnica Directa	4
8. Técnica Inversa	5
9. Técnica Repetitiva	6
10. Pipeteo de Muestras Heterogéneas	6
11. Calibración y Ajuste	7
12. Requisitos del Dispositivo y Condiciones de Prueba	7
13. Ajuste	10
14. Inexactitud (Error Sistemático)	12
15. Mantenimiento	13
16. Servicio a Corto Plazo	13
17. Servicio a Largo Plazo	13
18. Optimización del Rendimiento	18
19. Esterilización	19
20. Solución de Problemas	19
21. Paquete	21
22. Precaución	22

1. Descripción de producto

Las pipetas ICB CLASSIC son pipetas de uso general continuamente ajustables, utilizadas para la toma y dispensado de muestras de forma exacta y precisa. Funcionan con el principio de desplazamiento de aire (es de decir hay una interfaz de aire entre el pistón y el reactivo/solución) y utiliza una punta desechable. El volumen deseado es determinado por la siguiente fórmula:

$$V = \pi r^2 h$$

Donde

V = Volumen deseado

π = contante (3.14)

r = radio

h = distancia vertical recorrida por el émbolo

Las micropipetas de canal simple cubren un rango de 0.2 μ l a 10ml

Las pipetas multicanal cubren un rango de 0.5 μ l a 300 μ l

2. Pantalla digital

Las pipetas de un solo canal y las multicanal ofrecen pantallas digitales fáciles de leer.



Figura 2.1

3. Materia prima

Los instrumentos están fabricados de un material mecánicamente durable y autoclavable.

4. Operación de la micropipeta

Ajustando el volumen

No.	Rango de micropipetas de volumen variable	Rango de micropipetas de volumen fijo
1	Ajuste el volumen en el botón de la parte superior de la micropipeta.  Para incrementar el volumen de entrega gire el botón en el sentido contrario de las manecillas del reloj. Para disminuir el volumen gire en el sentido de las manecillas del reloj.	No disponible.
2	Asegúrese de que el volumen de entrega deseado encaje en su lugar. 	No disponible.
3	No establezca un volumen que quede fuera del rango de volumen especificado de la micropipeta.	No disponible.

Tabla 1.

Utilizar fuerza excesiva al cambiar el rango en el botón forzando a salirse de su rango puede provocar atascos y eventualmente daños permanentes en su pipeta.

5. Expulsión de la Punta

Cada pipeta viene equipada con un botón eyector de puntas que ayuda a eliminar el riesgo de contaminación al usuario. Para eyectar la punta coloque la pipeta en un receptáculo de desechos y oprima el botón eyector de puntas con su pulgar.



Figura 5

6. Técnica de pipeteo

Instrucciones generales

1. Oprima y suelte el botón de forma suave todo el tiempo, especialmente cuando trabaje con reactivos/ soluciones de alta viscosidad. Asegúrese de que el embolo no se rompa.

2. Asegúrese de que la punta esta firmemente colocada en el cono de la pipeta. Verifique que no tenga partículas extrañas la punta.



Figura 6.1

Verificar que no haya partículas externas en la punta

3. Antes de empezar su experimento, llene y vacíe la punta 2-3 veces con el reactivo o solución de trabajo que utilizara.

4. Coloque la pipeta en una posición vertical mientras toma la muestra, el agarre debe de descansar sobre su dedo índice.



Figura 6.2

5. Asegúrese de que tanto las puntas, micropipeta y el reactivo/solución de trabajo este a la misma temperatura.

7. Técnica Directa

1. Para aspirar el líquido de la punta, oprima el embolo al primer tope. Sumerja la punta de la pipeta de forma vertical en el líquido.



Figura 7.1

2. Despacio libere el embolo mientras la punta permanece sumergida en la muestra. El líquido sera aspirado hacia la punta de la pipeta.



Figura 7.2

3. Para dispensar el líquido coloque la punta contra la pared interna del recipiente contenedor en forma de angulo.



Figura 7.3

4. Despacio oprima el émbolo hasta el primer tope para dispensar el líquido.



Figura 7.4

5. Para vaciar por completo oprima el émbolo hasta el segundo tope.

6. Limpie la punta en la pared interior mientras la saca del recipiente contenedor.

8. Técnica Inversa

La técnica inversa es adecuada para dispensar reactivos/soluciones que tienen una alta viscosidad o una tendencia a formar espuma fácilmente. También se recomienda para dispensar volúmenes muy pequeños.

1. Para aspirar el líquido en la punta, presione el émbolo hasta la segunda parada e inserte la punta de la pipeta verticalmente en el líquido.



Figura 8.1

2. Suelte lentamente el émbolo mientras la punta está sumergida. El líquido será aspirado en la punta de la pipeta.

3. Para dispensar el líquido, coloque la punta en la pared interna del tubo en un ángulo pronunciado.

4. Presione lentamente el émbolo hasta la primera parada.

5. Limpie la punta en la pared interna mientras retira la punta del recipiente.

Nota: El líquido residual permanece en la punta. Esto no pertenece al volumen dispensado.

9. Técnica Repetitiva

La técnica repetitiva ofrece un procedimiento rápido y simple para la entrega repetida del mismo volumen.

1. Llene un depósito de reactivo/solución limpio con el líquido a dispensar.

2. Presione el botón hasta la segunda parada. Consulte la Fig. 8.1.

3. Sumerja la punta bajo la superficie superior del reactivo/solución en el depósito, hasta una profundidad de aproximadamente 1 cm. Suelte lentamente el botón. Esta acción llenará la punta.

4. Retire la punta del reactivo/solución. Deje que toque el borde del depósito para eliminar el exceso de reactivo/solución.

5. Dispense el reactivo/solución presionando suavemente el botón hasta la primera parada. Mantenga el botón en la primera parada. Algo de líquido permanecerá en la punta y esto no debe incluirse en la entrega.

6. Continúe pipeteando repitiendo los pasos 3 y 4.

10. Pipeteo de Muestras Heterogéneas

Spongamos que tenemos que determinar la desproteinización en la glucosa sanguínea.

1. Use los pasos 1 y 2 de la técnica directa para llenar la punta con sangre. Limpie cuidadosamente la punta con un paño seco y limpio.

2. Inserte la punta en el reactivo/solución y presione el botón hasta la primera parada, asegurándose de que la punta esté bien por debajo de la superficie.

3. Suelte el botón lentamente para que vuelva a la posición de lista. Esto llenará la punta. Mantenga la punta en la solución. Presione hasta la primera parada y suelte lentamente. Siga repitiendo este procedimiento hasta que la pared interior de la punta esté limpia.

4. Finalmente, presione el botón hasta el fondo para vaciar completamente la punta.

11. Calibración y Ajuste

- Todas las micropipetas están calibradas de fábrica y ajustadas para dar el volumen especificado con agua destilada o desionizada, utilizando la técnica de pipeteo directo.

- Debe tenerse en cuenta que el uso de otras técnicas de pipeteo puede afectar los resultados de la calibración. Las micropipetas están construidas para permitir el reajuste para otras técnicas de pipeteo o soluciones/reactivos de diferentes temperaturas y viscosidades.

12. Requisitos del Dispositivo y Condiciones de Prueba

Use una balanza analítica. El valor de graduación de la balanza debe elegirse de acuerdo con el volumen de prueba seleccionado de la micropipeta.

Rango de Volumen Legible

Graduación abajo de 10 μl	0.001 mg
Graduación abajo de 100 μl	0.01 mg
Graduación arriba de 100 μl	0.1 mg

El líquido de prueba es agua destilada o desionizada "grado 3", conforme a ISO 3696. Todas las pruebas se realizan en una sala sin corrientes de aire a una temperatura constante ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) del agua, la pipeta y el aire entre 15°C y 30°C . La humedad relativa debe ser superior al 50%. Para volúmenes inferiores a 50 μl , la humedad del aire debe ser lo más alta posible para reducir el efecto de evaporación. Se recomiendan accesorios especiales, como la trampa de evaporación.

Pipeteo de Muestras Heterogéneas

1. Repita el paso de pipeteo 10 veces con el volumen mínimo.

2. Nuevamente, repita el paso de pipeteo 10 veces con el volumen máximo.

3. Calcule la inexactitud (A) y la imprecisión (CV) para ambos casos.

4. Compare el resultado con los límites dados en la tabla.

5. Si los resultados calculados están dentro de los límites seleccionados, los ajustes de la micropipeta son correctos.

Micropipetas de Volumen Variable de Canal Único

Rango μl	Vol. μl	Inexactitud $\pm\%$	Inexactitud $\pm\mu\text{l}$	Imprecisión $\pm\%$	Imprecisión $\pm\mu\text{l}$
0.2-2.0	2	2	0.04	1.2	0.024
0.5-10	10	1	0.1	0.5	0.05
2-20	20	0.8	0.16	0.4	0.08
5-50	50	0.8	0.4	0.4	0.2
10-100	100	0.6	0.6	0.2	0.2
20-200	200	0.6	1.2	0.2	1.4
100-1000	1000	0.6	6	0.2	2
500-5000	5000	0.6	30	0.2	10
1000-10000	10000	0.6	60	0.2	20

Tabla 2.

Pipetas de Volumen Fijo de Canal Único

Vol. μl	Inexactitud $\pm\%$	Inexactitud $\pm\mu\text{l}$	Imprecisión $\pm\%$	Imprecisión $\pm\mu\text{l}$
1	5	0.05	5	0.05
2	4	0.08	2	0.04
3	2	0.1	1	0.05
10	1	0.1	0.5	0.05
20	0.8	0.16	0.4	0.08
25	0.8	0.2	0.4	0.1
50	0.8	0.4	0.4	0.2
100	0.6	0.6	0.2	0.2
200	0.6	1.2	0.2	1.4
250	0.6	1.5	0.2	1.5
500	0.6	3	0.2	1
1000	0.6	6	0.2	2
2000	0.6	12	0.2	4
5000	0.6	30	0.2	10
10000	0.4	40	0.2	20

Tabla 3.

Pipetas Multicanal

Rango μl	Vol. μl	Inexactitud $\pm\%$	Imprecisión $\pm\%$
0.5-10		16	10
		3.2	2
	10	1.6	1
2-20	2	8	4
	10	1.6	0.8
	20	0.8	0.4
5-50		8	4
	25	1.6	0.8
	50	0.8	0.4
10-100	10	8	3
	50	1.6	0.6
	100	0.8	0.3
20-200	20	8	
	100	1.6	0.6
	200	0.8	0.3
40-300	40	8	3
	150	1.6	0.6
	300	0.8	0.3

Tabla 4.

13 Ajuste

El ajuste se realiza con una herramienta de servicio.

1. Coloque la herramienta de servicio en las aberturas de la tuerca de calibración en la parte superior del mango.



Figura 13.1

2. Gire la herramienta de servicio en el sentido de las agujas del reloj para aumentar el volumen o en sentido contrario para disminuir el volumen.



Figura 13.2

3. Después del ajuste, verifique la calibración según las instrucciones dadas en la sección anterior.

Fórmula para calcular resultados

- Conversión de masa a volumen: $V = (w + e) \times Z$ donde,

V = volumen (μL),
 w = peso (mg),
 e = pérdida por evaporación (mg),
 Z = factor de conversión para $\mu\text{L}/\text{mg}$.

- La pérdida por evaporación puede ser significativa con volúmenes bajos. Para determinar la pérdida de masa, dispense agua en el recipiente de pesaje.

Tome la lectura y comience un cronómetro.

Observe cuánto disminuye la lectura en 30 segundos (por ejemplo, 6 mg = 0.2 mg/s).

Compare esto con el tiempo de pipeteo desde el tara hasta la lectura. Típicamente, el tiempo de pipeteo podría ser de 10 segundos y la pérdida de masa de 2 mg (10 s x 0.2 mg/s) en este ejemplo.

Si se utiliza una trampa de evaporación o una tapa en el recipiente, la corrección de la evaporación generalmente no es necesaria. El factor Z es para convertir el peso del agua; su valor es 1.0032 $\mu\text{L}/\text{mg}$ a 22°C y 95 kPa. Consulte la tabla de conversión.

Temp. °C	Presión (kPa)						
	80	85	90	95	100	101.3	105
15	1.0017	1.0018	1.0019	1.0019	1.002	1.002	1.002
15.5	1.0018	1.0019	1.0019	1.002	1.002	1.002	1.0021
16	1.0019	1.002	1.002	1.0021	1.0021	1.0021	1.0022
16.5	1.002	1.002	1.0021	1.0021	1.0022	1.0022	1.0022
17	1.0021	1.0022	1.0022	1.0022	1.0023	1.0023	1.0023
17.5	1.0022	1.0022	1.0023	1.0023	1.0024	1.0024	1.0024
18	1.0022	1.0023	1.0023	1.0024	1.0025	1.0025	1.0025
18.5	1.0023	1.0024	1.0024	1.0025	1.0025	1.0026	1.0026
19	1.0024	1.0025	1.0025	1.0026	1.0026	1.0027	1.0027
19.5	1.0025	1.0026	1.0026	1.0027	1.0027	1.0028	1.0028
20	1.0026	1.0027	1.0027	1.0028	1.0028	1.0029	1.0029
20.5	1.0027	1.0028	1.0028	1.0029	1.0029	1.003	1.003
21	1.0028	1.0029	1.0029	1.003	1.0031	1.0031	1.0031
21.5	1.003	1.0031	1.0031	1.0031	1.0032	1.0032	1.0032
22	1.0031	1.0032	1.0032	1.0032	1.0033	1.0033	1.0033
22.5	1.0032	1.0033	1.0033	1.0033	1.0034	1.0034	1.0034
23	1.0033	1.0034	1.0034	1.0034	1.0035	1.0035	1.0036
23.5	1.0034	1.0035	1.0035	1.0036	1.0036	1.0036	1.0037
24	1.0035	1.0036	1.0036	1.0037	1.0037	1.0038	1.0038

Temp. °C	Presión (kPa)						
	80	85	90	95	100	101.3	105
24.5	1.0037	1.0038	1.0038	1.0038	1.0039	1.0039	1.0039
25	1.0038	1.0039	1.0039	1.0039	1.004	1.004	1.004
25.5	1.0039	1.004	1.004	1.0041	1.0041	1.0041	1.0042
26	1.004	1.0041	1.0041	1.0042	1.0042	1.0043	1.0043
26.5	1.0042	1.0043	1.0043	1.0043	1.0044	1.0044	1.0044
27	1.0043	1.0044	1.0044	1.0045	1.0045	1.0045	1.0046
27.5	1.0045	1.0046	1.0046	1.0046	1.0047	1.0047	1.0047
28	1.0046	1.0047	1.0047	1.0047	1.0048	1.0048	1.0048
28.5	1.0048	1.0048	1.0048	1.0049	1.0049	1.005	1.005
29	1.0049	1.005	1.005	1.005	1.0051	1.0051	1.0051
29.5	1.0051	1.0051	1.0051	1.0052	1.0052	1.0052	1.0052
30	1.0052	1.0053	1.0053	1.0053	1.0054	1.0054	1.0054

Tabla 5.

14 Inexactitud (Error Sistemático)

La inexactitud es la diferencia entre el volumen dispensado y el volumen seleccionado de una pipeta.

$$A = V - V_o$$

donde,
 A = Precisión
 V = Volumen Medio
 V_o = Volumen Nominal

La inexactitud puede expresarse como un valor relativo:

$$A\% = 100o/oxA/V_o$$

Imprecisión (Error Aleatorio)

La imprecisión se refiere a la repetibilidad del pipeteo. Se expresa como la desviación estándar (s) o el coeficiente de variación (CV).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}{n-1}}$$

donde,

S = Desviación Estándar

V = Volumen Medio

n = Número de mediciones

La reproducibilidad o coeficiente de variación (CV) puede expresarse como:

$$CV = 100\% \times S/V$$

15 Mantenimiento

- Cuando la micropipeta no esté en uso, asegúrese de que se almacene en una posición vertical.
- Recomendamos un soporte para este propósito.

16 Servicio a Corto Plazo

- Se debe revisar la micropipeta al comienzo de cada día en busca de polvo y suciedad en la superficie exterior. Se debe prestar especial atención al Cono de la Punta.
- No se deben usar otros solventes excepto etanol al 70% para limpiar la micropipeta.

17 Servicio a Largo Plazo

- Si la micropipeta se usa diariamente, debe revisarse cada tres meses.
- El procedimiento de mantenimiento comienza con su desmontaje.

Desmontaje

(Para Rango de Volumen Variable de Canal Único de 0.2 µL a 200 µL y Micropipetas de Volumen Fijo)

1. Presione el botón eyector de la punta y tire del eyector para sacarlo.



Figura 17.1

2. Gire el cono de la punta en sentido antihorario para desenroscarlo.



Figura 17.2

3. Fije la herramienta de servicio en el asiento de la junta tórica y gire en sentido horario para abrir. Saque el asiento de la junta tórica y gire el cono de la punta al revés para recuperar la junta tórica.



Figura 17.3

4. Limpie el cono de la punta.
5. Lubrique las piezas limpiadas con un lubricante, preferiblemente grasa de silicona.

Reensamblaje

(Para Rango de Volumen Variable de Canal Único de 0.2 μ L a 200 μ L y Micropipetas de Volumen Fijo)

1. Coloque la junta tórica en el cono de la punta y atornille el asiento de la junta tórica con la ayuda de una herramienta de servicio.



Figura 17.4

2. Coloque el resorte en el pistón y deslícelo dentro del cono de la punta.



Figura 17.5

3. Atornille el Cono de la Punta ensamblado en la carcasa principal.



Figura 17.6

4. Deslice el eyector de punta sobre el Cono de la Punta.



Figura 17.7

5. Presione para ajustar el eyector de punta.



Figura 17.8

Desmontaje

(Para Micropipetas de Volumen Variable y Volumen Fijo de Canal Único en los rangos de 0.5-5 ml y 1-10 ml)

1. Tire de la parte inferior del eyector para desengancharlo de la parte superior.



Figura 17.9

2. Desenrosque el Cono de la Punta de la carcasa principal.



Figura 17.10

3. El Cono de la Punta está en dos partes; la parte inferior se puede desenroscar de la parte superior para exponer el pistón.



Figura 17.11

4. Lubrique las piezas limpiadas con un lubricante, preferiblemente grasa de silicona.



Figura 17.12

Reensamblaje

(Para Micropipetas de Volumen Variable y Volumen Fijo de Canal Único en los rangos de 0.5-5 ml y 1-10 ml)

1. Vuelva a atornillar la parte inferior del Cono de la Punta en la parte superior del Cono de la Punta.



Figura 17.13

2. Ahora coloque y vuelva a atornillar el eje del resorte en la carcasa de la pipeta alineando la parte superior del eyector de punta con el pasador del eyector.



Figura 17.14

3. Presione firmemente la parte superior del eyector en el pasador del eyector.



Figura 17.15

4. Presione firmemente la parte inferior del eyector.



Figura 17.16

18 Optimización del Rendimiento

Actividad	Acción
Técnica consistente	Pipetee con un ritmo, presión y velocidad consistentes.
Tamaño y ajuste de la punta	Utilice el tamaño adecuado de la punta, colocada firmemente en el cono de la punta
Pre-enjuague de las puntas	Pre-enjuague las puntas de la pipeta para mejorar la precisión
Aspiración de la muestra	Mantenga la punta desechable sumergida en el líquido durante la aspiración. No deje que el émbolo vuelva bruscamente a la posición inicial
Profundidad de Inmersión	Mantenga una profundidad de inmersión de 2 a 4 mm
Muestras viscosas	Aspire lentamente. Si se observan burbujas, vuelva a muestrear. Pueden ocurrir errores de volumen. Consulte la sección de Calibración
Muestras ácidas	No se recomienda pipetear ácidos fuertes y soluciones corrosivas. Estos líquidos pueden dañar el pistón y el sello.
Muestras con alta presión de vapor	No se recomienda pipetear soluciones con alta presión de vapor. Estos líquidos pueden dañar el pistón y el sello
Temperatura de la muestra	Los fluidos a una temperatura diferente de aquella para la que la pipeta y las puntas de pipeta han sido calibradas pueden resultar en errores de medición de volumen
Almacenamiento	Almacene en posición vertical en un soporte. No coloque la pipeta de lado con líquido en la punta. El líquido que alcanza el pistón causa contaminación y posible corrosión
Limpieza del pistón	Limpie el pistón con alcohol y un paño suave sin pelusa. Séquelo y lubrique ligeramente el pistón.
Controles de rendimiento	Verifique la exactitud y precisión de su pipeta cada 3-6 meses, dependiendo del uso y de las muestras aspiradas

Tabla 6.

19 Esterilización

- Las micropipetas pueden ser esterilizadas en autoclave a 121°C (252°F) a 2 ata durante un mínimo de 20 minutos.
- No se necesita una preparación especial.
- Puede utilizar bolsas de esterilización a vapor si es necesario. Después de la esterilización en autoclave, la micropipeta debe enfriarse a temperatura ambiente durante al menos dos horas. Antes de pipetear, asegúrese de que el instrumento esté seco.
- Recomendamos verificar la calibración después de cada ciclo de esterilización para lograr la mejor precisión y exactitud posible.

20 Solución de Problemas

La tabla a continuación enumera posibles problemas y sus soluciones.

Micropipetas de Canal Único

Problema	Posible Razón	Acción Propuesta
Sale líquido de la punta de la pipeta	La punta de la pipeta no se fija correctamente en la punta	Utilice la punta adecuada para la punta de escape
	El líquido que se pipetea está caliente o frío. El líquido que se pipetea es muy denso o viscoso	Acorte la cantidad de tiempo que el líquido permanece en la punta, o la posible solución es utilizar el modo inverso de pipeteo
	La junta tórica de sellado de la pipeta está desgastada	Reemplace la junta tórica de sellado
	La punta no está llena para mantener el sello	Presione la punta con más firmeza. (Evite usar demasiada fuerza e insertar demasiado la punta)
La cantidad de muestra entregada no es exacta	La pipeta no cumple con las especificaciones de calibración	Vuelva a calibrar la pipeta según el manual de operación
	Técnica de pipeteo incorrecta	Técnica de pipeteo incorrecta

Tabla 7.

Micropipetas Multicanal

Problema	Posible Razón	Acción Propuesta
Sale líquido de la punta de la pipeta	La punta de la pipeta no se fija correctamente en la punta	Utilice la punta adecuada para la punta de escape
	El líquido que se pipetea está caliente o frío. El líquido que se pipetea es muy denso o viscoso	Acorte la cantidad de tiempo que el líquido permanece en la punta, o la posible solución es utilizar el modo inverso de pipeteo
	Partículas extrañas entre la punta y el cono	Limpie el cono para puntas con un paño sin pelusa y coloque puntas nuevas
La punta no está llena para mantener el sello	La punta no está llena para mantener el sello	Presione la punta con más firmeza. (Evite usar demasiada fuerza e insertar demasiado la punta)
		La cantidad de muestra entregada no es exacta
La cantidad de muestra entregada no es exacta	La pipeta no cumple con las especificaciones de calibración	Vuelva a calibrar la pipeta según el manual de operación
	Técnica de pipeteo incorrecta	Técnica de pipeteo incorrecta

Tabla 8.

21 Paquete

Las micropipetas se envían en paquetes especialmente diseñados que contienen los siguientes elementos.

Micropipetas de Canal Único

1. La Micropipeta



Figura 21.1

2. Herramienta de Servicio



Figura 21.2

3. Muestra de Puntas



Figura 21.3

4. Certificado de Calibración



Figura 21.4

5. Colgador de Estante



Figura 21.5

6. Manual de Operación

Micropipetas Multicanal

1. La Micropipeta



Figura 21.6

2. Herramienta de Servicio (Fig. 21.2)

3. Muestra de Puntas



Figura 21.7

4. Certificado de Calibración (Fig. 21.4)

5. Colgador de Estante (Fig. 21.5)

6. Canaleta para Reactivos



Figura 21.8

7. Manual de Operación

22 Precaución

Las micropipetas están diseñadas para permitir un fácil servicio en el laboratorio. Si prefiere que nosotros o su representante local realicemos el servicio de su instrumento, asegúrese de que haya sido descontaminado antes de enviárnoslo. Tenga en cuenta que las autoridades postales de su país pueden prohibir o restringir el envío de material contaminado por correo.