

Aceptación de fórmulas extensamente hidrolizadas en el tratamiento de la alergia a la proteína de leche de vaca

Acceptance of extensively hydrolysed formulas in treatment for cow's milk protein allergy

PROF. LIC. KABBACHE DIANA MIRIAM¹, LIC. BATISTA MARIANA LAURA¹, LIC. HERRERA JAVIER²,
LIC. KETELHOHN BELÉN³, PROF. LIC. OLAGNERO GABRIELA FABIANA³.

¹Universidad de Buenos Aires y Universidad del Salvador. ²Centro de Altos Estudios en Ciencias Exactas. ³Nutricia Research. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Correspondencia: Diana Miriam Kabbache. diana.kabbache@gmail.com

Resumen

Introducción: la sintomatología de la alergia a la proteína de leche de vaca conlleva deterioro en el crecimiento y aumento concomitante de las necesidades nutricionales. En niños que consumen fórmula como complemento a la lactancia materna o cuando ésta no es posible, debe indicarse como primera opción una fórmula con proteína extensamente hidrolizada (FeH). Es necesaria una ingesta adecuada para revertir síntomas y recuperar crecimiento. Sin embargo, los lactantes rechazan frecuentemente las FeHs debido al gusto desagradable.

Objetivo: evaluar sensorialmente cinco FeH presentes en el mercado, en orden decreciente de aceptación y relacionarlo con ingredientes responsables del sabor.

Materiales y Método: se realizó un testeo sensorial ciego en cinco FeH (A, B, C, D y E) en población universitaria. Los 54 participantes fueron entrenados previamente sobre la metodología de testeo y la forma de completar el cuestionario en estaciones individuales. Las fórmulas fueron calificadas con puntaje del 1 al 5 (más aceptable – menos aceptable) y la preferencia se analizó por prueba de Rangos de Wilcoxon (nivel de significación 0,025).

Resultados: según el puntaje de aceptación, las fórmulas quedaron ordenadas de la siguiente manera: E, D, A, C, B; de la más aceptable a menos aceptable. La fórmula E fue la "preferida", aunque no presentó diferencias significativas con D, A, C y B mostraron una baja aceptación significativa con respecto a E y D. El análisis de ingredientes mostró mayor aceptación para hidrolizados de suero con presencia de lactosa y/o jarabe de glucosa y grasa saturada. El nivel de hidrólisis y los péptidos resultantes serían factores determinantes en la aceptación.

Conclusión: la resultante de las combinaciones de ingredientes y su estructura química podrían ser responsables de mejor sabor o mayor aceptación de las FeH, facilitando la recuperación nutricional del lactante y la adherencia al tratamiento.

Palabras clave: proteína de leche de vaca, fórmula hidrolizada, aceptación, hidrolizados de suero.

Abstract

Introduction: symptoms coming from allergy to cow's milk protein may impair a child's growth as well as concomitant increase in nutritional needs. In children consuming formula as a supplement to breastfeeding or when breastfeeding is not possible, a formula with extensively hydrolyzed protein (eHF) should be indicated as first option. Adequate intake is necessary to reverse symptoms and regain growth. However, infants frequently reject eHFs due to unpleasant taste.

Objective: to sensorially evaluate five eHFs present in the market, in decreasing order of acceptance, and relate them to ingredients responsible for taste.

Materials and Methods: blind sensory testing was performed on five eHFs (A, B, C, D and E) in university population. The fifty-four participants were previously trained on testing methodology and how to complete the questionnaire in individual stations. Formulas were scored from 1 to 5 (more acceptable - less acceptable) and preference was analyzed by Wilcoxon Range test (significance level 0.025).

Results: based on acceptance score, formulas remained ordered as follows: E, D, A, C, B; from most acceptable to least acceptable. Formula E was the "preferred" one, although it did not show significant differences with D, A, C and B showed a significant low acceptance with respect to E and D. Ingredients analysis showed greater acceptance for whey hydrolysates with presence of lactose and/or glucose syrup and saturated fat. Level of hydrolysis and resulting peptides would be determining factors in acceptance.

Conclusion: combinations of ingredients and their chemical structure could be responsible for better taste or greater acceptance of eHFs, facilitating the nutritional recovery of the infant and adherence to treatment.

Keywords: cow's milk protein, hydrolysed formula, acceptance, whey hydrolysate.

Diaeta (B.Aires) 2018; 36(165):22-27. ISSN 0328-1310

Declaración de conflicto de intereses: las Lic. Ketelhohn Belén y Lic. Olagnero Gabriela Fabiana desarrollan su actividad profesional en Nutricia Research.

Fuente de Financiamiento: el estudio fue financiado por Nutricia - Bagó Early Life Nutrition.

Introducción

La alergia alimentaria surge de la respuesta inmune específica inducida por la exposición a las proteínas de un alimento. La respuesta clínica anormal se presenta luego de la ingestión, contacto o inhalación de un alimento, sus derivados o aditivos (1).

La leche de vaca se encuentra entre los 8 alimentos responsables del 90% de las alergias alimentarias. La alergia a la proteína de leche de vaca (APLV) se presenta especialmente en lactantes y niños y tiende a ser transitoria. Su prevalencia parecería estar incrementándose según se describe en diferentes publicaciones en países occidentales, aunque se desconoce el verdadero impacto en Argentina. Un estudio publicado recientemente muestra una prevalencia de APLV del 1,2% en 2014, tres veces superior a la prevalencia en 2004 (1 - 3).

El Consenso Iberoamericano en el Diagnóstico y Tratamiento de la APLV indica que "el tratamiento de niños con APLV se basa en la suspensión de proteína de leche de vaca (PLV) de la dieta materna en niños alimentados con leche humana, el reemplazo de fórmulas con PLV por proteínas extensamente hidrolizadas (FeH), y la suspensión de PLV en dietas de niños mayores de 6 meses de edad. Ante la no respuesta al tratamiento o ante cuadros severos de enfermedad se recomienda la utilización de fórmula a base de aminoácidos. La suspensión de PLV se mantendrá no menos de 6 meses y/o hasta el año. El tiempo de tratamiento dependerá de la tolerancia lograda por el paciente (4).

Son necesarios diagnóstico y tratamiento tempranos y adecuados para evitar que el crecimiento y desarrollo psicomotor puedan verse comprometidos, con deterioro de la calidad de vida y aumento en los costos del tratamiento. Es crucial proporcionar una dieta equilibrada que contenga suficiente energía, macro y micronutrientes ya que los lactantes con APLV demandan una adecuada proporción de calorías y proteínas, composición de aminoácidos y una fuente adecuada de calcio, por riesgo de raquitismo y crecimiento deficiente. Desconocer estos criterios o no evaluarlos en el transcurso del tratamiento puede conducir a dietas inapropiadas con consecuencias dramáticas (5, 6).

Por otro lado, las fórmulas indicadas para tratamiento o extensivamente hidrolizadas deben ser toleradas al menos por el 90% de los niños con APLV en estudios clínicos. En su composición proteica deben contener sólo péptidos con peso molecular menor a 3000Daltons y están compuestas mayoritariamente por péptidos menores a 1500Daltons y aminoácidos (6).

En niños tratados con FeH o fórmula con aminoácidos es necesaria una ingesta adecuada para revertir síntomas y recuperar crecimiento. Sin embargo, los lactantes rechazan frecuentemente las FeHs y las fórmulas con aminoácidos debido al gusto desagradable, poniendo en riesgo la recuperación nutricional (7).

Estudios en los que se analizaron aminoácidos pertenecientes a muestras de carne de centolla por HPLC luego de pruebas sensoriales dieron como resultado que el sabor dulce se debía a aminoácidos como glicina y alanina, sabor dulce-amargo, alanina y amargo, histidina (8). Otras moléculas de alimentos identificadas como responsables de generar sabor amargo son los monoterpenos iridooides, los diterpenos de veinte carbonos, los triterpenos e isoprenoides, algunas cetonas, flavonoides y aldehídos como el benzaldehído (9).

El presente estudio evaluó sensorialmente las cinco FeH disponibles, en orden decreciente de aceptación para relacionar la preferencia con los ingredientes responsables del sabor.

Materiales y Método

Se realizó un testeo sensorial ciego de las cinco FeH (A, B, C, D y E) disponibles en el mercado en adultos sanos. Los criterios de inclusión fueron: edad mayor a 18 años, no fumadores y con deseo de participar. Completaron el testeo 54 participantes reclutados entre la población universitaria de la Universidad del Salvador y de Buenos Aires. Todos los participantes fueron entrenados previamente sobre la metodología de testeo y la forma de completar el cuestionario. Se dispusieron estaciones individuales para la realización de las pruebas, con el objetivo de evitar la interacción entre participantes. Las fórmulas se diluyeron según las indicaciones del envase. En el procedimiento de prueba

se indicó beber un sorbo de cada vaso codificado, intercalando con agua mineral a temperatura ambiente (25°C). Las fórmulas fueron calificadas con puntaje del 1 al 5 (más aceptable – menos aceptable) como una evaluación general de aceptación y la frecuencia de las preferencias resultaron asimétricas. La prueba de Kolmogórov-Smirnov resultó no significativa cuando se comparó con distribuciones normales con media y desvío de las propias muestras. Por este motivo la preferencia se analizó con la prueba de Rangos de Wilcoxon con un nivel significación corregido por el número de comparaciones. Para todas las pruebas estadísticas el nivel de significación fue de 0,05.

Resultados

La composición nutricional de las FeH se muestra en Tabla N°1. Los 54 participantes completaron el formulario correspondiente y se descartaron 4 por repetición de puntajes asignados. Según la sumatoria de puntajes de aceptación, las fórmulas quedaron ordenadas de la siguiente manera: E, D, A, C, B; de la más aceptable a menos aceptable (Gráfico N°1). La fórmula E fue la “preferida”, aunque no presentó diferencias significativas con D. Al realizar un análisis de las frecuencias acumuladas de mejores puntajes, se observa claramente la preferencia por E (48% del puntaje “1”) seguida por D

Tabla N°1: Composición nutricional de Fórmulas extensamente hidrolizadas (FeH) testeadas.

Fórmula	Energía (kcal/100ml) (Dilución %)	Proteína (g/100kcal)	Lípidos (g/100kcal)	Hidratos de Carbono (g/100kcal)	Otros
A	67 (13,4%)	2,5 PeH (suero) 20% AA libres 95% péptidos <1000D	5,1 AGS 41% AGM 40% AGP 19% Oleína de palma, aceites de canola, coco y maravilla y palma. Aceite vegetal de <i>Cryptocodium cohnii</i> (DHA), aceite de <i>mortierella alpina</i> (ARA)	11 Maltodextrina Lactosa	
B	67 (14,4%)	2,8 PeH (caseína) AA libres	5,3 AGS 42% AGM 37% AGP 20% Aceites de palma, maíz, coco, soya y girasol Mezcla de aceites ARA y DHA	10 Sólidos de jarabe de maíz	Lactobacillus rhamnosus GG
C	68 (14,2%)	3 PeH (suero) 20% AA libres 95% péptidos <1200D	5,1 (TCM 40%) AGS 47% AGM 37% AGP 16% oleína de palma, aceites de colza bajo en ácido erúrico, girasol, girasol alto oleico, grosella negra GLA. Aceite de pescado (DHA)	10,9 Maltodextrina Almidón	Nucleótidos
D	66 (12,8%)	2,7 PeH (suero) 15% AA libres 85% péptidos cadena corta	5,3 (TCM 50%) AGS 58% AGM 22% AGP 17% Aceites de palma, canola, girasol, células simples (ARA) y de pescado (DHA)	10,4 Jarabe de glucosa	Nucleótidos
E	66 (13,6%)	2,4 PeH (suero) 15% AA libres 85% péptidos cadena corta	5,3 AGS 45% AGM 38% AGP 17% Aceites de palma, canola, coco, girasol, células simples (ARA) y de pescado (DHA)	11 Maltodextrina Lactosa	GOS, FOS Nucleótidos

PeH: Proteína extensamente Hidrolizada - AA: aminoácidos - AGS: ácidos grasos saturados - AGM: ácidos grasos monoinsaturados - AGP: ácidos grasos poliinsaturados - ARA: Ácido Araquidónico - DHA: Ácido Docosahexaenoico - GLA: Ácido Gama Linoleico - TCM: Triglicéridos de Cadena Media - GOS: Galactooligosacáridos - FOS: Fructooligosacáridos

Fuente: Elaboración propia a partir de información de rótulo nutricional, páginas web y Vademecums de cada elaborador.

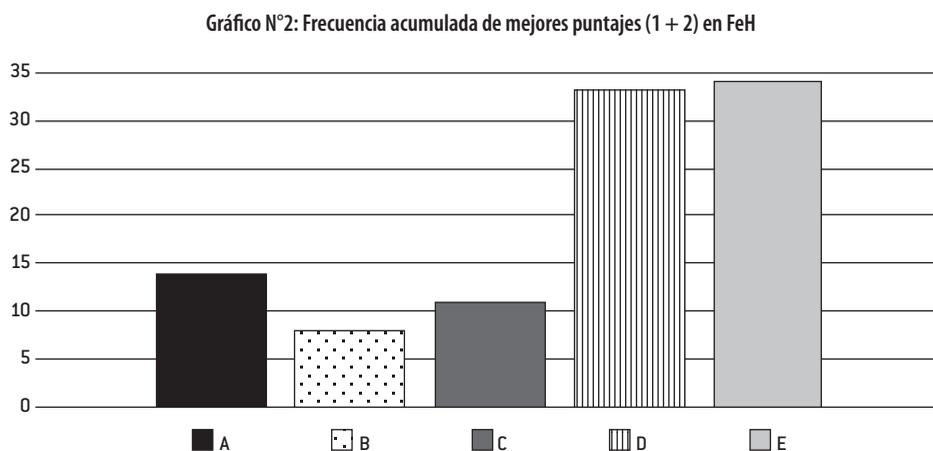
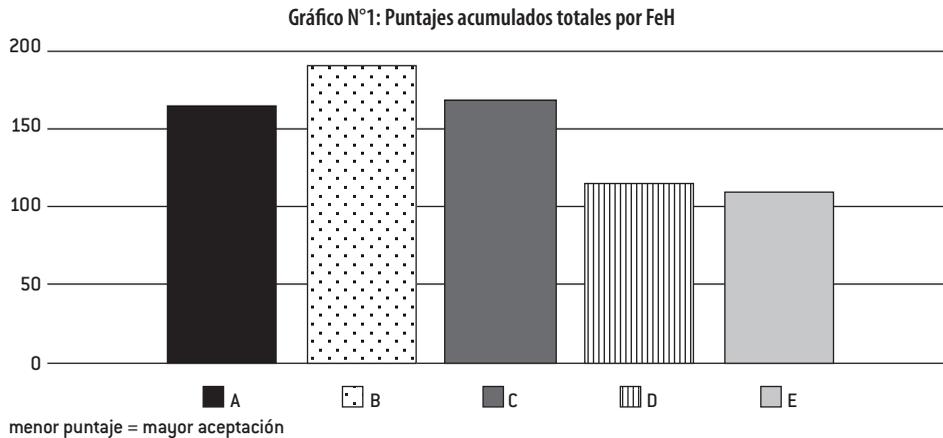
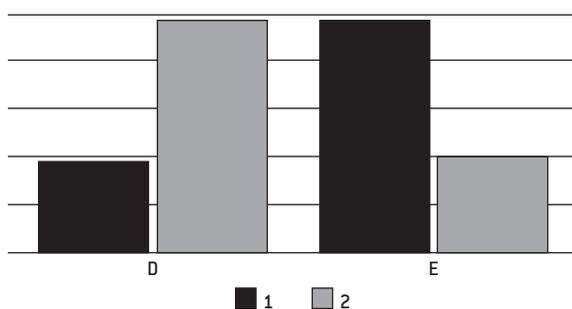


Gráfico N°3: Distribución de frecuencias de mejores puntajes (1+2) entre las FeH mejor puntuadas.



(48% del puntaje "2") (Gráficos N°2 y 3). Las tres FeH restantes (A, C y B) mostraron una baja aceptación, significativa con respecto a E y D.

Entre las observaciones realizadas por los participantes aparecen como características: "sabor amargo", "retrogusto intenso" y "olor fuerte o desagradable". Al analizar los ingredientes de cada FeH, se encontró mayor aceptación para hidrolizados de suero con presencia de lactosa y/o jarabe

de glucosa y grasa saturada, especialmente con la presencia de Triglicéridos de Cadena Media (TCM). Dada la diversidad de ingredientes y el grado de hidrólisis proteica coexisten numerosas sustancias que condicionan la sensorialidad del producto. El nivel de hidrólisis y los péptidos resultantes serían factores determinantes en la aceptación.

Los lípidos tienen un gran impacto en las características sensoriales de los productos, ya que no sólo modifican la percepción del sabor, también son responsables de su estabilidad. Así mismo, su interacción con mono y disacáridos causan adhesión; sumada a la percepción innata por el sabor dulce del bebe. Se ha demostrado que el sabor amargo de los péptidos puros, a pesar de depender de la fuente de proteína y de la especificidad de la enzima, está relacionado con la presencia y posición de aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos del hidrolizado. La hidrólisis de la proteína produce un efecto secundario negativo en la per-

cepción del sabor a partir de la liberación de péptidos generalmente con sabor más amargo que la proteína nativa (10-13).

Discusión

En el tratamiento de APLV, la elección de una FeH debe basarse en las características del paciente como primer factor y la capacidad hipoalérgica documentada, en segundo término (4, 6). Sin embargo, la aceptación de la fórmula elegida puede limitar o retrasar el progreso del tratamiento ya que son rechazadas por su sabor desagradable (14).

La composición de cada fórmula, tanto en sus ingredientes como en los péptidos resultantes de la hidrólisis extensa, puede hacer variar la aceptación de la fórmula, así como también la edad de introducción (14). En el presente estudio, se analizó la aceptación de FeH relacionadas con su composición, presentando mejor aceptación los hidrolizados de suero acompañados de hidratos de carbono que brindan dulzor y grasas saturadas.

En el ser humano, los sentidos se forman en la fase embrionaria, de la primera a la octava semana de gestación, cuando aparecen las primeras papilas gustativas. Entre las semanas 24^a y 32^a de gestación, el feto comienza a percibir el sabor dulce y el ácido. Los compuestos de aroma presentes en el fluido amniótico estimulan los receptores del gusto del feto, en cuanto éste comienza a tragar. Los sabores de la alimentación materna llegan a través del líquido amniótico, de tal manera que el lactante ya empieza a experimentar patrones gustativos antes de tener contacto con los alimentos (14-17).

Con relación a esto, hay estudios que indican que los recién nacidos muestran preferencias innatas como son la preferencia por el sabor dulce y el rechazo de sustancias amargas (asociadas en el medio natural con la presencia de toxinas) o que producen irritación de la superficie orofaríngea como pueden ser especias picantes. Por otra parte, las experiencias en útero facilitan la aceptación y el disfrute de nuevos alimentos durante la alimentación complementaria y la infancia. Una vez fuera del útero materno, el recién nacido irá desarrollando poco a poco la gama completa de sensaciones que componen el sentido del gusto: dulce, ácido, amargo y salado. (15)

Las fórmulas para el tratamiento de APLV poseen la particularidad de contar con ciertas moléculas hidrolizadas en mayor o menor medida, que determinarán un comportamiento físico en el sistema, sabor y palatabilidad particular y posterior disponibilidad para su digestión y absorción, una vez ingeridos. Estudios previos en lactantes muestran que la introducción de FeH antes de los 4 meses de edad facilita su aceptación (18). En estas fórmulas, las proteínas han sido sometidas a un alto grado de hidrólisis, superior al 10% (extensivo). La liberación de los péptidos generalmente brinda sabor más amargo que el de la proteína original, tal cual se confirma en el presente estudio. Se ha demostrado que el sabor amargo de los péptidos puros, a pesar de depender de la fuente de proteína y de la especificidad de la enzima, está relacionado con la presencia y posición de aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos del hidrolizado. La hidrólisis de las proteínas con diferente distribución de aminoácidos hidrofóbicos y grupos cargados producirá péptidos que difieren en la distribución de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Si bien la caseína es fácilmente hidrolizable y las proteínas de suero no; existen estudios de hidrolizados de β -lactoglobulina y β -caseína donde se demostró que los péptidos obtenidos de hidrólisis de la β -lactoglobulina poseen distribuciones similares de cargas y grupos hidrofóbicos, careciendo de áreas distintas de hidrofóbicos o hidrofílicos (19). Sin embargo, resultados previos coinciden con el presente estudio y muestran que, al analizar aceptación y palatabilidad, es clara la preferencia por FeH de proteína de suero (20).

Si se analizan los componentes provenientes de los hidratos de carbono se reconocerá fácilmente si hay presencia de glucosa y lactosa. Aquella fórmula con presencia de glucosa libre será de un sabor dulce más o menos pronunciado, de acuerdo con su concentración, lo que indicaría una mayor aceptación por parte del consumidor, especialmente en el caso del recién nacido (15). La presencia de lactosa también fue evaluada como positiva y se encuentra sólo en dos de las fórmulas testeadas. Como ingrediente en fórmulas para APLV se agrega purificada o como parte del suero hidrolizado y es un componente importante para estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas en la micro-

biota intestinal y mejorar la absorción y retención de calcio en lactantes (21-22).

Los lípidos confieren viscosidad y textura que redundan en una mejor palatabilidad. Distintos trabajos han demostrado que la viscosidad puede influir en la percepción de los sabores. Un incremento en la viscosidad prolonga el tiempo que la disolución permanece en la boca antes de ser retirada, lo cual favorecería la solubilización de los hidratos de carbono en la saliva y la aparición de más interacciones con los receptores (23).

Por otro lado, existiría también una posible interacción entre la historia alimentaria previa del niño y la aceptación de la fórmula FeH. Aquellos niños sin experiencia previa con otro tipo de leche tendrían una mejor aceptación de la fórmula hidrolizada (14).

Conclusión

La resultante de las combinaciones de ingredientes y sus estructuras químicas podrían ser

responsables de mejor sabor o mayor aceptación de las FeH. La aceptación y por ende la adherencia son factores clave para la recuperación nutricional del lactante y la continuidad del tratamiento en APLV.

La conjunción de todas las moléculas podría producir sinergia, inhibición o ambas cosas respecto de la resultante del sabor. Sería de interés evaluar el comportamiento con un análisis cualicuantitativo de los aminoácidos, péptidos y otras sustancias mencionadas al principio. Por otra parte, la interacción de los lípidos sobre las características sensoriales requiere de más estudios sobre su efecto en la aceptación de una fórmula. El empaquetamiento de las moléculas influye considerablemente en el comportamiento de los triglicéridos presentes, fundamentalmente en la palatabilidad, uno de cuyos factores influyentes es la textura.

Finalmente, futuros estudios sobre la interacción entre ingredientes y compuestos moleculares permitirían su manipulación en función de garantizar la aceptación y palatabilidad de las fórmulas con hidrolizados proteicos extensos.

Referencias bibliográficas

1. Comité Nacional de Alergia. Alergia alimentaria en pediatría: recomendaciones para su diagnóstico y tratamiento. *Arch Argent Pediatr* 2018; 116(Supl1): S1-S19.
2. Álvarez Berciano F, Álvarez Caro F. Reacciones adversas a alimentos e historia natural de la alergia alimentaria en la infancia. *Bol Pediatr* 2008; 48: 21-36.
3. Mehaudy R, Parisi CAS, Petriz N, et al. Prevalencia de alergia a la proteína de la leche de vaca en niños, en un hospital universitario de comunidad. *Arch Argent Pediatr*. 2018; 116(3): 219-223.
4. Consenso Iberoamericano en el Diagnóstico y Tratamiento de la Alergia a la Proteína de Leche de Vaca. *J. Food Allergy* 2012; 1(3): 353-366.
5. Zuluaga VL, Ramírez RN, Mejía P LK, Vera Chamorro JF. Desenlaces del tratamiento con una fórmula extensamente hidrolizada a base de suero en lactantes con alergia a la proteína de leche de vaca. *Rev Colomb Gastroenterol* 2018; 33(2).
6. Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010; 21(Suppl 21): 1-125.
7. Miraglia Del Giudice et al. *Italian Journal of Pediatrics* 2015; 41: 42.
8. 8- Riso S, Carelli AA. Evaluación del gusto de carne de centolla *Lithodes santolla*. Congreso VIII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. XVI Coloquio de Oceanografía; 2012. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
9. Linden G, Lorient D. *Bioquímica Agroindustrial*. Editorial Acribia. I.S.B.N. 84-200-0805-2. 1996.
10. Adler-Nissen J, Olsen HS. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *ACS Symp Ser*. 1979; 92: 125-46
11. Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Actualizaciones Química Biológica. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Colombia. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2008; 42(2): 227-36
12. Li L, Yang ZY, Yang XQ, Zhang GH, Tang SZ, Chen F. Debittering effect of *Actinomucor elegans* peptidases on soybean protein hydrolysates. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008; 35(1): 41-7.
13. Humiski LM, Aluko RE. Physicochemical and bitter-ness properties of enzymatic pea protein hydrolysates. *J Food Sci* 2007; 72(8): S605-11
14. Mennella JA and Beauchamp GK. Understanding the Origin of Flavor Preferences. *Chem. Senses* 2005; 30(suppl 1): i242-i243.
15. Costell E. La aceptabilidad de los alimentos: nutrición y placer. *Arbor CLXVIII*, 661(enero 2001), 65-68pp.
16. Navarro Lorena Rubio; Torrero Carmen, Mirellta Regalado y Salas Manuel. Artículo Revisión: Departamento de Neurobiología del Desarrollo y neurofisiología. Instituto de Neurobiología Universidad Autónoma de México. UNAM- Campus Juriquilla, Querétaro. Año 2012
17. Rozin, P (1995). Thinking about and choosing food: Biological, psychological and cultural perspectives. En: L. Dube, J. Le Bel, C. Tougas & V. Troche (Eds.). *Health and pleasure at the table* (pp. 173-193). Montreal, Canada: Enjeux actuels du marketing dans l'alimentation a la restauration. (Edited version of publication # 129)
18. Mennella, JA and Beauchamp, GK. Development and bad taste. *Pediatr. Allergy Asthma Immunol* 1998; 12: 161-163.
19. Benítez Ricardo; Ibarz Albert, Pagan Jordi. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Protein hydrolysates: processes and applications. Acta Bioquim. Clin. Latinoam*. 2008, 42 (2): 227-36.
20. Mabin DC, Sykes AE, David TJ. Nutritional content of few foods diet in atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 1995; 73: 208-210.
21. Abrams SA, Griffin IJ, Davila PM. Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-free infant formulas. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76: 442-6
22. Szilagyi A. Adaptation to Lactose in Lactase Non-Persistent People: Effects on Intolerance and the Relationship between Dairy Food Consumption and Evaluation of Diseases. *Nutrients* 2015; 7(8): 6751-79.
23. Carrapiso MR, Aguayo C, Carrapiso AI. Efecto de la grasa sobre el flavor de la leche con un aromatizante de vainilla. *Cienc Tecnol Aliment*. 2004; 4(4): 246-250.