

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PATRICIA GOMES WESSLER**

**IMPLICAÇÕES CEREBRAIS E METABÓLICAS ASSOCIADAS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE  
ASPARTAME EM RATOS *Wistar***

**CRICIÚMA, 2019**

**PATRICIA GOMES WESSLER**

**IMPLICAÇÕES CEREBRAIS E METABÓLICAS ASSOCIADAS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE  
ASPARTAME EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Ioppi Zugno.

**CRICIÚMA, 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

W515i Wessler, Patricia Gomes.

Implicações cerebrais e metabólicas associadas à administração crônica de aspartame em ratos wistar / Patricia Gomes Wessler. - 2019.

66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Alexandra Ioppi Zugno.

1. Aspartame - Consumo. 2. Adoçantes artificiais - Efeito fisiológico. 3. Cognição. 4. Estresse oxidativo. 5. Metabolismo - Alterações. I. Título.

CDD 23. ed. 664.5



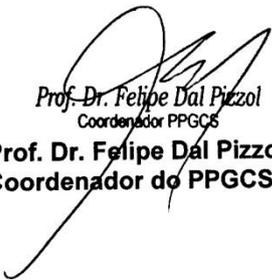
**unesc**

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 332

Com início às 10:30 (dez horas e trinta minutos) do dia doze do mês de dezembro de 2019 (dois mil e dezenove), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Patricia Gomes Wessler** sob a orientação da Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno, intitulada **"IMPLICAÇÕES CEREBRAIS E METABÓLICAS ASSOCIADAS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ASPARTAME EM RATOS Wistar"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Profa. Dra. Patricia Fernanda Schuck (Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul - PUCRS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 11:30 (onze horas e trinta minutos), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 12 (doze) de dezembro de 2019 (dois mil e dezenove).

  
Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol  
Coordenador PPGCS

**Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol**  
Coordenador do PPGCS

  
Fernanda Nunes Peruchi  
Assistente Administrativo

**Folha Informativa:**

A dissertação foi elaborada seguindo a Resolução 07/2015 do PPGCS e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

*Dedico esta conquista à minha família por ter me proporcionado a oportunidade do conhecimento e por sempre acreditar em mim.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida e me presentear com uma família maravilhosa, amor e amigos. Gratidão a ele por sempre estar ao meu lado, me iluminando, protegendo, guiando e dando força e coragem para seguir com os meus sonhos.

Agradeço especialmente a minha família. Aos meus pais, Marli Gomes Wessler e Élio Wessler, e a minha irmã Tatiana Gomes Wessler, por todo o apoio, paciência, amor e carinho durante essa jornada, e em minha vida toda. Obrigada por não medirem esforços por mim e por todos os ensinamentos proporcionados. Vocês são meus maiores incentivadores, e essa minha conquista é de vocês. Minha eterna gratidão por tudo, eu amo vocês demais. Tenho orgulho de chamá-los de pais, e de fazer parte dessa família maravilhosa! Aproveito para agradecer também ao meu cunhado, Guilherme Francisco, por acreditar em mim, me apoiar e demonstrar confiança de que esse sonho se tornaria realidade.

Ao meu namorado, Leandro Furlan, muito obrigada por todo apoio, incentivo e amor durante essa caminhada. Obrigada por me fazer sorrir e por me dar força em momentos que eu mesmo duvidei de mim e pensei que não iria conseguir. Obrigada pelo companheirismo, pelas palavras de conforto, pelos abraços acolhedores, pela paciência, pelas dicas e ensinamentos. Você foi, e é essencial. Obrigada por fazer parte da minha vida, sou imensamente feliz por ter uma pessoa tão incrível ao meu lado. Te amo!

A minha orientadora Alexandra Ioppi Zugno, por compartilhar seus conhecimentos comigo desde a época de iniciação científica até aqui. Pelo direcionamento em todas as etapas deste projeto e por acreditar em mim, e juntas, fazermos dar certo. Meus sinceros agradecimentos por tudo.

Ao Guga, meu parceiro de laboratório desde os tempos de iniciação científica. Me faltam palavras para agradecer por todo seu empenho e dedicação pra me ajudar nessa caminhada, em especial nesses últimos meses. Você foi uma peça fundamental para a concretização desse estudo. E me desculpa por todas mensagens desesperadoras no whatsapp do tipo: “Gugaaa, preciso de um favor”, “Gugaaa eu tava pensando que dá de fazer assim...”. Prometo te deixar respirar agora. Muito obrigada mesmo!

A todos os alunos e colegas do grupo de esquizofrenia do laboratório de Psiquiatria Translacional, obrigada por me auxiliarem em todas as etapas desse estudo, pela disponibilidade, dedicação e companheirismo. E também aos alunos do grupo de depressão do laboratório, pela convivência prazerosa ao longo desses dois anos.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a chegar até aqui. Muito obrigada!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.*

*Arthur Schopenhauer.*

## RESUMO

Ao longo da última década tem se verificado um aumento significativo no consumo de edulcorantes, especialmente artificiais como o aspartame. Apesar de ser muito utilizado por pessoas diabéticas e, especialmente nos últimos tempos por aquelas que visam um estilo de vida mais saudável, estudos vêm demonstrando que o consumo de aspartame pode acarretar em alterações metabólicas, bem como em impactos a nível cerebral. Baseado nisso, o objetivo desse estudo foi investigar alterações comportamentais, metabólicas e bioquímicas em animais submetidos à administração repetida de aspartame. Para tanto, foram utilizados 80 ratos *Wistar* a partir do desmame até completarem 60 dias de vida. Estes animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: controle (água), ASP35 (aspartame de 35mg/kg), ASP80 (aspartame de 80mg/kg) e ASP160 (aspartame de 160mg/kg), e receberam estas administrações, uma vez ao dia, por gavagem via oral, durante 40 dias de tratamento. No último dia do experimento, os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação da cognição e, após, eutanasiados. O sangue foi coletado e as estruturas cerebrais foram dissecadas para as posteriores análises bioquímicas. A glicemia de todos os animais também foi mensurada, no primeiro e último dia do experimento, bem como o longo de todo o experimento os animais foram pesados e o consumo alimentar monitorado. Os resultados mostraram que o aspartame, em especial na dose de 160mg/kg, mas também nas doses mais baixas, induziu déficit cognitivo pelo teste de esquiiva inibitória, danos oxidativos e alterações metabólicas, tais como aumento de peso, dos níveis de glicose e de triglicérides ao final do tratamento. Estes resultados em conjunto evidenciam que a administração crônica de aspartame é capaz de acarretar em danos a nível metabólico e cerebral, e salienta a necessidade de revisões a respeito da sua ingestão diária aceitável, bem como seu uso consciente.

**Palavras-chave:** Aspartame; Cognição; Estresse Oxidativo; Parâmetros Metabólicos.

## ABSTRACT

Over the past decade there has been a significant increase in the consumption of sweeteners, especially artificial such as aspartame. Despite being widely used by diabetic people and, especially in recent times, those aiming for a healthier lifestyle, studies have shown that the consumption of aspartame can lead to metabolic changes as well as impacts on the brain. Based on this, the aim of this study was to investigate behavioral, metabolic and biochemical changes in animals undergoing repeated administration of aspartame. Eighty *Wistar* rats were used from weaning until 60 days old. These animals were randomly divided into 4 groups: control (water), ASP35 (35mg/kg aspartame), ASP80 (80mg/kg aspartame) and ASP160 (160mg/kg aspartame), and received these administrations once daily, by oral gavage for 40 days of treatment. On the last day of the experiment, the animals underwent behavioral tests for cognitive assessment and then were killed. Blood was collected and brain structures were dissected for further biochemical analysis. The glycemia of all animals was also measured on the first and last day of the experiment, as well as throughout the experiment the animals were weighed and the food intake monitored. The results showed that aspartame, especially at 160mg/kg but also at lower doses, induced cognitive impairment by inhibitory avoidance testing, oxidative damage and metabolic changes, such as weight gain and glucose and triglyceride levels at the end of treatment. These results together show that chronic administration of aspartame can lead to metabolic and brain damage, and stresses the need for revisions regarding its acceptable daily intake as well as its conscious use.

**Key-words:** Aspartame; Cognition; Oxidative stress; Metabolic Parameters.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do aspartame .....	19
Figura 2. Possíveis mecanismos do aspartame no cérebro via fenilalanina.....	22
Figura 3. Grupos experimentais.....	28
Figura 4. Desenho experimental.....	28
Figura 5. Esquema simplificado do labirinto em y.....	29
Figura 6. Esquema simplificado da esquiiva inibitória.....	30
Figura 7. Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35 mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o labirinto em y em ratos <i>Wistar</i> machos (A) e fêmeas (B).....	33
Figura 8. Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o teste de esquiiva inibitória em ratos <i>Wistar</i> machos (A) e fêmeas (B).....	34
Figura 9. Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o conteúdo de grupo carbonil em ratos <i>Wistar</i> machos (A) e fêmeas (B).....	35
Figura 10. Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o conteúdo de grupo sulfidrila em ratos <i>Wistar</i> machos (A) e fêmeas (B) .....	36
Figura 11. Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em ratos <i>Wistar</i> machos (A) e fêmeas (B).....	37
Figura 12. Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) em ratos <i>Wistar</i> machos (A) e fêmeas (B).....	38
Figura 13. Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o conteúdo de glutathiona redutase (GSH) em ratos <i>Wistar</i> machos (A) e fêmeas (B) .....	39
Figura 14. Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o perfil glicêmico dos ratos <i>Wistar</i> machos .....	42
Figura 15. Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o perfil glicêmico dos ratos <i>Wistar</i> fêmeas.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal semanal em g, dos ratos <i>Wistar</i> machos que receberam água ou aspartame (35mg/kg; 80mg/kg; 160mg/kg) por um período de 40 dias (equivalente a 7 semanas).....	40
Tabela 2. Peso corporal semanal em g, dos ratos <i>Wistar</i> fêmeas que receberam água ou aspartame (35mg/kg; 80mg/kg; 160mg/kg) por um período de 40 dias (equivalente a 7 semanas).....	41
Tabela 3. Ingestão total de ração animal em g, pelos ratos <i>Wistar</i> , machos e fêmeas, que receberam água ou aspartame (35mg/kg; 80mg/kg; 160mg/kg) por um período de 40 dias .....	41
Tabela 4. Colesterol total, HDL e triglicérides (mg/dL) dos ratos <i>Wistar</i> , machos e fêmeas, que receberam água ou aspartame (35mg/kg; 80mg/kg; 160mg/kg) por um período de 40 dias .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABIAD:** Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos e para Fins Especiais
- ACheE:** Acetilcolinesterase
- ANOVA:** Análise de variância
- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASP:** Aspartame
- BHE:** Barreira hematoencefálica
- CEUA:** Comissão de Ética para o Uso de Animais
- CONCEA:** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CT:** Colesterol total
- DA:** Dopamina
- DIMED:** Divisão de Medicamentos
- DINAL:** Divisão Nacional de Alimentos
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico (*do inglês Deoxyribonucleic acid*)
- DNPT:** 2,4-dinitrofenil-hidrazina
- DOPA:** 3,4-diidroxifenilalanina
- DTNB:** 5,51-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
- EPM:** Erro padrão da média
- EROS:** Espécies reativas de oxigênio
- ERNs:** Espécies reativas de nitrogênio
- FDA:** Food and Drug Administration
- GC:** Grupo controle
- GPx:** Glutathione peroxidase
- GSH:** Glutathione reduzida
- HDL:** Lipoproteínas de alta densidade (*do inglês High-density lipoprotein*)
- IDA:** Ingestão diária aceitável
- LPS:** Lipopolissacarídeos
- LTP:** Potenciação de longa duração (*do inglês Long term potentiation*)
- MS:** Ministério da Saúde
- NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (*do inglês Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NHNE:** National Health and Nutrition Examination
- NMDA:** N-metil-D-aspartato
- ON:** Óxido nítrico
- POF:** Pesquisa de Orçamentos Familiares
- SM:** Síndrome metabólica
- SNC:** Sistema nervoso central
- SNVS:** Secretaria Nacional da Vigilância Sanitária
- SOD:** Superóxido dismutase
- TANCL:** Transportadores de aminoácidos neutros de cadeia longa
- TG:** Triglicerídeos
- TNB:** 2-nitro-5-mercapto-benzóico

**UNESC:** Universidade do Extremo Sul Catarinense

**v.o:** Via oral

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina (serotonina)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1. EDULCORANTES .....	17
<b>1.1.1. Legislação brasileira e consumo dos edulcorantes</b> .....	<b>18</b>
1.2. ASPARTAME .....	19
1.3. ASPARTAME E SISTEMA NERVOSO .....	21
1.4. ASPARTAME E ALTERAÇÕES METABÓLICOS .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
3.1. ANIMAIS .....	26
3.2. ADMINISTRAÇÕES .....	26
<b>3.2.1. Preparo do aspartame</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.2. Grupos experimentais</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.3. Desenho experimental</b> .....	<b>28</b>
3.3. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	29
<b>3.3.1. Labirinto em Y</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3.2. Esquiva inibitória</b> .....	<b>29</b>
3.4. ESTRESSE OXIDATIVO .....	30
<b>3.4.1. Marcadores de dano oxidativo</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.2. Defesas antioxidantes</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.3. Dosagem de proteínas</b> .....	<b>31</b>
3.5. PARÂMETROS METABÓLICOS .....	31
<b>3.5.1. Peso corporal e consumo alimentar</b> .....	<b>31</b>
<b>3.5.2. Perfil glicêmico</b> .....	<b>31</b>
<b>3.5.3. Perfil lipídico</b> .....	<b>31</b>
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS .....	32
<b>4.1.1. Labirinto em Y</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1.2. Esquiva inibitória</b> .....	<b>33</b>
4.2. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	35
<b>4.2.1. Dano oxidativo</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2.2. Antioxidantes</b> .....	<b>37</b>
4.3. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS .....	39
<b>4.3.1. Avaliação do peso corporal e consumo alimentar</b> .....	<b>39</b>
4.3.1.1 .Peso corporal .....	40
4.3.1.2. Consumo alimentar.....	41

<b>4.3.2. Perfil glicêmico.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.3. Perfil lipídico.....</b>	<b>43</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO A – Parecer CEUA .....</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. EDULCORANTES

O sabor doce é o mais facilmente aceito pelo nosso organismo, e tal preferência é uma característica comum aos seres humanos (Torloni et al., 2007). O hábito e a necessidade de consumir açúcar impulsionaram a procura de compostos naturais e/ou artificiais para atender a demanda de uma grande parcela da população impedida de usar os sacarídeos. Nesse sentido, diversas substâncias/produtos surgiram na tentativa de suprir tal necessidade (Bye et al., 1993; Castro e Franco, 2002).

Os edulcorantes, por sua vez, são compostos - quais podem ser classificados em naturais ou artificiais, e também calóricos (nutritivos) ou não calóricos (não nutritivos) - capazes de conferir sabor adocicado (Castro e Franco, 2002; Freitas, 2005). Essas substâncias são consideradas altamente eficazes devido à sua capacidade de adoçar muito em pequenas concentrações. Assim, os edulcorantes fortemente foram e vêm sendo empregados como aditivos alimentares, nos adoçantes e produtos dietéticos em geral, como uma alternativa ao açúcar (Fatibello-Filho et al., 1996; Chattoṗadhyay et al., 2014). Genericamente, os edulcorantes são designados como “adoçantes de mesa”, contudo, estes últimos são produtos compostos por substâncias edulcorantes, que conferem a doçura, e também por um agente de corpo, que confere durabilidade, boa aparência e textura ao produto final (Torloni et al., 2007). Estes produtos em geral são produzidos e utilizados largamente como substitutos ao açúcar, conferindo sabor doce com baixo ou nenhum valor calórico.

Inicialmente, os adoçantes e demais produtos dietéticos foram pesquisados e desenvolvidos para atender às necessidades daquelas pessoas com algum distúrbio no metabolismo de açúcares, a fim de proporcionar o sabor doce. Porém nos últimos anos, observa-se fortemente o aumento na procura desses produtos com o objetivo de emagrecimento ou manutenção de um peso saudável, em virtude das calorias desprezíveis (Oliveira e Franco, 2010). Em razão da crescente demanda por produtos ligados ao culto ao corpo e à saúde, os produtos dietéticos invadiram rapidamente as prateleiras dos supermercados, sendo observado um aumento expressivo no número de produtos alimentícios contendo o uso de edulcorantes (Toledo e Ioshi, 1995; Freitas e Araújo, 2010). A forte mídia e o culto à boa forma física, impostos pelos padrões da sociedade, fizeram do açúcar um vilão e colocaram em destaque os edulcorantes como seu substituto salvador. Nessa perspectiva, o uso de produtos com poder adoçante e de baixa caloria, como os produtos *diet* e também os *light*, representam um público que visa a busca de um corpo condizente com as exigências atuais. Além disso, a forte epidemia da obesidade também trouxe à tona o uso acentuado desses produtos. Assim, os adoçantes e os produtos dietéticos em geral vêm invadindo as residências, e crescendo não apenas entre os consumidores com restrições dietéticas, mas especialmente aos que anseiam estética e “saúde” (Fagundes et al., 2001; Santana et al., 2012).

O grande problema é que, apesar destes produtos serem importantes para as pessoas que necessitam de uma dieta restrita em açúcar, geralmente eles vem sendo utilizados sem muito critério, e crescentemente seus usuários visam principalmente o modismo mais do que suas reais necessidades. Ademais, estes são normalmente utilizados por iniciativa própria, algumas vezes por indicações aleatórias, e não baseadas em recomendações médica ou de nutricionista (Natividade, 2011; Brasil, 2016). Dessa forma, os produtos dietéticos acabam por muitas vezes sendo mal interpretados pelo consumidor, uma vez que só o termo em si não dá créditos ao produto - é necessário observar a composição dos mesmos -, além de seres consumidos de forma indiscriminada e abusiva, o qual tem sido objeto de muitas polêmicas a respeito de seus reais benefícios e de sua segurança em longo prazo (Malik et al., 2006; Brown et al., 2010; Ardalan et al., 2017, Green e Syn, 2019).

### 1.1.1. Legislação brasileira e consumo dos edulcorantes

Até a década de 1980, no Brasil, os produtos dietéticos eram regulamentados como drogas, sendo comercializados em farmácias e consumidos exclusivamente por quem necessitasse controlar a ingestão de sacarose, como os portadores de diabetes mellitus ou de outras doenças relacionadas a distúrbios no metabolismo dos sacarídeos (Toledo e Ioshi, 1995). Entretanto, em 1988, a Portaria nº01 da Secretaria Nacional da Vigilância Sanitária (SNVS) determinou que os edulcorantes, até então registrados na Divisão de Medicamentos (DIMED), passariam a ser registrados na Divisão Nacional de Alimentos (DINAL). Este fato mudou a trajetória destes produtos e expandiu seu mercado (Brasil, 1988). A partir de 1995, os produtos dietéticos passaram a fazer parte dos Alimentos para Fins Especiais, destinados a atender as necessidades de pessoas em condições metabólicas e fisiológicas específicas (Brasil, 1998). No entanto, seu comércio passou a ser disponível em diversos locais (ex: estabelecimentos alimentícios), e para qualquer consumidor, ampliando seu uso por toda população.

A regulamentação para uso de edulcorantes em alimentos no território brasileiro é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - órgão vinculado ao Ministério da Saúde (MS) -, com base em normas internacionais sobre o uso de aditivos em alimentos (Brasil, 1999). A ANVISA permite atualmente a utilização de quinze edulcorantes: manitol, isomaltiol, maltitol, esteviosídeo, lactitol, xilitol e eritritol, classificados como naturais, e acessulfame de potássio (acessulfame K), aspartame, ciclamato de sódio, sacarina, sucralose, taumatina e neotame, classificados como artificiais. Dentre os mais conhecidos e mais comercializados estão o aspartame, a sacarina e o ciclamato, comumente utilizados, por exemplo, em adoçantes dietéticos, refrigerantes e gomas de mascar (ANVISA, 2008). Antes de serem comercializados, todos os edulcorantes são avaliados quanto à sua toxicidade por meio de testes realizados por agências internacionais. A recomendação é que a utilização seja orientada e acompanhada por médico ou nutricionista e sempre respeitando o nível de ingestão diária aceitável (IDA) (Schernhammer et al., 2012; National Cancer Institute, 2014; Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor, 2015).

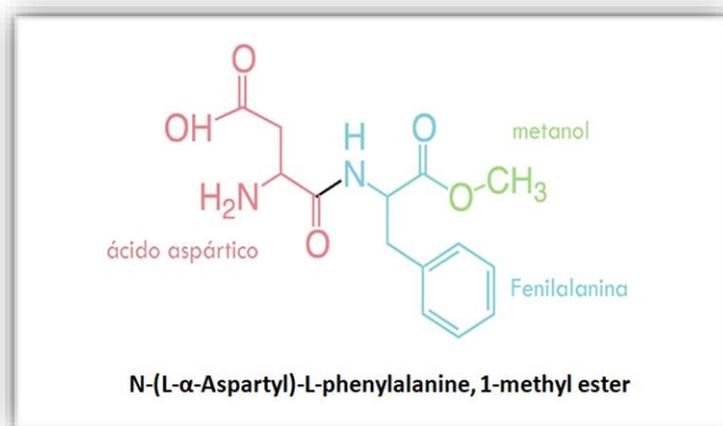
Pesquisas têm demonstrado que o consumo de edulcorantes, em especial os artificiais, vem aumentando em vários países (Popkin e Nielsen, 2003). No Brasil, estudos que forneçam estimativas confiáveis sobre a prevalência de utilização de produtos dietéticos pela população em geral são escassos, contudo algumas especulações, baseadas em dados de 2015 da Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos e para Fins Especiais (ABIAD), sugerem que esteja ocorrendo um forte crescimento desses produtos no mercado brasileiro. A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 demonstrou que 25,9% da população brasileira consomem pães, bolos e biscoitos *diet* e *light* fora do domicílio em relação ao total consumido. Ao se tratar de refrigerantes *diet* e *light* esse percentual sobe para 40,1% (IBGE, 2010). Um estudo realizado em Pelotas/RS por Zanini et al. (2011) encontrou a prevalência de 19% no uso de adoçantes dentre 2732 pessoas entrevistadas, sendo esse percentual mais elevado no sexo feminino, em pessoas idosas, nos diabéticos, hipertensos e em indivíduos com excesso de peso. Os portadores de diabetes mellitus ainda são um dos principais públicos consumidores dos adoçantes e produtos dietéticos. Castro e Franco (2002), ao estudar o consumo de adoçantes em 389 indivíduos diabéticos na região de São Paulo encontraram que 90,5% da amostra faziam uso de tais produtos - sendo o refrigerante o produto mais consumido - por acharem ser necessário para o tratamento da doença, bem como pela manutenção da palatabilidade do sabor doce, tal como o açúcar, mas que por sua vez, deve ser restrito. Em nível global, uma análise dos dados da National Health and Nutrition Examination (NHNE), entre 1999 e 2008, demonstrou que a ingestão de edulcorantes artificiais em bebidas aumentou de 6,1% para 12,5% entre crianças e de 18,7% para 24,1% entre adultos. A tendência é que esses números aumentem cada vez mais (Sylvetsky et al., 2012).

Crianças e gestantes, particularmente, compõem um grupo que merece maior atenção quanto ao uso de adoçantes e produtos dietéticos. Quanto às crianças, essas facilmente são capazes de atingir o limite máximo diário estipulado, devido ao peso corpóreo. Em relação às gestantes, segundo as evidências disponíveis, o ciclamato e sacarina devem ser evitados. Já o aspartame, sucralose e acessulfame podem ser utilizados durante a gestação, contudo muitos estudos vêm trazendo resultados controversos e perigosos, uma vez que se sabe que diferentes intervenções no período gestacional produzem efeitos diretos e/ou indiretos sobre a prole (Torloni, 2007).

Embora muitos estudos comprovem que o uso dos edulcorantes - especialmente os artificiais -, dentro dos limites diários, seja seguro para o ser humano, ainda existem muitas contradições acerca do assunto (Brown et al., 2010; Choudhary e Preterius, 2017). Além disso, apesar de serem popularmente conhecidos pela sua utilização em refrigerantes *diet* e outros produtos dietéticos, esses são encontrados em diversos outros tipos de produtos, incluindo aqueles que não fazem menção às palavras “*diet*” e “*light*”, desde alimentos para recém-nascidos. Assim como, também são utilizados na indústria farmacêutica, mascarando características organolépticas dos fármacos, e, em produtos para a higiene bucal (Freitas e Araújo, 2010; Saunders et al., 2010). Nesse contexto, diante da crescente busca e comercialização dos produtos dietéticos, aliada a possível exposição “oculta” aos edulcorantes, não parece ser impossível o alcance da IDA, sendo necessários maiores estudos sobre a ação dos mesmos, e em especial, visando identificar seus efeitos em longo prazo.

## 1.2. ASPARTAME

O aspartame ou éster metílico do dipeptídeo fenilalanina e ácido aspártico, é um edulcorante artificial obtido a partir de dois aminoácidos, o ácido L-aspártico (ou aspartato) e L-fenilalanina, ligados por um éster de metila (Figura 1), e com fórmula química expressa em (C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Foi descoberto acidentalmente no ano de 1965, nos Estados Unidos, por James M. Schlatter, quando este tentava desenvolver um fármaco para o tratamento de úlceras (Stegink, 1987; Freitas, 2005).



**Figura 1.** Estrutura química do aspartame.

Fonte: adaptado de Von Poser Toigo (2015).

Após a realização de diversos estudos toxicológicos, seu uso foi aprovado como aditivo alimentar pela Food and Drug Administration (FDA) - órgão norte americano responsável por testar drogas, alimentos e cosméticos - em 1981, para consumo na forma de edulcorante em pó e, pouco depois, em 1983, foi aprovado

para uso em bebidas carbonatadas (Roberts, 1996). Em 1996, foi aprovado para uso em todos os alimentos e bebidas, inclusive em produtos como xaropes (Gougeon et al., 2004).

O aspartame tem o mesmo valor calórico da sacarose (4 kcal/g), porém o seu poder de adoçar é 180-200 vezes maior, sendo utilizado em baixíssimas concentrações, o que o torna útil como adoçante e o classifica como não nutritivo. Sua apresentação é em pó branco, cristalino, inodoro, e com sabor residual imperceptível (Freitas 2005; Chattoṗadhyay et al., 2014). É largamente utilizado na indústria de alimentos devido a sua propriedade de acentuar o aroma e prolongar a percepção do sabor das frutas ácidas, tendo ótimos resultados quando utilizado especialmente na formulação de sucos e doces de frutas (Freitas, 2005). Contudo, quando submetido a temperaturas altas prolongadas e em meio ácido, sua estabilidade é prejudicada (Castro e Franco, 2002).

O consumo de aspartame é muito expressivo, estima-se por mais de 200 milhões de pessoas ao redor do mundo. Seu uso, além dos produtos *diet* e *light*, vem crescentemente sendo empregado em produtos industrializados comuns (Cardello et al., 2001; Freitas e Araújo, 2010; García-Almeida, 2013). Conforme Philippi (2014), o aspartame encontra-se em mais de 6 mil produtos, incluindo gêneros alimentícios (biscoitos, doces, bebidas, sobremesas, congelados, etc.), adoçantes de mesa sob diferentes marcas e em cerca de mais de 600 remédios e outros itens farmacêuticos. Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que este edulcorante esteja presente em 77% dos refrigerantes em geral (Abdel-Salam et al., 2012a). Estes dados demonstram a exposição contínua ao aspartame por uma grande parcela da população.

Após a ingestão, o aspartame é metabolizado por enzimas no lúmen intestinal, sendo hidrolisado completamente em dois aminoácidos, fenilalanina (50%) e ácido aspártico (40%), e uma molécula de metanol (10%) (Hooper et al., 1994; Humphries et al., 2008). Após a hidrólise, ocorre a absorção de seus metabólitos seguida da entrada na circulação sistêmica, onde cada composto segue uma via metabólica diferente (Magnuson et al., 2007).

Uma consideração importante a respeito dos metabólitos do aspartame é que estes também são encontrados naturalmente nos alimentos. O leite, por exemplo, tem aproximadamente 6 vezes mais fenilalanina e 13 vezes mais ácido aspártico do que o mesmo volume de uma bebida adoçada com aspartame. O suco de tomate, por sua vez, tem 6 vezes mais metanol do que um volume equivalente de uma bebida adoçada com aspartame. Contudo, os aminoácidos quando presentes naturalmente nos alimentos são ligados a uma proteína e, assim, liberados lentamente no corpo durante a digestão e o metabolismo. Contudo, tem se visto que, as chamadas formas livres de aminoácidos, encontradas em bebidas adoçadas com aspartame, são liberadas rapidamente, e em maiores concentrações. O metanol liberado durante o metabolismo do aspartame também parece ocorrer de tal forma. Por esse motivo, a ingestão crônica do aspartame e, de seus metabólitos, vem trazendo preocupações (Magnuson et al., 2007; Choudhary e Preterius, 2017).

Com relação à IDA do aspartame, as autoridades reguladoras de alimentos no Canadá e Europa estabeleceram a dose de 40 mg/kg de peso corporal/dia, adotada também pela ANVISA no Brasil (Lean e Hankey, 2004; Mortelmans et al., 2008). Nos EUA, a FDA definiu a ingestão do aspartame em 50 mg/kg de peso corporal/dia (Butchkho, 2002). Estas autoridades confirmam a segurança do consumo de aspartame, dentro de seus limites, exceto para indivíduos com fenilcetonúria, que devem evitar o uso de aspartame já que a fenilalanina é um de seus metabólitos gerados.

Contudo, desde sua aprovação, o aspartame continua sendo objeto de muitos estudos no que se refere à segurança do seu uso e ao conhecimento de seus efeitos no metabolismo tanto em humanos quanto em modelos animais. Enquanto alguns estudos não identificaram efeitos adversos e/ou colaterais com o consumo de aspartame (Trefz et al., 1994; Goerss et al., 2000), outros encontraram alterações preocupantes, tanto em nível de

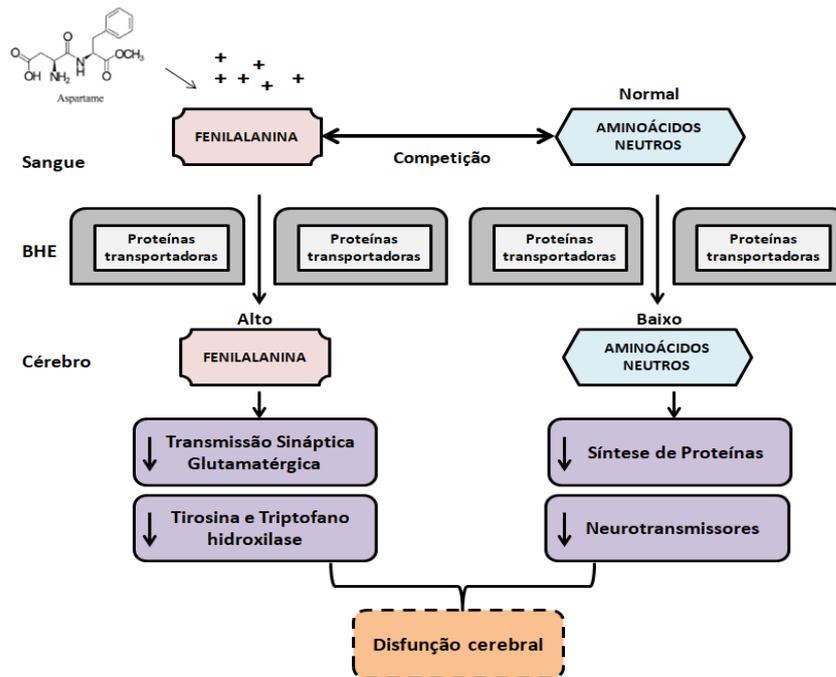
distúrbios neurocomportamentais (Abdel-Salam et al., 2012b ; Ashok et al., 2014; Finamor et al., 2014; Lindseth et al., 2014; Onaolapo et al., 2016; Erbas et al., 2018), quanto metabólicos (Swithers e Davidson, 2008; Swithers et al., 2009; Swithers, 2013; Fowler et al., 2015; Frankenfeld et al., 2015; Kuk e Brown, 2016; Nettleton et al., 2016). Essas evidências sugerem que o aspartame pode afetar diversas funções sistêmicas como equilíbrio energético e metabolismo, modo de ação dos receptores de sabor doce e percepção do paladar, microbiota intestinal, além de afetar processos cerebrais como aprendizagem e memória. Apesar das controvérsias, o aspartame continua sendo o edulcorante artificial mais amplamente utilizado (Magnuson et al., 2007).

### 1.3. ASPARTAME E SISTEMA NERVOSO

Como já mencionado, após a ingestão, o aspartame é metabolizado por enzimas intestinais em três compostos, fenilalanina, ácido aspártico e metanol. Elevações nas concentrações plasmáticas de fenilalanina e de ácido aspártico podem resultar no aumento do transporte desses aminoácidos para o cérebro, uma vez que podem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), e assim acarretar em alterações na composição neuroquímica cerebral (Humphries et al., 2008; Choudhary e Lee, 2017). Alguns pesquisadores, por exemplo, já relataram aumentos substanciais nas concentrações desses aminoácidos, e subsequentemente alterações na produção e regulação de neurotransmissores, após a ingestão de aspartame (Stegink et al., 1988; Rycerz e Jaworska-Adamu, 2013).

Após a entrada no organismo a fenilalanina pode seguir duas vias de metabolização. Uma parte é convertida em tirosina no fígado, pela ação da enzima fenilalanina hidroxilase, enquanto a porção restante, não convertida em tirosina, vai ligar-se aos transportadores de aminoácidos neutros de cadeia longa (TANCL) (Daubner et al., 2000). Um grande número de substâncias, chamadas de aminoácidos neutros, incluindo a tirosina e a fenilalanina, competem umas com as outras por um sítio de ligação nesses transportadores, pois assim é a única maneira pela qual podem atravessar a BHE. Adicionalmente, é importante ressaltar que a tirosina não pode ser sintetizada no cérebro, sendo o transporte via TANCL essencial para a manutenção dos níveis cerebrais da mesma. A tirosina, uma vez que cruza a BHE, é convertida em 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) pela enzima tirosina hidroxilase, posteriormente formando catecolaminas, tais como dopamina, noradrenalina e adrenalina. Os TANCL também são co-transportadores de outros aminoácidos, como triptofano, metionina, isoleucina, leucina e outros, com todos eles competindo pelo mesmo transportador. Portanto, uma grande quantidade de algum desses aminoácidos na corrente sanguínea, ao competir com os demais, vai ocupar a maior parte destes transportadores (Daubner et al., 2000; Humphries et al., 2008). A ingestão de aspartame, por sua vez, aumenta substancialmente os níveis de fenilalanina no plasma, o que faz com que os transportadores localizados na BHE apresentem maior afinidade para a fenilalanina do que para o restante dos aminoácidos, ocorrendo um aumento substancial do aporte deste aminoácido para o cérebro e consequentemente uma diminuição dos demais (Choi e Pardridge, 1986; Matalon et al., 2003; Choudhary e Lee, 2017). Essas alterações no cérebro podem levar ao comprometimento na produção de diversos neurotransmissores e danos na síntese protéica (Figura 2). A diminuição de triptofano e tirosina, por exemplo, afeta a produção dos seus respectivos neurotransmissores serotonina (5-HT) e dopamina (DA), quais exercem importantes funções cerebrais, incluindo cognição e humor (Matalon et al., 2003). Dessa forma, postula-se que o aspartame pode potencialmente prejudicar uma série de processos, uma vez que essas alterações na neuroquímica cerebral podem acarretar em consequências funcionais ou comportamentais importantes (McKean, 1972; Maher e Wurtman, 1987; Matalon et al., 2003; Choudhary e Lee, 2017).

De forma significativa, alterações cognitivas, como comprometimento no aprendizado e memória, avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos, têm sido associados ao aspartame (Abdel-Salam et al., 2012b, Abu-Taweel et al., 2014, Lindseth et al., 2014; Erbas et al., 2018), e estes incluem déficits em atenção complexa, processamento ineficiente de informações, percepção espacial reduzida e perda de memória em longo prazo. Ademais, outros efeitos neurológicos como cefaleia, enxaqueca, humor irritável, ansiedade, depressão e prejuízo do sono têm sido associados ao consumo do aspartame. Estes sintomas foram observados paralelamente ao aumento do aspartame no suprimento geral de alimentos (Fernstrom, 1983; Johns, 1985; Maher e Wurtman, 1987; Romano et al., 1990; Soffritti et al., 2006).



**Figura 2.** Possíveis mecanismos do aspartame no cérebro via fenilalanina.

Fonte: adaptado de Choudhary e Lee, 2017.

O ácido aspártico é outro aminoácido presente no aspartame. Em quantidades elevadas, é capaz de atravessar a BHE e, uma vez no cérebro, de ligar-se ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) ou a outros sítios de ligação ao glutamato, causando um influxo de íons cálcio nas células (Robinson e Coyle, 1987). É considerado uma espécie de aminoácido excitatório, e o cérebro utiliza destes aminoácidos como neurotransmissores regulares para transmissão sináptica, porém é necessário um equilíbrio delicado de substâncias excitatórias e inibitórias a fim de manter a homeostase cerebral. Quando em altas concentrações no cérebro, o ácido aspártico pode comprometer o equilíbrio sináptico, sendo capaz de provocar alterações funcionais no sistema nervoso, como transtornos de humor e danos cognitivos (Park et al., 2000; Humphries et al., 2008). Além disso, o aumento no disparo de potenciais de ação e consequentemente taxas mais altas de despolarização de neurônios podem causar excitotoxicidade, e potencializar a neurodegeneração (Robinson e Coyle, 1987; Errico et al., 2006).

Outro componente do aspartame é o metanol. Em primatas, o metanol é metabolizado em formaldeído no fígado pela álcool desidrogenase. Em roedores, por outro lado, o metanol é metabolizado principalmente pela álcool catalase. Posteriormente, o formaldeído é oxidado em ácido fórmico pela formaldeído desidrogenase, tanto em primatas quanto em roedores. O ácido fórmico é, por sua vez, o principal responsável pela toxicidade do metanol. Sua metabolização ocorre por meio de sua conjugação com tetrahidrofolato,

substância que depende da nutrição de ácido fólico. Ao final da via, é metabolizado a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O) (Dorokhov et al., 2015). Ao que parece, os seres humanos são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do metanol devido à sua lenta oxidação e ao baixo conteúdo de folato no fígado em comparação com outros animais, como roedores (Johlin et al., 1987).

Rycerz e Jaworska-Adamu (2013) relataram casos de acidose metabólica e lesões oculares relacionados ao consumo de aspartame, quais se atribuíram ao metanol. Além disso, estudos têm apontando a associação do metanol com desequilíbrio redox e consequente situação de estresse oxidativo, uma vez que sua metabolização é acompanhada pela formação de radicais livres no organismo (Mourad e Noor, 2011; Abdel-Salam et al., 2012a,b).

O estresse oxidativo ocorre quando existe desequilíbrio entre os processos antioxidantes e pró-oxidantes no organismo, devido à: produção excessiva de radicais livres ou pela ineficiência das defesas antioxidantes ou, ainda, pela combinação de ambas, podendo levar a processos fisiopatológicos que resultam em toxicidade celular, e culminar com a morte das células (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os efeitos danosos do estresse oxidativo afetam todos os tecidos, porém, o Sistema Nervoso Central (SNC) é particularmente mais sensível em virtude da alta taxa de consumo de oxigênio (Mahadik et al., 2001) e dos elevados níveis de lipídeos poliinsaturados, quais são vulneráveis aos ataques dos radicais livres e capazes de sofrer peroxidação lipídica (Dringen, 2000). Além disso, o cérebro é bastante vulnerável a danos oxidativos devido ao seu relativo baixo conteúdo de defesas antioxidantes e ao alto conteúdo de metais, quais podem catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (Mcquillen e Ferriero, 2004). O aumento do estresse oxidativo neuronal produz efeitos deletérios sobre a transdução de sinal, plasticidade estrutural e resistência celular, principalmente por indução da peroxidação lipídica nas membranas, dano em proteínas e em genes (Gama et al., 2008a,b). Desta forma, os neurônios e as células gliais são particularmente vulneráveis ao estado redox, e são dependentes da manutenção da atividade neurotrófica, a qual pode ser afetada pelo estresse oxidativo (Kunz et al., 2008; Kapczinski et al., 2009).

Estudos experimentais têm mostrado que a administração de aspartame induz uma situação de estresse oxidativo, uma que vez que é capaz de gerar danos oxidativos em proteínas e lipídeos, e diminuir significativamente a atividade de enzimas antioxidantes em tecidos hepáticos, renais e cerebrais, bem como aumentar a produção de oxidantes (Abhilash et al., 2011; Mourad e Noor, 2011; Abdel-Salam et al., 2012a,b; Finamor et al., 2014; Ashok et al., 2015; Prokic, 2017; Adaramoye e Akanni, 2016; Alwaleedi, 2016).

Dessa forma, tem se visto que os componentes do aspartame podem alterar a composição neuroquímica cerebral, impactando, por exemplo, nos níveis de neurotransmissores no cérebro e, induzindo a uma situação de estresse oxidativo. Assim como, efeitos comportamentais também podem ser acompanhados dessas alterações neuroquímicas associadas a ingestão de aspartame.

#### 1.4. ASPARTAME E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

A obesidade é um dos principais problemas mundiais que afligem a sociedade atual e sua incidência vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas. Ao longo dos anos, estudos têm fornecido evidências de que o consumo de uma dieta rica em açúcares pode ser um importante fator para explicar o aumento na prevalência da obesidade e da síndrome metabólica (SM) observada nos seres humanos (Fowler et al., 2008; Johnson et al., 2013; Ludwig, 2013). A SM é um conjunto de alterações, na qual se inclui resistência à insulina, obesidade visceral, altos níveis de colesterol total (CT) e triglicérides (TG), baixos níveis séricos de lipoproteína de alta densidade (HDL) e hipertensão, qual aumenta o risco para doenças cardiovasculares e

diabetes mellitus tipo 2 (Popkin e Nielsen, 2003; Saris e Tarnopolsky, 2003; Schulze et al., 2004; Swithers, 2013). Uma grande parte dessas alterações também foram observadas em ratos alimentados com altos teores de frutose (Oron-Herman et al., 2008) ou com dieta rica em sacarose (Perez-Torres et al., 2011), sugerindo que, de forma semelhante aos humanos, roedores também são susceptíveis ao desenvolvimento de SM induzida pela dieta descompensada.

Nessa perspectiva, há muitos anos o açúcar tem sido colocado entre o principal culpado da crescente epidemia da obesidade, e os edulcorantes agora, em virtude de suas características, vêm sendo considerados como “alimento saudável” (De la Peña, 2010). Entretanto, será que os edulcorantes realmente são os mocinhos?

Surpreendentemente, estudos e dados epidemiológicos têm demonstrado que esse aumento no percentual da população obesa coincide também com o aumento no uso disseminado de edulcorantes artificiais (Blundell e Hill, 1986; Malik et al., 2006; 2010; Fowler et al., 2008; Yang, 2010; Te Morenga et al., 2013; Rogers et al., 2016). Esta associação pode ser coincidente ou causal, de modo que qualquer direção é plausível, uma vez que existem extensas controvérsias em relação ao uso de edulcorantes e o seu papel no balanço energético. Enquanto alguns estudos sugerem que estes podem auxiliar no controle do peso corporal (Blackburn et al., 1997; Raben et al., 2002; De la Hunty et al., 2006), outros vêm questionando a efetividade em relação à perda e manutenção da massa corpórea (Wurtman, 1983; Blundell e Hill, 1986; Tordoff e Alleva, 1990; Blundell e Green, 1996; Swithers e Davidson, 2008; Swithers et al., 2009;2010; Anton et al., 2010; Feijó et al., 2013), bem como seus resultados sobre os perfis lipídicos e glicêmicos (Souza et al., 2010; Suez et al., 2014; Von Poser Toigo et al., 2015; Green e Syn, 2019).

Vários mecanismos, centrais e periféricos, identificados especialmente a partir de estudos em animais, têm sido propostos para explicar a associação epidemiológica entre o consumo de edulcorantes e as alterações metabólicas. Apesar disso, ainda não existe um consenso na literatura sobre quais de fato estão em atuação, existindo possibilidade ainda de ação sinérgica entre eles. Dentre os principais mecanismos hipotetizados encontram-se: ativação dos receptores de sabor doce (Margolskee et al., 2007; Pepino e Bourne, 2011), comportamento alimentar compensatório (Swithers et al., 2013; Von Poser Toigo et al., 2015; Murray et al., 2016) e alteração de neurotransmissores cerebrais (Wurtman, 1983; Anton et al., 2010; Abdel-Salam et al., 2012a; Murray et al., 2016). Alterações da microbiota intestinal (Gill et al., 2006; Ley et al., 2006; Cani e Delzenne, 2009; Pepino e Bourne, 2011; Frankenfeld et al., 2015; Green e Syn, 2019) e indução de estresse oxidativo (Collison et al., 2012a,b) também vêm sendo associadas mais recentemente.

Os receptores de doces estão presentes na boca e também nas células enteroendócrinas intestinais, são responsáveis pela percepção do sabor doce, e capazes de serem estimulados por substâncias edulcorantes. Normalmente, quando se ingere um alimento com açúcar, o sabor doce deste promove a ativação da chamada fase cefálica da digestão, que consta na preparação do corpo para a chegada de tal alimento, incluindo tanto a liberação de enzimas, hormônios e outras substâncias que participam da digestão, quanto a regulação energética corpórea (Koeppen e Stanton, 2009). No entanto, o consumo crônico de edulcorantes artificiais promoveria uma desregulação na capacidade do sabor doce de ativar tal fase cefálica, resultando em um prejuízo da regulação energética e ingestão excessiva (Davidson et al., 2011). Esses mecanismos foram suportados pelos estudos de Swithers e Davidson em modelos animais (Swithers e Davidson, 2008; Swithers et al., 2009;2010;2013; Davidson et al., 2011).

Em somatória, o hipotálamo secreta vários neuropeptídeos para regular a energia, o balanço osmótico e o comportamento alimentar, e tem sido reconhecido como o mediador da via de recompensa pós-ingestão (Smeets et al., 2005; Avena et al., 2008). O núcleo arqueado do hipotálamo é uma região posicionada

próxima a capilares fenestrados na base do hipotálamo, o que o coloca em contato com importantes hormônios como a leptina (Glaum et al., 1996) e a insulina (Muroya et al., 1999). Alguns estudos demonstraram danos nessa região associados ao consumo de aspartame (Swithers et al., 2009; Yang, 2010), o que poderia explicar, em parte, o comportamento alimentar compensatório. Além disso, estudos recentes sugerem que os edulcorantes artificiais não ativam a via de recompensa alimentar da mesma maneira que os componentes naturais dos alimentos, pois a falta de contribuição calórica elimina o componente pós-ingestivo (Sclafani e Ackroff, 2004), perdendo, pelo menos em parte, esse controle hipotalâmico da ingestão de alimentos, especialmente no que diz respeito ao sabor doce.

Outro ponto que parece estar fortemente envolvido nessa relação associa-se a alterações no equilíbrio cerebral. Como já apontado, níveis elevados de fenilalanina, devido ao consumo elevado/crônico de aspartame, poderiam potencialmente acumular no cérebro, e assim resultar em desequilíbrio nas concentrações de neurotransmissores. Abdel-Salam et al. (2012a), por exemplo, demonstraram uma diminuição de 5-HT e DA no encéfalo de camundongos tratados cronicamente com aspartame. Estes neurotransmissores, por sua vez, além de seus efeitos sobre a cognição, também são importantes para regulação do comportamento alimentar, saciedade e balanço energético (Wurtman, 1983; Blundell e Lawton, 1995; White et al., 2000; Palmiter, 2007; Bertthoud e Morrison, 2008).

Uma nova hipótese que vem crescendo consideravelmente é de que os edulcorantes artificiais, como o aspartame, atuam na modulação da microbiota intestinal (Clemente et al., 2012). A hipótese que se sugere, é de que as alterações provocadas por essas substâncias estão associadas ao fenômeno da endotoxemia metabólica - desenvolvimento de um estado inflamatório de baixo grau pela microbiota intestinal - que, ao final, promove o desenvolvimento da resistência à insulina e ganho de peso. De forma geral, postula-se que os edulcorantes artificiais são capazes de desencadear um processo de disbiose e consequente inflamação intestinal qual resulta na liberação de lipopolissacarídeos (LPS) no intestino. Este é absorvido na circulação, onde se liga a diferentes proteínas e receptores que ativam células imunes inatas, quais iniciam, por sua vez, diversos processos inflamatórios sistêmicos através da liberação de citocinas inflamatórias. Essa superprodução de citocinas ativa vias adicionais de sinalização nas células metabólicas que culminam em dessensibilização à insulina, expressão alterada de proteínas responsáveis pelo transporte de glicose, permeabilidade intestinal aumentada, estresse oxidativo, inflamação do tecido adiposo e ganho de peso (Cani et al., 2007; Tanti et al., 2013; Liauchonak et al., 2019).

Por fim, o estresse oxidativo, já descrito na sessão anterior, também vem sendo postulado, uma vez que se sabe que este pode causar um desequilíbrio na homeostase corporal, inclusive na composição da microbiota intestinal, bem como danos estruturais e funcionais em diferentes células, que podem repercutir, além de prejuízos ao SNC, no desencadeamento das desordens metabólicas (Collison et al., 2012a,b).

Todos esses mecanismos, por sua vez, podem refletir sobre o ganho de peso, e sobre alterações na glicemia e nos níveis de colesterol e triglicérides, tanto diretamente como decorrente do ganho corporal, visto que a obesidade pode contribuir posteriormente para o aparecimento de outras doenças crônicas. Contudo, apesar dos estudos terem demonstrando uma associação entre o consumo de edulcorantes artificiais e distúrbios metabólicos em humanos, e de todos os dados existentes mostrando a causalidade entre a exposição a estas substâncias e distúrbios metabólicos em animais, muito ainda é necessário para entender exatamente como essa interação ocorre. Seus efeitos sobre a fome, a saciedade e o impacto no peso corporal, bem como sobre os perfis lipídico e glicêmico, permanecem contraditórios e não conclusivos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Investigar alterações comportamentais, bioquímicas e metabólicas em ratos *Wistar*, machos e fêmeas, submetidos à administração repetida de aspartame.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar parâmetros comportamentais cognitivos relacionados à memória espacial por meio do labirinto em y, em ratos *Wistar*, machos e fêmeas, submetidos à ingestão oral crônica de aspartame nas doses de 35, 80 e 160mg/kg;
2. Avaliar parâmetros comportamentais cognitivos relacionados à memória aversiva por meio do teste de esquiwa inibitória, em ratos *Wistar*, machos e fêmeas, submetidos à ingestão oral crônica de aspartame nas doses de 35, 80 e 160mg/kg;
3. Analisar os efeitos da administração crônica de aspartame, nas doses de 35, 80 e 160mg/kg, sobre danos oxidativos em cérebro de ratos *Wistar* machos e fêmeas;
4. Analisar os efeitos da administração crônica de aspartame, nas doses de 35, 80 e 160mg/kg, sobre o sistema de defesa antioxidante em cérebro de ratos *Wistar* machos e fêmeas;
5. Quantificar o ganho de peso corporal e o consumo alimentar dos ratos *Wistar*, machos e fêmeas, submetidos à ingestão oral crônica de aspartame nas doses de 35, 80 e 160mg/kg;
6. Comparar o perfil glicêmico entre o início e final do tratamento crônico com aspartame nas doses de 35, 80 e 160mg/kg, de ratos *Wistar* machos e fêmeas;
7. Mensurar o perfil lipídico de ratos *Wistar*, machos e fêmeas, submetidos à ingestão oral crônica de aspartame nas doses de 35, 80 e 160mg/kg.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei Arouca nº 11.794/2008. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), seguido do protocolo 055/2018-2 (Anexo A). Foram utilizados ao total 80 ratos *Wistar*, sendo 40 machos e 40 fêmeas, a partir do desmame (21 dias após o nascimento), obtidos do Centro de Experimentação Animal da UNESC. Os animais foram alojados em caixas de polietileno (5 animais cada), com comida padrão e água controlada e mantidos em um ciclo de 12 horas claro - escuro (a luz é ligada às 7h da manhã), com temperatura controlada de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 3.2. ADMINISTRAÇÕES

Os animais receberam aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg, conforme grupo experimental, por gavagem via oral (v.o), uma vez ao dia, a partir do primeiro dia do desmame até o 60º dia de vida. O grupo que não recebeu o aspartame foi administrado com água. O tempo de protocolo (40 dias), as doses e via de administração foram baseadas conforme compilado de estudos prévios descritos na literatura em modelos com roedores (Abu-Taweel et al., 2014; Adaramoye e Akanni, 2016; Onaolapo et al., 2016; Silva et al., 2016; Solis-Medina, 2018).

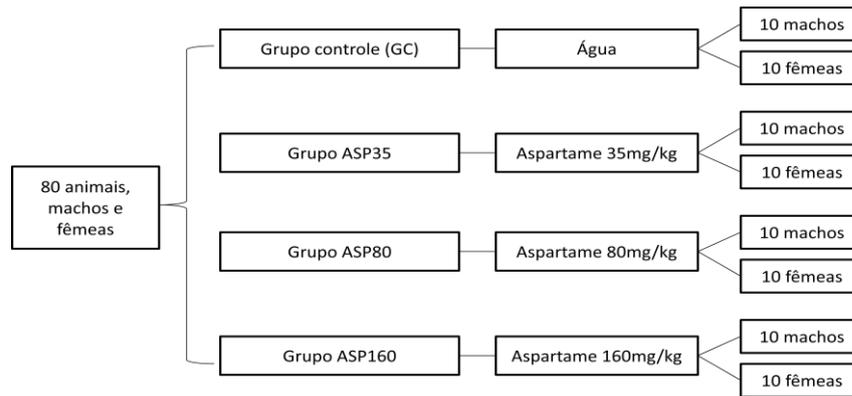
##### 3.2.1. Preparo do aspartame

O aspartame utilizado na referida pesquisa foi adquirido em um comércio local na cidade de Criciúma/SC. Apresentação em sachês, na forma em pó, da marca Zero Cal®. Este foi diluído diariamente em água previamente aquecida, conforme as doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg, e administrado v.o.

##### 3.2.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos com n de 10 animais para cada gênero, conforme descrito abaixo e figura 3.

1. Grupo controle (GC) – tratados com água;
2. Grupo ASP35 – tratados com aspartame na dose de 35mg/kg v.o.;
3. Grupo ASP80 – tratados com aspartame na dose de 80mg/kg v.o.;
4. Grupo ASP160 – tratados com aspartame na dose de 160mg/kg v.o.

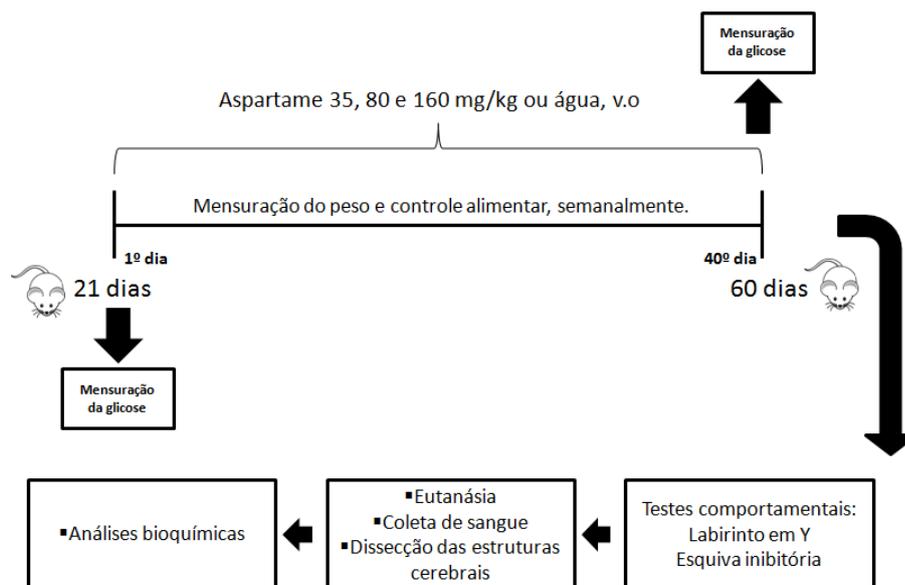


**Figura 3.** Grupos experimentais.

Fonte: do autor, 2019.

### 3.2.3. Desenho experimental

A administração do aspartame ocorreu por gavagem v.o nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160 mg/kg, conforme cada grupo, uma vez ao dia, a partir do primeiro dia do desmame (21 dias após o nascimento) até completarem 60 dias de vida, totalizando 40 dias de tratamento. Os animais que não receberam aspartame receberam água (controle). No último dia do experimento, os animais foram submetidos sequencialmente aos testes comportamentais do labirinto em y e esquivia inibitória. Ao fim do último teste, foram eutanasiados por decapitação em guilhotina, seguida da coleta de sangue e dissecação das estruturas cerebrais: córtex frontal, hipocampo e estriado. Imediatamente após cada coleta, as estruturas foram colocadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até as análises de estresse oxidativo. O sangue coletado foi submetido à centrifugação, e após, armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até as análises de perfil lipídico. A glicemia de todos os animais também foi mensurada, no primeiro e último dia do experimento. Ao longo de todo o experimento os animais foram pesados e o consumo alimentar monitorado, ambas avaliações ocorreram semanalmente (Figura 4).



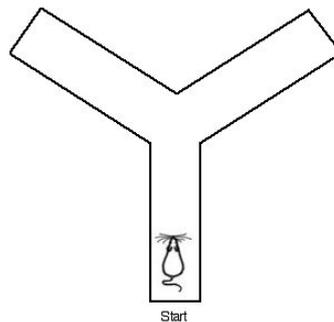
**Figura 4.** Desenho experimental.

Fonte: do autor, 2019.

### 3.3. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

#### 3.3.1. Labirinto em Y

No último dia de tratamento, após a administração das doses de aspartame ou água, os animais foram submetidos à avaliação no labirinto em y (y-maze). Esse teste é realizado para avaliar a memória de reconhecimento espacial dos animais. O aparelho utilizado é feito de MDF e possui três braços iguais (50 x 10 x 20 cm, cada braço) afastados em 120° (Figura 5) e com dicas visuais nas paredes dos braços para facilitar a localização espacial dos animais. O protocolo consiste de duas sessões separadas por um intervalo de 2 horas. Na primeira sessão (treino), um braço do labirinto ficou bloqueado por uma porta guilhotina. Nesta sessão, o animal foi colocado no final de um dos três braços, denominado de braço de “partida”, e teve livre acesso para explorar o “outro braço” disponível, durante 5 minutos. Ao final dos 5 minutos os animais retornaram a caixa moradia. Após 2 horas, na segunda sessão (teste), o animal novamente foi colocado no braço de “partida” do labirinto, e pode explorar livremente os três braços durante 5 minutos, já com o braço que estava fechado anteriormente, chamado de braço “novo” disponível para exploração. O tempo de permanência em cada braço foi registrado para avaliar a preferência dos animais por explorar o braço “novo” que não pode ser explorado na primeira sessão (Deacon e Rawlins, 2006).

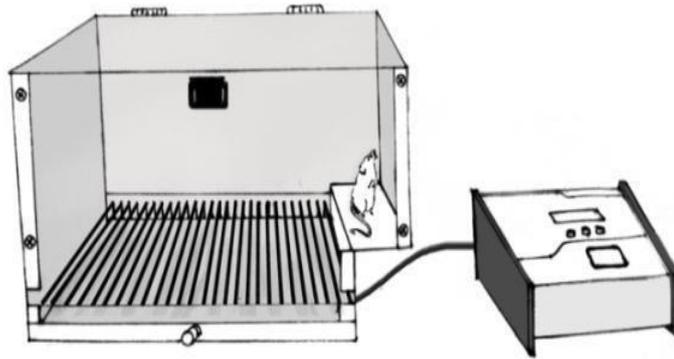


**Figura 5.** Esquema simplificado do labirinto em y.

Fonte: <http://www.ratbehavior.org/RatsAndMazes.htm>. Acesso em setembro de 2019.

#### 3.3.2. Esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória é utilizado para avaliar a memória aversiva dos animais. O aparelho é constituído por uma caixa medindo 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura. Parte do chão é formado por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro) que se distanciam umas das outras por um espaço de 1 cm entre elas. Na parede esquerda do aparelho está inserida uma plataforma de 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento (Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 2004) (Figura 6). O teste comportamental foi iniciado com uma sessão denominada treino, que ocorreu 24 horas após a última administração do tratamento. Os animais foram então colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer com as quatro patas nas barras de metal foi anotado, este tempo é denominado de latência. Após a descida do animal, este recebeu um choque de 0,4 mA por 2 segundos. Imediatamente após o treino, o roedor foi submetido à segunda sessão, denominada como teste, sendo colocado novamente na plataforma e a latência anotada. Porém, nenhum choque a partir de então é acionado, avaliando desta maneira, a memória de trabalho. Uma hora e meia depois, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo para avaliação da memória de curta duração e, após 24 horas, para avaliação da memória de longa duração (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003).



**Figura 6.** Esquema simplificado da esquia inibitória.

Fonte: Costa, 2016.

### 3.4. ESTRESSE OXIDATIVO

#### 3.4.1. Marcadores de dano oxidativo

**Conteúdo de sulfidrilas:** Para determinar grupamentos tióis totais na amostra foi utilizado o reagente de cor 5,51-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), que reduz grupos tióis gerados, formando o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de coloração amarela, que é mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

**Carbonilação de proteínas:** A concentração de proteína das frações de proteína solúvel foi determinada de acordo com Levine et al. (1990). O teor de proteínas carboniladas foi medido pela formação inicial de derivados de hidrazona de proteína marcada usando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPT). Estes derivados foram extraídos sequencialmente com ácido tricloroacético a 10% seguido de tratamento com etanol/acetato de etilo, 1:1 (vol/vol) e reextração com ácido tricloroacético a 10%. O precipitado resultante foi dissolvido em hidróxido de sódio 3%. Cada amostra teve sua própria leitura de branco, passando pelo mesmo tratamento sem a adição do reagente de cor DNPT. Os resultados foram mostrados para cada amostra lida a 370 nm em um espectrofotômetro.

#### 3.4.2. Defesas antioxidantes

**Atividade da superóxido dismutase (SOD):** É medida pela inibição da oxidação da adrenalina, adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras cerebrais foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15  $\mu\text{L}$  foram retirados da mesma, na qual 5  $\mu\text{L}$  de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175185  $\mu\text{L}$  (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5  $\mu\text{L}$  adrenalina (60 mM em água destilada + 15 mL/mL de ácido clorídrico fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

**Atividade da glutatona peroxidase (GPx):** A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm, conforme Flohé e Günzler (1984). Os resultados foram calculados como U/mg de proteína, sendo que 1U corresponde a 1 $\mu\text{mol}$  de peróxido transformado em água por minuto.

**Quantificação de glutatona reduzida (GSH):** Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurada em homogenato de cérebro total

após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µM DTNB. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

### **3.4.3. Dosagem de proteínas**

Foi efetuada através do método de Lowry et al. (1951), usando-se a albumina sérica bovina como padrão.

## **3.5. PARÂMETROS METABÓLICOS**

### **3.5.1. Peso corporal e consumo alimentar**

Os animais foram pesados semanalmente ao longo de todo o experimento em balança digital única. O consumo alimentar foi calculado semanalmente, duas vezes na semana (início e final), pela pesagem da quantidade total de ração (g) fornecida aos animais, subtraindo o peso de ração (g) remanescente na gaiola.

### **3.5.2. Perfil glicêmico**

A glicemia foi mensurada no primeiro e último dia dos tratamentos, para fins de comparação. Para realizar esse procedimento, foi necessário furar a extremidade da calda do rato com uma agulha (13 x 0,45 mm) e colocar o sangue na fita medidora de glicose para a determinação da glicose sérica através de glicosímetro (fácil TRUEread®). O procedimento foi realizado antes da administração dos tratamentos com aspartame ou água.

### **3.5.3. Perfil lipídico**

Para a análise do perfil lipídico, o sangue coletado na decapitação foi centrifugado por 3.000 rpm a temperatura ambiente, por 10 minutos, para se obter o soro sanguíneo, que foi congelado e armazenado a -20°C até a análise das frações lipídicas. As concentrações séricas de colesterol total, fração-HDL e triglicerídeos seguiram ensaios enzimáticos colorimétricos utilizando kits comerciais (Vida Biotecnologia – colesterol total e triglicerídeos, e Labtest - HDL).

## **3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). O teste de esquia inibitória, as análises de estresse oxidativo, o perfil lipídico, o peso corporal e o consumo alimentar foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Para as análises de glicemia e do labirinto em y, o teste de comparação Dunn-Sidak foi utilizado após ANOVA. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de  $p < 0,05$ . Como pacote estatístico, foi utilizado o GraphPad Prism 8.0.1.

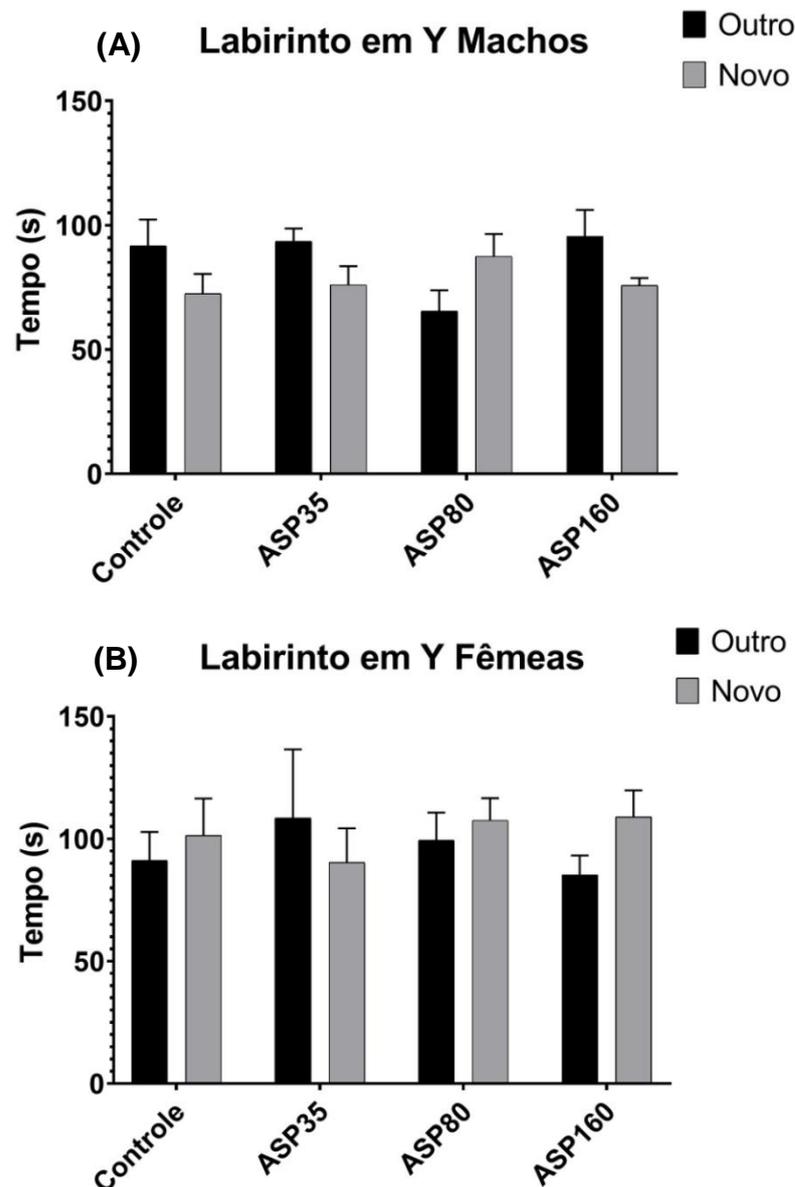
## **4. RESULTADOS**

### **4.1. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS**

A partir do último dia de tratamento os animais foram submetidos aos testes comportamentais do labirinto em y e da esquiva inibitória, para avaliação do perfil cognitivo.

#### **4.1.1. Labirinto em Y**

Após as últimas administrações das doses de aspartame ou água, os animais foram submetidos à avaliação no labirinto em y, qual consistiu em duas sessões separadas por um intervalo de duas horas, a fim de avaliar a preferência dos animais por explorar o braço “novo” que não pode ser explorado na primeira sessão. A figura 7 demonstra os resultados do teste em machos e fêmeas.

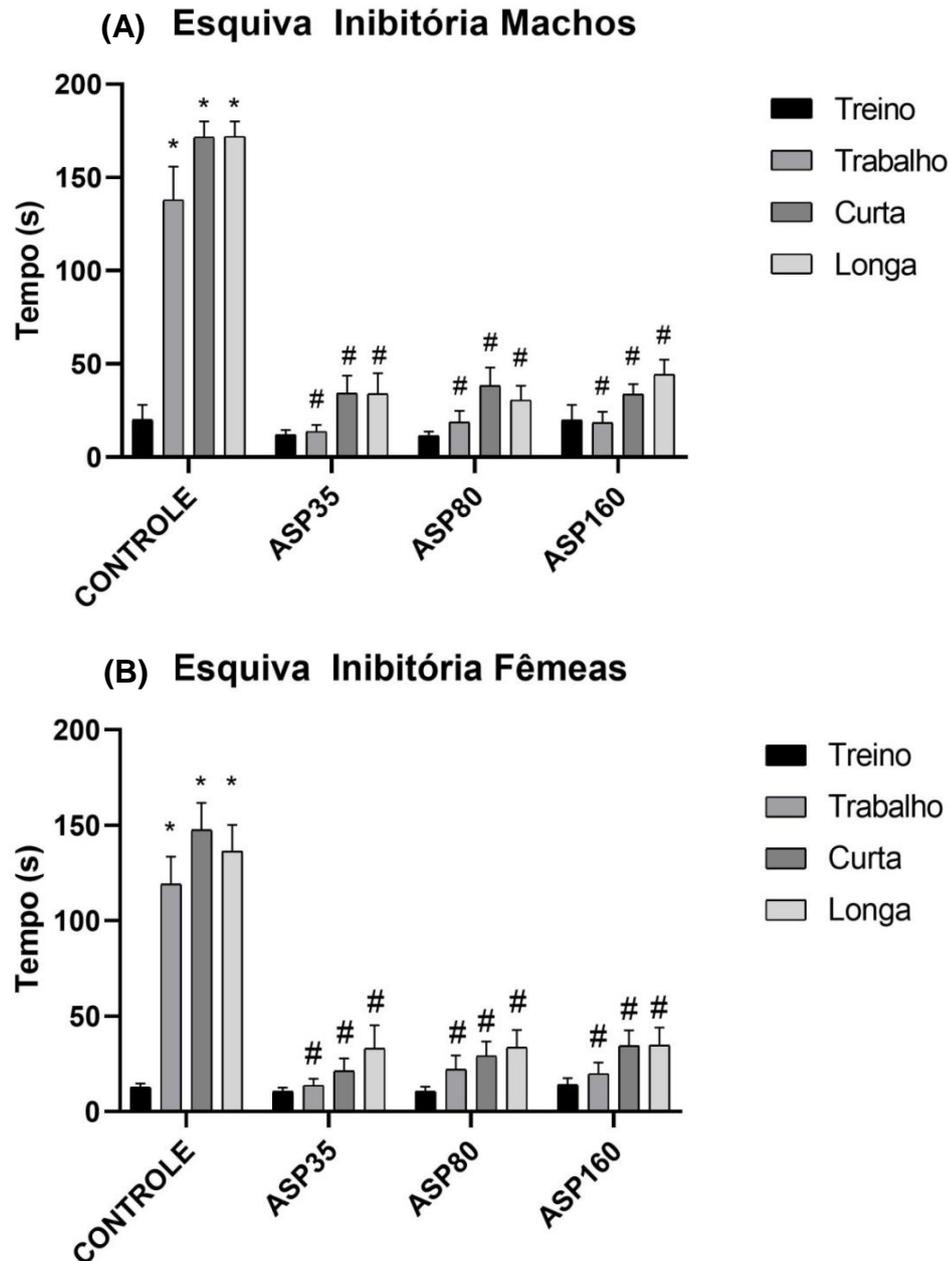


**Figura 7.** Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o labirinto em y em ratos *Wistar* machos (A) e fêmeas (B). O tempo de exploração em cada braço em segundos é apresentado como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=10 animais por grupo). Dados não significativos. Fonte: do autor, 2019.

Os resultados estão expressos pelo tempo de permanência no “braço novo” ou “outro braço”, e não demonstram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os mesmos, e entre os diferentes grupos, tanto nos machos quanto nas fêmeas.

#### 4.1.2. Esquiva inibitória

Vinte e quatro horas após a última administração dos tratamentos, os animais iniciaram o teste da esquiva inibitória. No primeiro momento foi iniciada a sessão treino, seguida da sessão teste para avaliação da memória de trabalho. Posteriormente, após uma hora e meia, os animais foram submetidos novamente ao protocolo para avaliação da memória de curta duração e, vinte e quatro horas depois para avaliação da memória de longa duração. A figura 8 demonstra os resultados do teste de esquiva inibitória em machos e fêmeas.



**Figura 8.** Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o teste de esquiva inibitória em ratos *Wistar* machos (A) e fêmeas (B). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=10 animais por grupo). \* diferente do treino de cada grupo. # diferente do mesmo tipo de memória do grupo controle.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey). Fonte: do autor, 2019.

Os resultados da figura 8 mostram que tanto os ratos machos quanto as fêmeas do grupo controle (água) apresentaram aumento na latência nos três tipos de memória ( $p < 0,05$ ) (memória de trabalho, memória de curta duração e memória de longa duração) quando comparados ao treino do mesmo grupo. Nos grupos aspartame (ASP35, ASP80 e ASP160), não foi possível observar o aprendizado dos animais quando estes foram comparados ao treino de seus respectivos grupos.

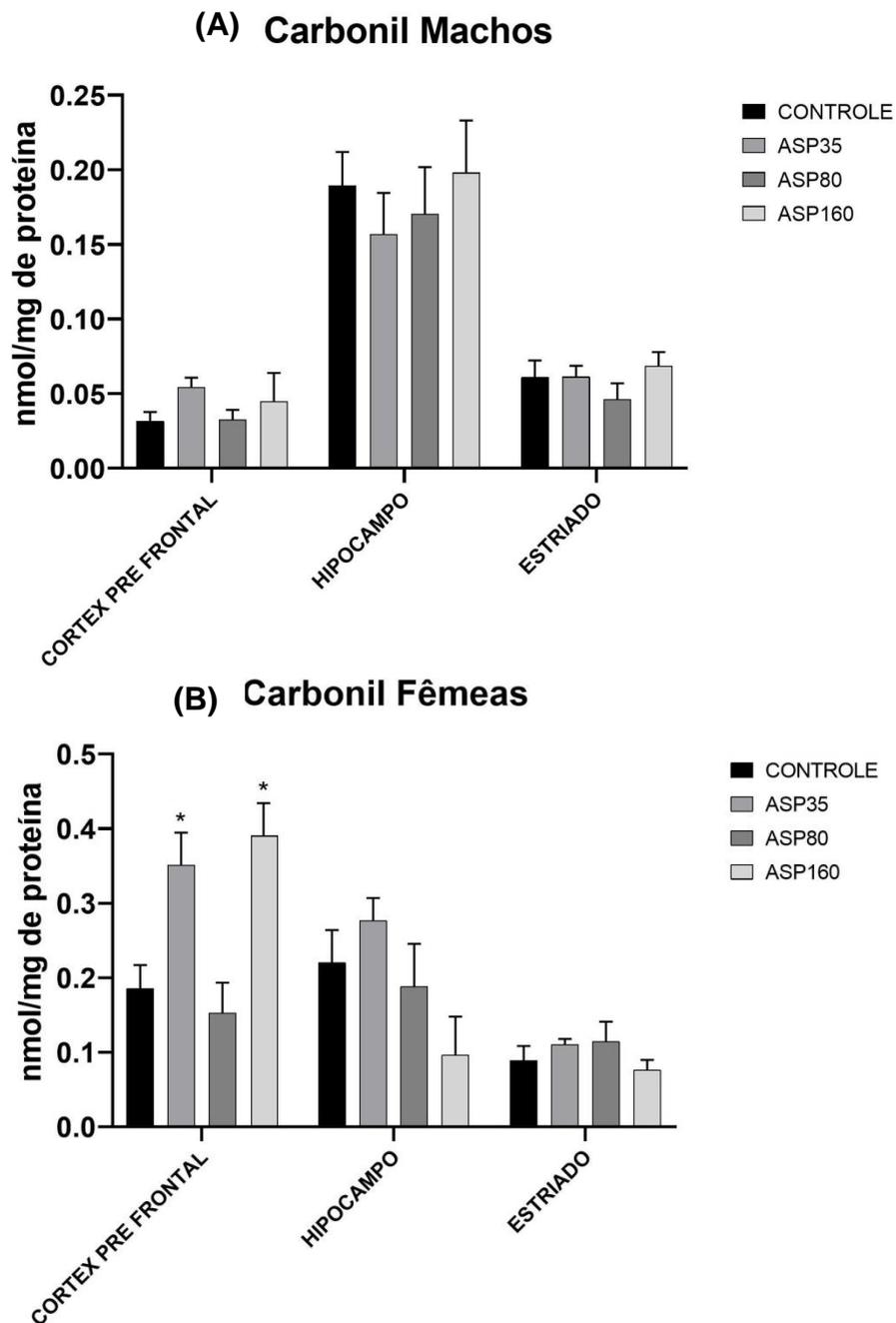
Ademais, os animais dos grupos ASP35, ASP80 e ASP160 demonstraram diminuição da memória de trabalho, de curta e longa duração quando comparados aos mesmos tipos de memória do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

As amostras cerebrais de córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram dissecadas, após eutanásia dos animais, para posteriores análises de estresse oxidativo.

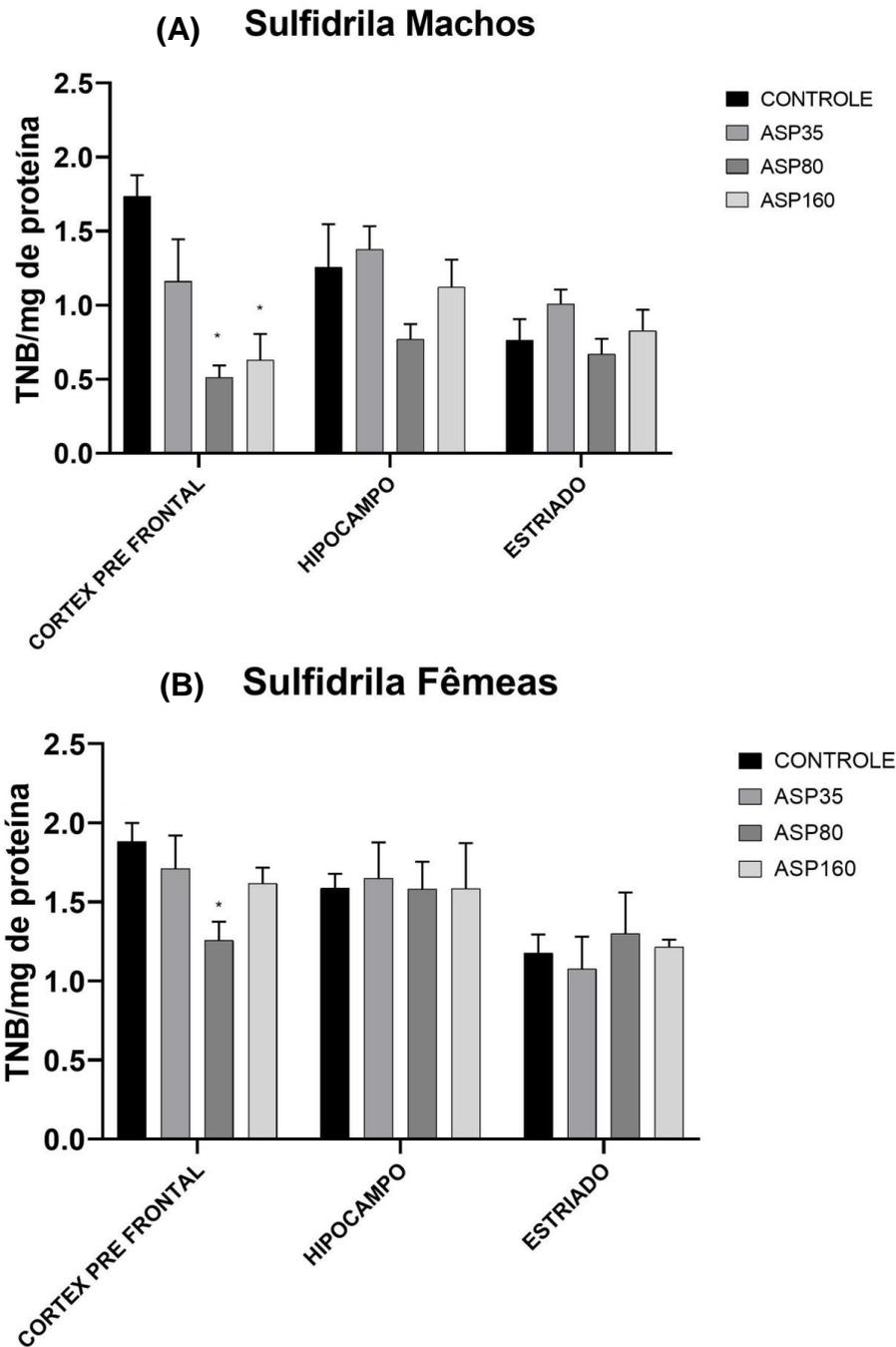
### 4.2.1. Dano oxidativo

Como marcadores de dano oxidativo foram mensurados os valores de grupos carbonílicos e sulfidrílicos. As figuras 9 e 10 demonstram os resultados dessas substâncias, respectivamente, em machos e fêmeas.



**Figura 9.** Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o conteúdo de grupo carbonil em ratos *Wistar* machos (A) e fêmeas (B). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=10 animais por grupo). \* diferente do grupo controle.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey). Fonte: do autor, 2019.

A figura 9 mostra que, nas fêmeas, a administração de aspartame nas doses de 35 e 160mg/kg foi capaz de aumentar os níveis de carbonilação protéica no córtex pré-frontal ( $p<0,05$ ). Nos machos não foram encontrados resultados significativos ( $p<0,05$ ).

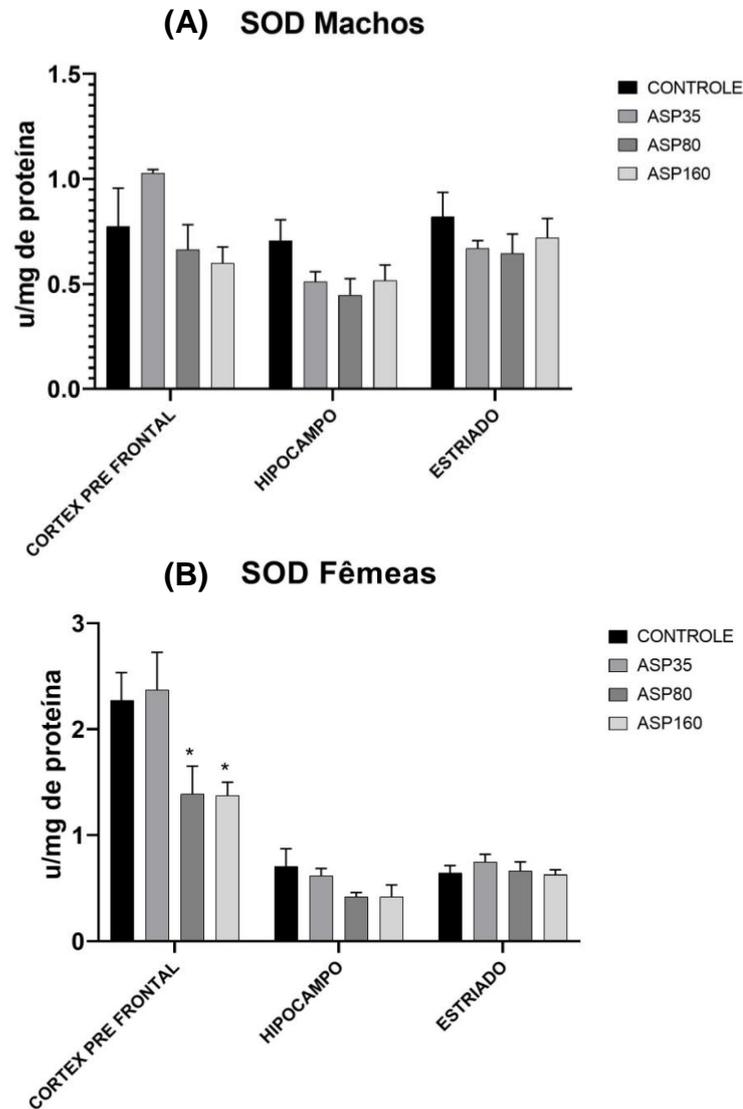


**Figura 10.** Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o conteúdo de grupo sulfidrilas em ratos *Wistar* machos (A) e fêmeas (B). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=10 animais por grupo). \* diferente do grupo controle.  $p<0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey). Fonte: do autor, 2019.

A figura 10 mostra que, nos machos, a administração de aspartame nas doses de 80 e 160mg/kg foi capaz de diminuir o conteúdo de grupos sulfidrilas no córtex pré-frontal ( $p<0,05$ ). Em fêmeas, a dose de 80mg/kg foi capaz de induzir o mesmo efeito ( $p<0,05$ ).

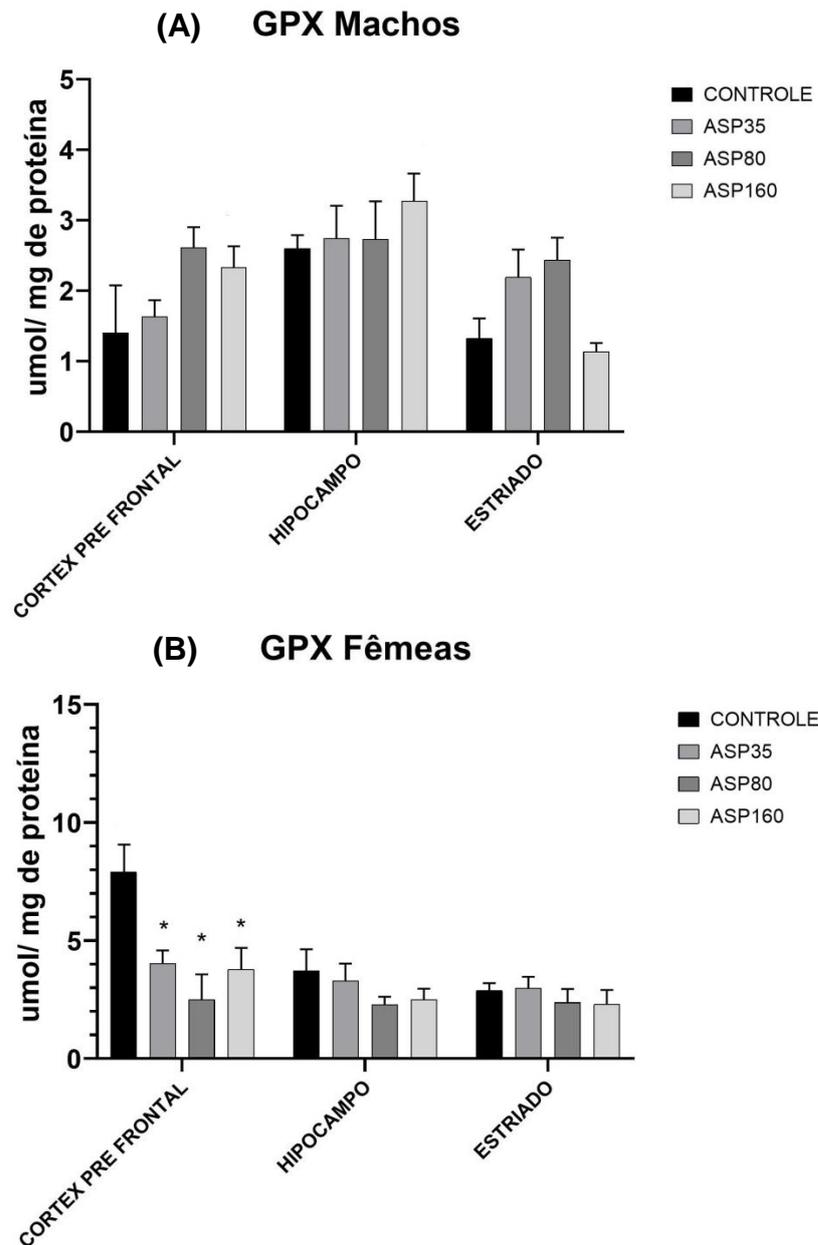
#### 4.2.2. Antioxidantes

Como linha de defesa antioxidante foram mensurados as atividades das enzimas SOD e GPx, e a quantificação de GSH. As figuras 11, 12 e 13 demonstram os resultados dessas substâncias, respectivamente, em machos e fêmeas.



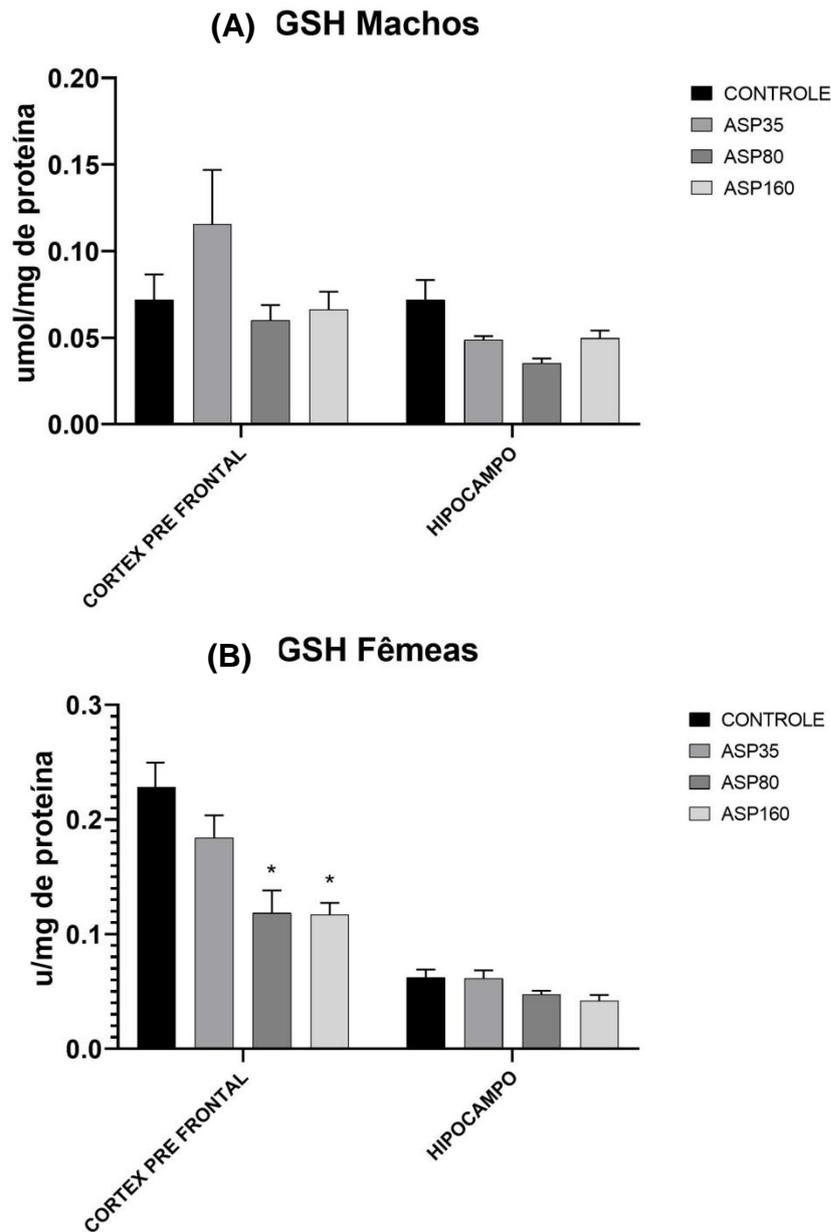
**Figura 11.** Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em ratos *Wistar* machos (A) e fêmeas (B). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=10 animais por grupo). \* diferente do grupo controle.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey). Fonte: do autor, 2019.

A figura 11 demonstra que, nas fêmeas, o aspartame nas doses de 80 e 160mg/kg diminuiu a atividade da enzima SOD no córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ). Nos machos não foram encontrados resultados significativos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12.** Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) em ratos *Wistar* machos (A) e fêmeas (B). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=10 animais por grupo). \* diferente do grupo controle.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey). Fonte: do autor, 2019.

A figura 12 demonstra que, nas fêmeas, o aspartame nas três doses administradas (35, 80 e 160mg/kg) diminuiu a atividade da enzima GPx no córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ). Nos machos não foram encontrados resultados significativos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13.** Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o conteúdo de glutatona redutase (GSH) em ratos *Wistar* machos (A) e fêmeas (B). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=10 animais por grupo). \* diferente do grupo controle.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey). Fonte: do autor, 2019.

A figura 13 demonstra que, nas fêmeas, o aspartame nas doses de 80 e 160mg/kg diminuiu o conteúdo de GSH na região do córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ). Nos machos não foram encontrados resultados significativos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS

##### 4.3.1. Avaliação do peso corporal e consumo alimentar

Os animais, machos e fêmeas, passaram pela quantificação de parâmetros relacionados ao ganho de peso corporal e consumo alimentar a partir do desmame até completarem 60 dias.

## 4.3.1.1. Peso corporal

A fim de avaliar o ganho de peso corporal, os animais foram pesados semanalmente ao longo de todo tratamento (40 dias, que equivaleram a 7 semanas).

A tabela 1 mostra a média do ganho de peso semanal dos machos até o último dia/semana de tratamento.

**Tabela 1.** Peso corporal semanal em g, dos ratos *Wistar* machos que receberam água ou aspartame (35mg/kg; 80mg/kg; 160mg/kg) por um período de 40 dias (equivalente a 7 semanas).

	Controle (água) (g)	ASP35 (g)	ASP80 (g)	ASP160 (g)
<b>1º semana</b>	64,9 ± 1,24	65,7 ± 3,46	65,4 ± 3,38	64,9 ± 3,38
<b>2º semana</b>	97,5 ± 3,7	98 ± 4,98	98,3 ± 5,23	99,3 ± 5,33
<b>3º semana</b>	140,8 ± 4,67	139,9 ± 4,15	142,5 ± 5,07	144,7 ± 6,07
<b>4º semana</b>	182,2 ± 5,55	183,3 ± 5,95	187,7 ± 5,42	189,9 ± 6,2
<b>5º semana</b>	228,3 ± 6,93	230,1 ± 7,7	229,7 ± 8,16	233,2 ± 8,58
<b>6º semana</b>	257,5 ± 6,91	260,3 ± 7,53	261,4 ± 9,08	267,2 ± 9,5
<b>7º semana</b>	287,6 ± 7,3	293,4 ± 7,57	293,5 ± 6,45	309,9 ± 9,4*

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média do peso corporal a cada semana, até o final dos tratamentos (n=10 animais por grupo). \*diferente do ganho de peso do grupo controle.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Os resultados revelam que o peso base dos grupos água, ASP35, ASP80 e ASP160 não apresentaram diferenças significativas. Com relação ao ganho de peso, os ratos machos tratados com aspartame na dose de 160mg/kg tiveram ganho significativo no peso corporal na última semana, quando comparados ao ganho do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

A tabela 2 mostra a média do ganho de peso semanal das fêmeas até o último dia/semana de tratamento.

**Tabela 2.** Peso corporal semanal em g, dos ratos *Wistar* fêmeas que receberam água ou aspartame (35mg/kg; 80mg/kg; 160mg/kg) por um período de 40 dias (equivalente a 7 semanas).

	Controle (água) (g)	ASP35 (g)	ASP80 (g)	ASP160 (g)
1ª semana	50,6 ± 1,29	52,5 ± 2,57	54,4 ± 2,47	52,8 ± 2,85
2ª semana	84,1 ± 3,74	85,8 ± 3,2	87,2 ± 2,52	89,7 ± 4,96
3ª semana	107,2 ± 2,97	112,1 ± 2,23	116,4 ± 3,36*	121,2 ± 4,51*
4ª semana	130,7 ± 3,07	139,1 ± 2,85	144,8 ± 3,04*	153,6 ± 4,51*
5ª semana	153,3 ± 3,76	165,7 ± 3,65	172,3 ± 2,72*	183,1 ± 4,79*
6ª semana	168,7 ± 2,99	181,6 ± 3,85	189,7 ± 3,85*	201,7 ± 4,41*
7ª semana	177,3 ± 2,56	201,4 ± 3,59*	200,8 ± 2,37*	215,5 ± 3,73*

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média do peso corporal a cada semana, até o final dos tratamentos. (n=10 animais por grupo). \*diferente do ganho de peso do grupo controle.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Conforme a tabela é possível observar que o peso base dos grupos água, ASP35, ASP80 e ASP160 não apresentaram diferenças significativas. A partir da terceira semana de experimento já foi possível observar ganho de peso significativamente superior nos grupos que receberam aspartame nas doses de 80mg/kg e 160 mg/kg, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Na última semana, o grupo que recebeu aspartame na dose de 35mg/kg também apresentou ganho de peso estatisticamente superior ao controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.1.2. Consumo alimentar

A partir do desmame até atingir os 60 dias de vida foram pesadas semanalmente a ração dos animais, machos e fêmeas, a fim de verificar o consumo alimentar. A tabela 3 mostra a média da ingestão final de ração do grupo que ingeriu somente água e dos grupos que receberam aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg, ao longo de todo período experimental.

**Tabela 3.** Ingestão total de ração animal em g, pelos ratos *Wistar*, machos e fêmeas, que receberam água ou aspartame (35mg/kg; 80mg/kg; 160mg/kg) por um período de 40 dias.

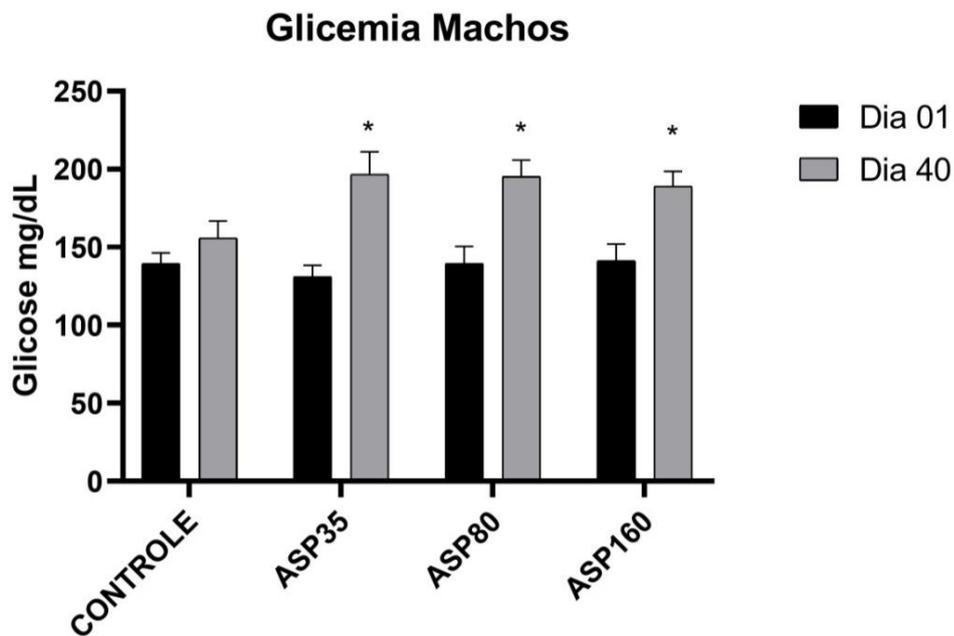
	Controle (água) (g)	ASP35 (g)	ASP80 (g)	ASP160 (g)
<b>Machos</b>	4141 ± 72,49	4360 ± 95,52	4412 ± 19,52	4512 ± 125,5
<b>Fêmeas</b>	2897 ± 23	3080 ± 43,5	3190 ± 64	3282 ± 72,5

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média do consumo total de ração ingerido. (n=10 animais por grupo). Dados não significativos. Fonte: do autor, 2019.

Ao avaliar os valores médios do consumo alimentar das fêmeas e dos machos, pode-se observar aumento nos grupos que receberam aspartame nas três doses (35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg) quando comparados ao grupo controle, em ambos os sexos. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

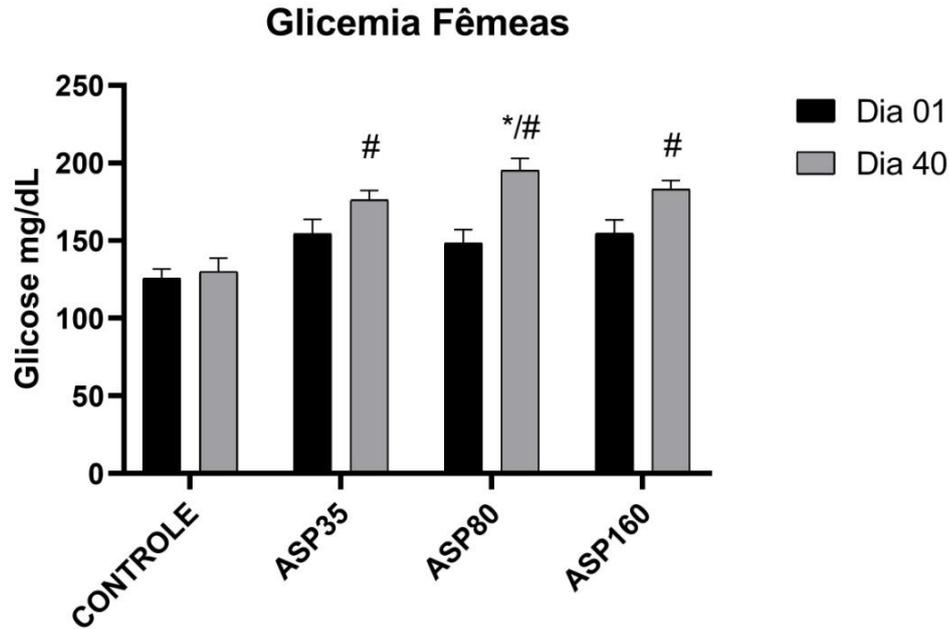
#### 4.3.2. Perfil glicêmico

Os animais tiveram a glicemia mensurada no primeiro e último dia dos tratamentos com água (grupo controle) ou aspartame (35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg), para fins de comparação dos efeitos desses tratamentos sobre o perfil glicêmico. As figuras 14 e 15 mostram os valores de glicemia mensurados, em machos e fêmeas, respectivamente.



**Figura 14.** Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o perfil glicêmico dos ratos *Wistar* machos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=10 animais por grupo) \* diferente do primeiro dia do próprio grupo.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunn-Sidak). Fonte: do autor, 2019.

Os resultados, em machos, mostram que as glicemias iniciais, mensuradas no primeiro dia dos tratamentos, não diferiram significativamente entre os grupos aspartame e controle. Com relação à glicemia coletada no último dia de tratamento, os valores obtidos indicam que houve um aumento na glicemia nos grupos ASP35, ASP80 e ASP160 ( $p < 0,05$ ), quando comparadas aos valores médios do primeiro dia, nos mesmos grupos.



**Figura 15.** Efeito da administração crônica de aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg ou água, sobre o perfil glicêmico dos ratos *Wistar* fêmeas. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (n=10 animais por grupo). \* diferente do primeiro dia do próprio grupo. # diferente do último dia do grupo controle.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunn-Sidak). Fonte: do autor, 2019.

Nas fêmeas, os resultados mostram que as glicemias iniciais, mensuradas no primeiro dia dos tratamentos, não diferiram significativamente entre os grupos aspartame e controle, assim como nos machos. Contudo, ao final dos tratamentos, os valores de glicemia coletados no último dia, indicam que houve aumento significativo nos grupos ASP35, ASP80 e ASP160 ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao controle. Os resultados também demonstram que houve um aumento na glicemia no último dia de tratamento no grupo ASP80 ( $p < 0,05$ ), quando comparada aos valores médios do primeiro dia do mesmo grupo.

#### 4.3.3. Perfil lipídico

No último dia do experimento, após a eutanásia dos animais, o sangue foi coletado para posteriores avaliações do perfil lipídico: colesterol total, HDL e triglicérides. A tabela 4 mostra os valores médios dessas avaliações mensuradas em soro de ratos *Wistar*, machos e fêmeas, que receberam somente água ou aspartame nas doses de 35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg, ao longo de todo período experimental.

**Tabela 4.** Colesterol total, HDL e triglicerídeos (mg/dL) dos ratos *Wistar*, machos e fêmeas, que receberam água ou aspartame (35mg/kg; 80mg/kg; 160mg/kg) por um período de 40 dias

	CT (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
<b><u>MACHOS</u></b>			
<b>Controle</b>	62 ± 2,66	44 ± 1,43	100,2 ± 5,91
<b>ASP35</b>	62,71 ± 2,36	41,29 ± 2,38	119,2 ± 10,58
<b>ASP80</b>	61,71 ± 2,57	38,86 ± 1,53	110,8 ± 13,3
<b>ASP160</b>	77 ± 4,41	48,71 ± 2,89	182,9 ± 20,67*
<b><u>FÊMEAS</u></b>			
<b>Controle</b>	66,86 ± 3,59	49,29 ± 2,6	79,61 ± 7,06
<b>ASP35</b>	71 ± 3,84	50,14 ± 2,89	117,8 ± 8,39*
<b>ASP80</b>	59,86 ± 3,31	43,86 ± 3,69	80,81 ± 4,16
<b>ASP160</b>	64,71 ± 3,22	50,14 ± 2,46	119,1 ± 11,47*

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média do colesterol total, fração HDL e triglicerídeos (n=7 animais por grupo). \*diferente do grupo controle.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey). CT: Colesterol total; HDL: Lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos.

Os resultados da tabela 4 demonstram que, nos machos e fêmeas, o aspartame na dose de 160mg/kg foi capaz de elevar os valores plasmáticos de triglicerídeos quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Tal aumento também foi possível de ser observado nas fêmeas que receberam aspartame na dose de 35mg/kg ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com relação aos valores de colesterol total e fração HDL.

## 5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas o consumo de alimentos do tipo *diet* e *light* têm crescido significativamente, tanto entre os consumidores com restrições dietéticas, quanto entre os que buscam manutenção ou mudança da forma física. Somado a isso, a utilização de edulcorantes nos alimentos, em especial os artificiais como o aspartame, vêm ocorrendo de forma disseminada, não apenas nesses produtos dietéticos, mas também em produtos gerais utilizados pela população (Freitas e Araújo, 2010). Tais constatações vêm trazendo diversas preocupações e questionamentos sobre a segurança dessas substâncias à saúde humana, especialmente em longo prazo. O debate sobre a utilização do aspartame existe desde sua aprovação pelo FDA e atualmente ainda persistem muitas controvérsias. Evidências sugerem possíveis alterações metabólicas associadas ao consumo crônico do aspartame (Von Poser Toigo et al., 2015), bem como efeitos neurológicos e comportamentais adversos (Humphries et al., 2008). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o consumo repetido de aspartame é capaz de acarretar em danos cerebrais, e em alterações metabólicas, tais como ganho de peso e modificações nos perfis glicêmico e lipídico.

A fim de avaliar o perfil cognitivo, os animais foram submetidos aos testes comportamentais do labirinto em y e esquiva inibitória. O labirinto em y é um teste de reconhecimento para avaliar a memória espacial de curto prazo. Nesta tarefa, durante a sessão treino, o animal pode explorar apenas dois braços, o de “partida” e o “outro”, sendo o terceiro braço, denominado de “novo,” bloqueado por uma porta. Na sessão teste, a porta é aberta e todos os três braços estão livres para o acesso. Uma vez que a tarefa se baseia nos extintos exploratórios do animal, ou seja, na tendência natural dos roedores para explorar a novidade, a memória e a preferência pela novidade podem ser avaliadas pelo tempo de permanência entre esses dois braços (“novo e outro”) durante a sessão treino do protocolo (Conrad et al., 1997; Martin et al., 2003).

Um estudo recente de Iyaswamy (2018) utilizando deste protocolo demonstrou que, em ratos albinos *Wistar*, o consumo prolongado de aspartame (40mg/kg/dia durante 90 dias), afetou negativamente a aprendizagem e memória no teste do labirinto em y. Com relação aos nossos resultados, estes demonstraram um padrão semelhante de exploração entre os braços. Tanto os animais, machos e fêmeas, do grupo controle, quanto os que receberam as diferentes doses de aspartame (35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg) não foram capazes de reconhecer o braço novo e o exploraram tanto quanto o outro braço já explorado anteriormente na primeira sessão. Estes dados, por sua vez, indicam dano de memória. Contudo, uma vez que o grupo controle, qual recebeu apenas água, demonstrou comprometimento cognitivo, os resultados exigem maior reflexão. Não foram encontrados dados na literatura demonstrando o mesmo acontecimento, apenas em ratos idosos, no qual o envelhecimento poderia justificar tais danos. Dessa forma, os resultados precisam ser interpretados com cautela e em conjunto a outros.

Em contrapartida, no teste de esquiva inibitória encontramos resultados expressivos. A tarefa de esquiva inibitória é um dos testes de memória mais utilizados e consiste em inibir a exploração do ambiente pela aplicação de choques no animal. O aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma. Com relação aos resultados analisados, os mesmos revelaram danos significativos. Os animais, machos e fêmeas, submetidos ao consumo crônico de aspartame nas três doses administradas (35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg), demonstraram prejuízo cognitivo, com déficit na memória de trabalho, de curta e longa duração quando comparados ao treino de seus respectivos grupos. Somado a isso, também apresentaram prejuízo nesses três tipos de memória (de trabalho, curta e longa), quando comparados aos mesmos tipos de memória do grupo controle. Esses dados

evidenciam dano cognitivo associado ao consumo crônico de aspartame, e corroboram com outros estudos descritos na literatura que avaliaram aprendizagem e memória, por diferentes protocolos.

Erbas et al. (2018) demonstraram dano cognitivo através do teste de esQUIVA passiva em ratos machos adultos que receberam aspartame na dose de 3mg/kg/dia durante seis semanas. Do mesmo modo Abdel-Salam et al. (2012b), estudaram as funções de memória em camundongos machos, fornecendo diferentes doses de aspartame por 2 semanas. Eles relataram que na dose de 5,625 mg/kg o aspartame afetou significativamente o desempenho dos animais no teste de Morris Water Maze (Labirinto aquático de Morris). Em outro estudo, Abu-Taweel et al. (2014) descobriram que a ingestão crônica de aspartame (32mg/kg) durante 30 dias causou efeitos perturbadores significativos nas respostas cognitivas e retenção de memória em camundongos. Com relação aos estudos clínicos, esses são mais escassos. Konen et al. (2000) pesquisaram 90 estudantes de universidades que se consideravam usuários crônicos do aspartame ou não usuários. Os alunos completaram pesquisas nutricionais e questionários de memória, nos quais classificaram seu esquecimento percebido nos 6 meses anteriores. Em comparação com os não usuários, os usuários do aspartame relataram mais lapsos de memória. Corroborando a estes achados, Lindseth et al. (2014) demonstraram que o aspartame é capaz de causar alterações neurocomportamentais, incluindo comprometimento cognitivo. Os pesquisadores recrutaram 28 estudantes universitários saudáveis, quais consumiram uma dieta rica em aspartame (25 mg/kg/dia) por 8 dias e uma dieta baixa em aspartame (10 mg/kg/dia) por 8 dias, com 2 semanas de “desintoxicação” entre elas. Ao consumir dietas ricas em aspartame, os participantes apresentaram um humor mais irritável, estado depressivo e tiveram pior desempenho nos testes de orientação espacial.

Estes achados podem ser suportados pelo fato dos metabólitos do aspartame serem capazes de provocar alterações neuroquímicas importantes. Choudhary e Lee (2017) relataram que o aumento substancial de fenilalanina no plasma, decorrente do consumo crônico de aspartame, é capaz de acarretar em desordens cerebrais. Essas desordens podem ser relacionadas tanto pelos aumentos substanciais de fenilalanina no cérebro, quanto pela diminuição na entrada de outros aminoácidos importantes tais como tirosina e triptofano (visto que há competição entre a fenilalanina e estes aminoácidos pelos sítios de ligação dos TANCL), precursores dos neurotransmissores 5-HT e DA, respectivamente. Esses neurotransmissores, por sua vez, exercem funções importantes em nível de cognição, e tal diminuição já foi demonstrada no encéfalo de roedores tratados com aspartame (Park et al., 2000; Abdel-Salam et al., 2012a). Por outro lado, estudos também observaram que, além de modificar as concentrações cerebrais de neurotransmissores, o aspartame perturba a função neuronal, uma vez que seu produto de degradação, o aspartato, indiretamente pode acarretar em desequilíbrio na homeostase cerebral, inclusive neurodegeneração. Estes estudos mostraram que mesmo aumentos leves nos níveis de aspartato no cérebro podem levar à excitotoxicidade nos neurônios devido a capacidade do aspartato de abrir canais catiônicos, levando ao influxo incontrolável de cálcio e desencadeando assim uma cascata de reações por enzimas intracelulares que culminam na morte celular (Park et al., 2000; Humphries et al., 2008; Onaolapo et al., 2016).

Outro possível ponto associado a danos cognitivos é o estresse oxidativo, condição biológica decorrente do desequilíbrio entre as atividades oxidantes e antioxidantes no corpo (Halliwell e Gutteridge, 2007). De forma geral, pesquisadores tem postulado que o aspartame age como um produto químico estressor (xenobiótico) e está associado a uma produção exacerbada de radicais livres. Em altas concentrações, estes produtos podem reduzir a plasticidade sináptica pelo enfraquecimento da potenciação de longa duração (LTP), afetar a neurotransmissão sináptica, e assim aumentar a vulnerabilidade do cérebro ao estresse oxidativo, causando danos celulares e efeitos adversos na saúde neurocomportamental (Iyyaswamy e Rathinasamy, 2012; Choudhary e Preterius, 2017). Estas ações parecem estar principalmente relacionadas ao metanol e,

consequentemente aos seus metabólitos. Foi comprovado, por exemplo, que em ratos *Wistar* albinos, o metanol acelerou a ação de espécies reativas de oxigênio, pois ao ser metabolizado, promoveu a formação do ânion radical superóxido e de peróxido de hidrogênio (Parthasarathy et al., 2006a,b).

O estresse oxidativo pode levar a alterações estruturais e funcionais nas células cerebrais, e associar-se a danos cognitivos em especial por lesões em nível de hipocampo e córtex pré-frontal, regiões importantes para as funções de memória e atenção (Abdel-Salam et al., 2012b). Alguns relatos demonstraram que lesões citotóxicas no hipocampo resultam em graves prejuízos na tarefa de memória. Em soma, a acetilcolinesterase (AChE), por exemplo, é uma enzima chave do sistema colinérgico muscarínico, e está envolvida no aprendizado e na memória. No entanto, descobriu-se que produtos oxidantes, como o óxido nítrico (ON) são capazes de interromper o processo de memória por inibir a atividade acetilcolinérgica (Udayabanu et al., 2008). Um estudo de Iyaswamy et al. (2018) demonstrou diminuição acentuada na atividade da AChE, aumento no nível de ON e danos nos testes comportamentais do labirinto aquático de morris e do labirinto em y, nos animais tratados com aspartame. Simintzi et al. (2007) relataram que os metabólitos do aspartame inibem a atividade da AChE no hipocampo. Ademais, Rico et al. (2006) demonstraram que a exposição ao metanol diminuiu notavelmente, em peixe-zebra, a atividade da AChE cerebral, sugerindo um evento neurodegenerativo promovido possivelmente pelo metanol e sugerindo que alterações induzidas pelo aspartame possam ser mediadas por esse composto, afetando o funcionamento do hipocampo. Estes dados suportam por sua vez, danos na memória e aprendizado associados a substâncias oxidantes e atividade prejudicada da AChE, e possíveis relações com o metanol.

Além de danos cognitivos associados a AChE, via oxidantes, a exposição a esses radicais livres pode danificar a estrutura das membranas celulares, o ácido de desoxirribonucléico (DNA) e as proteínas celulares, culminando também em alterações funcionais e até mesmo a morte celular neuronal (Gama et al., 2008a,b). Também foi relatado que o aspartame induz a produção de radicais livres e gera estresse oxidativo em outros órgãos que não o cérebro. Um estudo de Mourad e Noor (2011) demonstrou que o metanol liberado no metabolismo do aspartame pode aumentar a formação de malondialdeído, o que é acompanhado de uma diminuição da glutathiona reduzida do sistema antioxidante. Adaramoye e Akanni (2016) identificaram alterações no sistema redox, com aumento na peroxidação lipídica e na expressão de NO associados a uma diminuição nas enzimas antioxidantes, no fígado, rim e cérebro de ratos *Wistar* machos tratados aspartame (15, 35, 70mg/kg) por gavagem v.o. Do mesmo modo, Onaolapo et al. (2016) mostraram aumento do estresse oxidativo, além de alterações morfológicas e comportamentais, em cérebro de camundongos Swiss tratados com aspartame (20, 40, 80 e 160mg/kg) v.o. Aumento no estresse oxidativo e alterações histológicas também foram demonstrados por Lebda et al. (2017) e Solis-Medina et al. (2018), respectivamente, em cérebro de ratos *Wistar* tratados com aspartame (240 e 160mg/kg, respectivamente).

Em nosso estudo demonstramos que, de forma geral, ocorreu uma elevação nos níveis de carbonilação protéica e diminuição de grupos tióis, na região do córtex pré-frontal, nos ratos *Wistar* machos e fêmeas tratados com aspartame quando comparado com o grupo controle. Estes resultados evidenciam dano oxidativo e associam-se a níveis elevados de espécies oxidantes. Em soma, nossos resultados mostraram ainda uma diminuição da atividade das enzimas SOD e GPx e no conteúdo de GSH, na região do córtex pré-frontal das fêmeas que receberam aspartame, especialmente nas doses de 80 e 160mg/kg. Esses achados em conjunto sugerem que o aspartame pode induzir uma situação de estresse oxidativo, no córtex pré-frontal, região de grande importância para as funções de memória de trabalho e atenção, e corroboram, pelo menos em parte, com outros estudos descritos.

Além dos efeitos em nível cerebral associados ao consumo do aspartame, parece também haver associação deste edulcorante com desordens metabólicas. Estudos vêm questionando a efetividade do aspartame em relação à perda e manutenção da massa corpórea, bem como seus resultados sobre os perfis lipídicos e glicêmicos. A priori, essa preocupação parece infundada, pois seria muito lógico pensar que a substituição do açúcar por edulcorantes, com baixa ou nenhuma caloria, claramente iria contribuir para menor ingestão calórica e redução/manutenção dos níveis sanguíneos de glicose, o que contribuiria para a perda de peso e controle da glicemia (García-Almeida et al., 2013). Contudo essa hipótese tem gerado controvérsias, o que instiga a pesquisa sobre tais parâmetros.

De acordo com os nossos resultados sobre o peso corporal, foi possível observar que os ratos machos que receberam aspartame na dose de 160mg/kg aumentaram o peso ao final do tratamento, quando comparados aos controles. Nas fêmeas, foi possível observar esse ganho de peso nas três doses de aspartame (35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg). Além disso, nas doses de 80mg/kg e 160mg/kg este aumento foi evidenciado já a partir da terceira semana de experimento.

Os resultados encontrados nessa pesquisa corroboram com outros trabalhos que utilizaram animais tratados com aspartame em diferentes protocolos. Silva et al. (2016) demonstraram aumento no peso corpóreo de ratos *Wistar* adolescentes tratados com aspartame na dose de 2mL/100g, durante 21 dias, quando comparados aos controles, inclusive a partir da primeira semana (7 dias). Souza et al. (2010) observaram maior peso corporal na prole de ratas tratadas com aspartame na dose de 25mg/kg. Um estudo de Reis (2010) também observou, em ratos *Wistar* adultos, maior ganho de peso no grupo tratado com aspartame (0,4%) durante 12 semanas.

Nesses estudos o maior consumo de ração esteve presente, o que leva a inferir que o aspartame estimula o apetite e é esse aumento que induz ao ganho de peso, uma vez que as calorias não ingeridas durante a substituição de açúcar por edulcorantes podem ser posteriormente ingeridas pela compensação na alimentação. Esse aumento de apetite também foi relatado por outros autores. A partir dos estudos pré clínicos de Swithers e Davidson (Swithers e Davidson, 2008; Swithers et al., 2009;2010;2013; Davidson et al., 2011) foi desenvolvida a hipótese de que o uso de edulcorantes não calóricos enfraquece a capacidade da percepção do sabor doce em predizer energia e ativar a fase cefálica, a fim de preparar o trato digestivo para o consumo alimentar. A fase cefálica refere-se às respostas autonômicas e endócrinas à estimulação dos sistemas sensoriais (Zafra et al., 2006). O consumo, especialmente de doces, leva a liberação de insulina na fase cefálica e, conseqüentemente, a uma queda correspondente na concentração de glicose plasmática (Koeppen e Stanton, 2009). Essa queda, por sua vez, pode estar associada a sensações de fome e aumento da ingestão alimentar em curto prazo. Somado a isso, a sensação de recompensa acionada pelo alimento consiste de duas vias: sensorial e pós-ingestão (Avena et al., 2008), e a via sinalizada na pós-ingestão depende dos produtos metabólicos do alimento (Sclafani e Ackroff, 2004). Uma vez que os edulcorantes não nutritivos são caracterizados pela perda da contribuição calórica, por exemplo, isso geralmente elimina o componente pós-ingestão. Os resultados de Swithers e Davidson mostraram que os animais que consumiam uma dieta adoçada com um edulcorante não nutritivo apresentavam maior massa corporal total, maior acúmulo de gordura corporal, maior consumo e uma menor resposta térmica ao consumo de alimentos do que aqueles animais expostos a uma dieta adoçada com glicose. Desse modo, tem sido sugerido que a dissociação entre a percepção do sabor doce e a ingestão calórica pode aumentar o apetite, acionando o comportamento de busca por alimentos e assim, contribuir para obesidade (Brown et al., 2010).

Outro ponto sugerido é de que esse aumento do apetite também possa estar relacionado à redução das concentrações de DA e 5-HT na presença do aspartame (mecanismo já comentado anteriormente). Acredita-se que a DA regule esse comportamento via sistema meso-hipotalâmico por seus aspectos hedônicos e via sistema nigroestriatal pelo gasto energético (Palmiter, 2007; Bertthoud e Morrison, 2008). A 5-HT, por sua vez,

possui um efeito inibitório sobre o comportamento alimentar (Blundell e Lawton, 1995; Simansky, 1996; White et al., 2000). Um estudo realizado por Wurtman (1983) mostrou, em ratos, que altas doses de aspartame conseguem suprimir o aumento nas concentrações de 5-HT, que normalmente ocorre após a ingestão de glicose. Assim, uma vez que vários estudos mostram que a 5-HT promove saciedade, a sua supressão poderia, teoricamente, estimular o apetite.

Esses achados sugerem que animais submetidos a ingestão crônica de aspartame poderiam desenvolver um mecanismo de saciedade menos eficiente ou um mecanismo distinto de recompensa relacionado, o que poderia levar a excessos compensatórios e balanço energético positivo. Contudo, apesar dos resultados da nossa pesquisa terem mostrado diferença entre os grupos aspartame e o grupo controle em nível de consumo alimentar, a diferença não foi significativamente estatística, o que sugere ainda que o aspartame pode induzir o ganho de peso por meio de outros mecanismos.

Um possível mecanismo está associado ao estresse oxidativo. Como já mencionado, o aspartame é capaz de induzir a esta situação. Ao certo, esta relação ainda não está bem definida, porém postula-se que o estresse oxidativo pode causar um desequilíbrio na homeostase corporal, inclusive na composição da microbiota intestinal, e assim acarretar em desordens metabólicas, na qual se inclui o ganho de peso; bem como danos estruturais e funcionais, tanto em nível cerebral quanto sistêmico, quais podem repercutir sobre tais desordens (Collison et al., 2012a,b). Do contrário, sabe-se que quando a massa gorda aumenta, a irrigação insuficiente pode levar à falta de oxigênio e, portanto, à necrose celular. O processo de fagocitose para eliminar essas células mortas resulta, por sua vez, em aumento da infiltração inflamatória e também estresse oxidativo pela liberação de radicais livres, como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (Kosacka et al., 2015; Netzer et al., 2015). Dessa forma cria-se um ciclo, qual pode impactar negativamente sobre os processos metabólicos.

Outro possível ponto de ligação relaciona-se a microbiota intestinal. Esta consiste em milhões de bactérias, vírus e fungos que existem simbioticamente dentro do intestino. A composição e função da microbiota varia não apenas entre indivíduos, mas também ao longo da vida, sendo modulada por diversos fatores externos, como a alimentação (David et al., 2014; Altamirano-Barrera et al., 2018). Alterações da microbiota vêm fortemente sendo associadas ao consumo de edulcorantes artificiais, e ao desencadeamento de alterações metabólicas, incluindo balanço energético positivo/obesidade, resistência à insulina e dislipidemia (Ley et al., 2006; Pepino e Bourne, 2011; Green e Syn, 2019). Uma das justificativas para esses resultados seria a possibilidade dos edulcorantes artificiais alterarem a composição da microbiota intestinal, devido a alterações na proporção Bacteroides: Firmicutes. Uma diminuição de bifidobactérias combinada com um aumento de enterobactérias é capaz de levar a uma situação de endotoxemia, qual resulta em um estado inflamatório de baixo grau, e associa-se a algumas condições metabólicas como obesidade, resistência à insulina e também aumento da permeabilidade intestinal. Dessa forma, postula-se que a endotoxemia metabólica pode ser uma força motriz por trás da obesidade e resistência à insulina induzidas pelos edulcorantes artificiais (Cani et al., 2007; Tanti et al., 2013).

Em um estudo publicado por Suez et al. (2014), avaliando a ação dos edulcorantes sobre a composição e as funções da microbiota intestinal, e o desenvolvimento da síndrome metabólica, verificou-se que todos os ratos que consumiram edulcorantes desenvolveram aumento de peso e intolerância à glicose, entretanto nenhum dos ratos do grupo controle apresentou o defeito. Foi observado que, vários dos táxons bacterianos que mudaram após o consumo de edulcorantes artificiais foram previamente associados ao diabetes tipo 2 em humanos. Consistente com esse estudo, Palmnas et al. (2014) também demonstraram os efeitos do aspartame sobre a microbiota intestinal e sobre o metabolismo.

Nossos estudos envolvendo o perfil glicêmico mostraram que, em machos, o aspartame nas três doses (35mg/kg, 80mg/kg e 160mg/kg) aumentou a glicemia entre o primeiro e último dia de tratamento. Relação que não foi possível ver no grupo controle. Nas fêmeas, os resultados indicaram que ao final do experimento, a glicemia dos animais que receberam aspartame na dose de 80mg/kg aumentou, e que os valores glicêmicos dos três grupos aspartame foram maiores que o controle. Um estudo de Souza et al. (2010) também observou maior média de glicose na prole de ratas tratadas com aspartame na dose de 50mg/kg.

Com relação ao perfil lipídico, nossos resultados demonstraram que os níveis plasmáticos de triglicerídeos, ao final do experimento, foram significativamente maiores nos animais machos e fêmeas, que receberam aspartame na dose de 160mg/kg, quando comparados ao controle. Em soma, nas fêmeas, o aspartame na dose de 35mg/kg também foi capaz de causar tal efeito. Von Poser Toigo et al. (2015) ao avaliarem alterações metabólicas associadas com a exposição pré-natal ao aspartame, também encontraram aumento nos níveis de triglicerídeos na prole das ratas tratadas com este edulcorante.

Estes resultados relacionados aos perfis glicêmico e lipídico podem ser explicados, em parte, pelos estudos e mecanismos descritos acima (consumo alimentar, estresse oxidativo, microbiota intestinal), tanto por ações diretas, como em consequência da obesidade. Contudo, os trabalhos envolvendo tais análises ainda são escassos e contraditórios.

Por fim, como um todo, em nossos resultados foi possível observar alterações metabólicas e cerebrais nas três doses de aspartame utilizadas. Estes efeitos, em doses abaixo da IDA, foram reportados também em alguns dos estudos descritos acima e corroboram com uma revisão de Choudhary e Pretorius (2017), quais demonstraram que tanto doses superiores quanto inferiores a IDA (40mg/kg) são capazes de afetar parâmetros comportamentais como memória e atenção, neuroinflamação, estresse oxidativo, entre outros. Além disso, a maioria dos estudos com aspartame até o momento utilizaram ratos machos. Em contrapartida, em nosso estudo utilizamos ambos os gêneros e encontramos efeitos mais expressivos do aspartame em fêmeas, especialmente com relação ao estresse oxidativo, sugerindo uma possível maior suscetibilidade das mesmas, qual necessita e instiga maiores compreensões.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo fornece evidências de que o aspartame, um edulcorante amplamente utilizado na dieta humana, prejudica o desenvolvimento cognitivo, induz danos e estresse oxidativo, bem como é capaz de acarretar em alterações metabólicas importantes, quais por sua vez estão envolvidas na síndrome metabólica e risco aumentado para doenças cardiovasculares. Tomados em conjunto, foi possível observar alterações em parâmetros metabólicos, oxidativos e neurocomportamentais, semelhantes em machos e em fêmeas, porém nessas, alguns efeitos foram mais pronunciados, em especial o estresse oxidativo. Também foi observado que tais alterações ocorreram tanto em doses elevadas de aspartame, quanto com doses mais baixas, o que traz questionamentos sobre a sua dosagem de segurança diária e, especialmente, em longo prazo. Ademais, considerando o uso disseminado do aspartame nos produtos alimentícios, e a exposição crônica ao mesmo durante a vida, não parece ser difícil alcançar tais doses.

No entanto, o (s) mecanismo (s) específico (s) e os detalhes dos efeitos do consumo do aspartame, bem como de outros edulcorantes artificiais, no metabolismo do hospedeiro ainda precisam ser elucidados, uma vez que há contradições acerca do tema, e muitos achados ainda estarem em processo de compreensão. Isso é particularmente relevante, uma vez que estes edulcorantes têm sido uma opção para os indivíduos melhorarem sua saúde, contudo, como visto neste e em outros estudos, o consumo dos mesmos vem sendo associado a riscos.

Dessa forma, diante das evidências existentes, salienta-se a necessidade de revisão na IDA do aspartame, bem como a conscientização no seu consumo. Seu uso deve ser feito de forma racional, conforme avaliação e indicação profissional, tomadas pelas necessidades individuais de cada pessoa.

### **Limitações e perspectivas**

Ao decorrer das análises de estresse oxidativo nos deparamos com algumas limitações. A quantidade de cérebro dissecada não foi suficiente para todas análises planejadas, ficando pendente por exemplo a análise de oxidantes e o conteúdo de GSH na região do estriado. Tais análises completas em um futuro estudo são de valia para reproduzir melhor a situação de estresse oxidativo.

**REFERÊNCIAS**

- Abdel-Salam OM, Salem NA, Hussein JS. Effect of aspartame on oxidative stress and monoamine neurotransmitter levels in lipopolysaccharide-treated mice. *Neurotox Res.* 2012a; 21(3): 245-255.
- Abdel-Salam OM, Salem NA, El-Shamarka ME, Hussein JS, Ahmed NA, El-Nagar ME. Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012b; 16(15): 2092-2101.
- Abhilash M, Paul MV, Varghese MV, Nair RH. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. *Food and Chem Toxicol.* 2011; 49(6): 1203-1207.
- Abu-Taweel GM, AZM, Ajarem SJ, Ahmad M. Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice. *Neurotox and Teratol.* 2014; 42: 60-67.
- Adaramoye OA, Akanni OO. Effects of long-term administration of aspartame on biochemical indices: lipid profile and redox status of cellular system of male rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2016; 27(1): 29-37.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 20:141-145.
- Altamirano-Barrera A, Uribe M, Chávez-Tapia NC, Nuño-Lámbarri N. The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease. *J Nutr Biochem.* 2018; 60: 1-8.
- Alwaleedi SA. Alterations in antioxidant defense system in hepatic and renal tissues of rats following aspartame intake. *Int J Health Sci Res.* 2016; 6: 267-276.
- Anton SD, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P, Williamson DA. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite.* 2010; 55(1): 37-43.
- ANVISA. Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008. "Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos". In: Saúde Md, ed.: D.O.U. - Diário Oficial da União. 2008.
- Ardalan MR, Tabibi H, Attari VE, Mahdavi AM. Nephrotoxic Effect of Aspartame as an Artificial Sweetener. *Iran J Kid Dis.* 2017; 11(5): 339-343.
- Ashok I, Sheeladevi R, Wankhar D. Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behavior in *Wistar* Albino rats. *Biomed Preventive Nutr.* 2014; 4(1): 39-43.
- Ashok I, Sheeladevi R, Wankhar D. Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in *Wistar* albino rat brain. *J Biomed Res.* 2015; 29(5): 390-396.

Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosc Biobehav Rev.* 2008; 32: 20-39.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for sod. *Meth Biochem Anal.* 1987; 32: 279-312.

Bertthoud HR, Morrison C. The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol.* 2008; 59: 55-92.

Bevilaqua LR, Keer DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci.* 2003; 17(4): 897-902.

Blackburn GL, Kanders,BS, Lavin PT, Keller SD, Whatley J. The effect of aspartame as part of a multidisciplinary weight-control program on short- and longterm control of body weight. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65: 409-418.

Blundell JE, Green,SM. Effect of sucrose and sweeteners on appetite and energy intake. *Internat J Obes Relat Metab Disord.* 1996; 20: 12-17.

Blundell JE, Hill AJ. Paradoxical effects of an intense sweetener (aspartame) on appetite. *Lancet.* 1986; 1: 1092-1093.

Blundell JE, Lawton CL. Serotonin and dietary fat intake: effects of dexfenfluramine. *Metabolism.* 1995; 44: 33-37.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 01, de 07 de janeiro de 1988. Dispõe sobre os suplementos dietéticos protéicos; produtos para dietas especiais, edulcorantes, produtos dietéticos. 1988.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. 1998.

Brasil. Ministério da Saúde. Decreto nº 3029, de 16 de abril de 1999. Aprova o regulamento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. 1999.

Brasil. Ministério da Saúde. Desmistificando dúvidas sobre alimentação e nutrição: material de apoio para profissionais de saúde / Ministério da Saúde, Universidade Federal de Minas Gerais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 164 p.

Brown RJ, de Banate MA, Rother KI. Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. *Int J Pediatr Obes.* 2010; 5(4): 305-312.

Butchkho HH. Intake of aspartame vs. acceptable daily intake. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2002; 35: 7-12.

Bye P, Meunier A, Muchnik J. As inovações açucareiras: permanência e diversidade de paradigmas. *Cad Ciênc Tecnol.* 1993; 10: 35-52.

- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 2007; 56: 1761-1772.
- Cani PD, Delzene NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol*. 2009; 9(6): 737-743.
- Cardello HMAB, Silva MAAP, Damásio MH. Avaliação tempo-intensidade de doçura e amargor de aspartame e ciclamato/sacarina em equivalência à sacarose em altas concentrações. Curitiba: Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos - CEPPA. 2001;19(2): 391-410.
- Castro AGP, Franco LG. Caracterização do consumo de adoçantes alternativos e produtos dietéticos por indivíduos diabéticos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46(3): 280-287.
- Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. Artificial sweeteners – a review. *J food Sci Technol*. 2014; 51(4): 611-621.
- Choi TB, Pardridge WM. Phenylalanine transport at the human blood-brain barrier. Studies with isolated human brain capillaries. *J Biol Chem*. 1986; 261: 6536-6541.
- Choudhary AC, Lee YY. Neurophysiological symptoms and aspartame: What is the connection? *Nutr Neurosci*. 2017; 21(5): 1-11.
- Choudhary AK, Preterius E. Revisiting the safety of aspartame. *Nutr Rev*. 2017; 75(9): 718-730.
- Christante L. Os adoçantes na balança. *Unespciência*, setembro de 2009, p.40-41.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012; 148: 1258-1270.
- Collison KA, Makhoul NJ, Zaidi MZ, Al-Rabiah R, Inglis A, Andres BL. Interactive effects of neonatal exposure to nonosodium glutamate and aspartame on glucose homeostasis. *Nutr Metab (Lond)*. 2012a; 9: 58.
- Collison KA, Makhoul NJ, Zaidi MZ, Saleh SM, Andres B, Inglis A. Gender dimorphism in aspartame-induced impairment of spatial cognition and insulin sensitivity. *PLoS One*. 2012b; 7: e31570.
- Conrad CDS, Lupien J, Thanasoulis LC, McEwen BS. "The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze." *Brain Res*. 1997; 759(1): 76-83.
- Costa LF. Ação neuroprotetora da sonata de mozart na aprendizagem e memória de ratos expostos à hipóxia cerebral [dissertação de mestrado]. Pós-Graduação em Ciências do Comportamento, Departamento de Processos Psicológicos Básicos, Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília, 2016.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014; 505: 559-563.

- Davidson TL, Martin AA, Clark K, Swithers SE. Intake of high-intensity sweeteners alters the ability of sweet taste to signal caloric consequences: implications for the learned control of energy and body weight regulation. *Q J Exp Psychol.* 2011; 64(7): 1430-1441
- Daubner SC, Melendez J, Fitzpatrick PF. Reversing the substrate specificities of phenylalanine and tyrosine hydroxylase: aspartate of tyrosine hydroxylase is essential for L-DOPA formation. *Bioch.* 2000; 39: 9652-9661.
- Deacon RM, Rawlins JNP. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc.* 2006; 1(1): 7.
- De la Hunty A, Gibson S, Ashwell M. A review of the effectiveness of aspartame in helping with weight control. *Nutr Bull.* 2006; 31: 115-128.
- De La Peña C. Artificial sweetener as a historical window to culturally situated health. *Ann NY Acad Sci.* 2010; 1190: 159-165.
- Dorokhov YL, Shindyapina AV, Sheshukova EV, Komarova TV. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev.* 2015; 95: 603-644
- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress Neurobiol.* 2000; 62; 649-671.
- Erbas O, Erdogan MA, Khalilnezhad A, Solmaz V, Gurkan FT, Yigitturk G, Eroglu HA, Taskiran D. Evaluation of long-term effects of artificial sweeteners on rat brain: a biochemical, behavioral, and histological study. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018; 32(6): e22053.
- Errico F, Pirro MT, Affuso A, Spinelli P, De Felice M, D'Aniello A. A physiological mechanism to regulate d-aspartic acid and NMDA levels in mammals revealed by d-aspartate oxidase deficient mice. *Gene.* 2006; 374: 50-57.
- Fagundes RLM, Costa YR, Daniel JV, Zanatta F. Utilização de produtos “light” no tratamento dietético de pacientes obesos: tabela de composição centesimal. *Rev Hig Aliment.* 2001; 15: 25-30.
- Fatibello-Filho O, Vieira IDC, Gouveia ST, Calafatti SA. Adoçantes Artificiais. *Química Nova.* 1996; 19(3): 248-260
- Feijo FM, Ballard CR, Foletto KC, Batista BA, Neves AM, Ribeiro MF, Bertoluci MC. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult *Wistar* rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite.* 2013; 60(1): 203-207.
- Fernstrom JD, Fernstrom MH, Gillis MA. Acute effects of aspartame on large neutral amino acid and monoamines in rat brain. *Life Sci.* 1983; 32: 1651-1658.
- Finamor IA, Ourique GM, Pês TS, Sacool EM, Bressan CA, Scheid T, Baldisserotto B, Llesuy SF, Partata WA, Pavata WA. The protective effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in the brain caused by the long-term intake of aspartame by rats. *Neurochem Res.* 2014; 39(9): 1681-1690.

Flohé I, Gunzler W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods enzymol.* 1984; 105: 114-121.

Fowler SP, Williams K, Resendez RG, Hunt KJ, Hazuda HP, Stern MP. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity.* 2008; 16: 1894-1900.

Fowler SP, Williams K, Hazuda HP. Diet soda intake is associated with long-term increases in waist circumference in a bi ethnic cohort of older adults: The San Antonio Longitudinal Study of Aging. *J Am Geriatr Soc.* 2015; 63: 708-715.

Frankenfeld CL, Sikaroodi M, Lamb E, Shoemaker S, Gillevet PM. High-intensity sweetener consumption and gut microbiome content and predicted gene function in a crosssectional study of adults in the United States. *Ann Epidemiol.* 2015; 25(10): 736-742.

Freitas SML. Alimentos com Alegação Diet ou Light: Definições, Legislação e Implicações no Consumo. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 138 p.

Freitas AS, Araujo AB. Edulcorante artificial: Aspartame - uma revisão de literatura. *Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama do Instituto Federal de Educação. Ciência e Tecnologia da Bahia.* 2010; 1(1): 1-11.

Gama CS, Berk M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu, PS. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenia patients: a positive correlation. *Rev Bras Psiquiatr.* 2008a; 30(4): 337-340.

Gama CS, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Belmonte-de-Abreu, PS. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenia males. *Neurosci Lett.* 2008b; 433(3): 270-273.

Georgieff MK. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(2): 614-620.

Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Realman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006; 312(5778): 1355-1359.

Glaum SR, Hara M, Bindokas VP, Lee CC, Polonsky KS, Bell GI, Miller RJ. Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. *Mol Pharmacol.* 1996; 2: 230-235.

Goerss AL, Wagner GC, Hill WL. Acute effects of aspartame on aggression and neurochemistry of rats. *Life Sci.* 2000; 67: 1325-1329.

Gougeon R, Spidel MA, Lee K, Field CJ. Canadian diabetes association national nutrition committee technical review: non-nutritive sweeteners in diabetes Management. *Can J Diab.* 2004; 28: 385-399.

Green CH, Syn WK. Non-nutritive sweeteners and their association with the metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: a review of the literature. *Eur J Nutr.* 2019; 58: 1785-1800.

Halliwell BH, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976; 74(1):214-226.

Hooper NM, Hesp RJ, Tiekou S. Metabolism of aspartame by human and pig intestinal microvillar peptidases. *Biochem J.* 1994; 298: 635-639.

Humphries P, Pretorius E, Naude H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *Eur J Clin Nutr.* 2008; 62: 451-462.

IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: avaliação nutricional da disponibilidade de alimentos no Brasil. Rio de Janeiro, 2010.

Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor. De olho nos adoçantes. *Revista do IDEC.* 2015.

Iyyaswamy A, Rathinasamy S. Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in the brain of albino rats. *J Biosci.* 2012; 37: 679-688.

Iyaswamy A, Kammella AK, Thavasimuthu C , Wankupar W, Dapkupar W, Shanmugam W, Rajan R, Rathinasamy S. Oxidative stress evoked damages leading to attenuated memory and inhibition of NMDAReCaMKIIeERK/CREB signalling on consumption of aspartame in rat model. *J Food Drug Anal.* 2018; 26(2): 903-916.

Izquierdo I, Barros DM, de Souza TM, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 1998; 393: 635-636.

Johlin FC, Fortman CS, Nghiem DD, Tephly TR. Studies on the role of folic acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning. *Mol Pharmacol.* 1987; 31: 557-561.

Johns DR. Migraine provoked by aspartame. *N Eng J Med.* 1985; 315(7): 456.

Johnson J, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes.* 2013; 62: 3307-3315.

Kapczinski F, Dias VV, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M. Brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: beyond trait and state: comment on 'Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders. *Bipolar Disord.* 2009; 11(2): 221-222.

Koepfen, BM, Stanton, BA. *Berne & Levy Fisiologia*, 6a ed. p569. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

- Konen JA, Sia TL, Czuchry M, Stuntz PM, Bahr GS, Barth TM, Dansereau DF. (2000). Perceived memory impairment in aspartame users. Presented at the Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, New Orleans, LA.
- Kosacka J, Kern M, Klötting N, Paeschke S, Rudich A, Haim Y. Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 409: 21-32.
- Kuk JL, Brown RE. Aspartame intake is associated with greater glucose intolerance in individuals with obesity. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016; 41: 795-798.
- Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32(7): 1677-1681.
- Lean ME, Hankey CR. Aspartame and its effects on health. *BMJ.* 2004; 329: 755-756.
- Lebda MA, Sadek KM, El-Sayed YS. Aspartame and Soft Drink-Mediated Neurotoxicity in Rats: Implication of Oxidative Stress, Apoptotic Signaling Pathways, Electrolytes and Hormonal Levels. *Metab Brain Dis.* 2017; 32: 1639-1647.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology.* 1990; 186:464-478.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006; 444: 1022-1023.
- Liauchonak I, Qorri B, Dawoud F, Riat Y, Szewczuk MR. Non-Nutritive Sweeteners and Their Implications on the Development of Metabolic Syndrome. *Nutrients.* 2019; 11(3): 644.
- Lindseth GN, Coolahan SE, Petros TV, Lindseth PD. Neurobehavioral effects of aspartame consumption. *Res Nurs Health.* 2014; 37(3): 185-193.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
- Ludwing DS. Examining the health effects of fructose. *JAMA.* 2013; 310: 33-4.
- Magnuson BA, Bardana GA, Doull J, Kroes RM, Marsh GM, Pariza MW, Spencer PS, Waddell WJ, Walker P, Williams GM. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Crit Rev Toxicol.* 2007; 37(8): 629-727.
- Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and Omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001; 25(3): 463-493.

- Maher TJ, Wurtman RJ. Possible neurologic effects of aspartame, a widely used food additive. *Environ Health Perspect.* 1987; 75: 53-57.
- Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després JP, Willet WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2010; 33: 2477-2483.
- Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nut.* 2006; 84: 274-288.
- Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(38): 15075-15080.
- Martin S, Jones M, Simpson E, Van den Buuse M. "Impaired spatial reference memory in aromatase-deficient (ArKO) mice." *Neuroreport.* 2003; 14(15): 1979-1982.
- Matalon R, Surendran S, Matalon KM, Tyring S, Quast M, JinggaW. Future role of large neutral amino acids in transport of phenylalanine into the brain. *Pediatr.* 2003; 112(4): 1570-1574.
- McKean CM. The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. *Brain Res.* 1972; 47(2): 469-476.
- Mcquillen PS, Ferriero DM. Selective vulnerability in the developing central nervous system. *Pediatr Neurol.* 2004; 30: 227-235.
- Mortelmans LJ, Van Loo H, De Cauwer HG, Merlevede K. Seizures and hyponatremia after excessive intake of diet coke. *Eur J Emerg Med.* 2008; 15(1): 51.
- Mourad IM, Noor NA. Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex. *International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences.* 2011; 2(1): 4-10.
- Muroya S, Yada T, Shioda S, Takigawa M. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci Lett.* 1999; 264: 113-116.
- Murray S, Tulloch A, Criscitelli K, Avena NM. Recent studies of the effects of sugars on brain systems involved in energy balance and reward: Relevance to low calorie sweeteners. *Physiology & Behavior.* 2016; 164: 504-508.
- National Cancer Institute. Artificial Sweeteners and Cancer. U. S Food and Drug Administration FDA – Protecting and Promoting Your Health, 2014.
- Natividade DP. Uso de adoçantes dietéticos: orientações para profissionais de saúde e de ensino [dissertação de mestrado]. Pós Graduação em Ensino em Ciências da Saúde e do Meio Ambiente. Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA. 2011.

- Nettleton JE, Reimer RA, Shearer J. Reshaping the gut microbiota: Impact of low calorie sweeteners and the link to insulin resistance? *Physiol Behav.* 2016; 164: 488-493.
- Netzer N, Gatterer H, Faulhaber M, Burtcher M, Pramsohler S, Pesta D. Hypoxia, oxidative stress and fat. *Biomolecules.* 2015; 5(2):1143-1150.
- Oliveira RB, Franco LJ. Consumo de adoçantes e produtos dietéticos em indivíduos com diabetes melito tipo 2, atendidos pelo Sistema Único de Saúde em Ribeirão Preto, SP. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010; 54(5): 455-462.
- Onaolapo AY, Onaolapo OJ, Nwoha PU. Alterations in behaviour, cerebral cortical morphology and cerebral oxidative stress markers following aspartame ingestion. *J Chem Neuroanat.* 2016; 78: 42-56.
- Oron-Herman M, Kamari Y, Grossam E, Yeger G, Peleg E, Shabtay Z. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens.* 2008; 21: 1018-1022.
- Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci.* 2007; 30: 375-381.
- Palmnas MS, Cowan TE, Bomhof MR, Su J, Reimer RA, Vogel HJ, Hittel DS, Shearer J. Low-dose aspartame consumption differentially affects gut-microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLoS One.* 2014; 9(10): e109841.
- Park CH, Choi SH, Piao Y, Kim S-H, Lee Y-J, Kim H-S. Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. *Toxicol Lett.* 2000; 115(2): 117-25.
- Parthasarathy NJ, Kumar RS, Manikandan S, Narayanan GS, Kumar RV, Devi RS. Effect of methanol-induced oxidative stress on the neuroimmune system of experimental rats. *Chem Biol Interact.* 2006a; 161(1): 14-25.
- Parthasarathy NJ, Kumar RS, Manikandan S, Devi RS. Methanol induced oxidative stress in rat lymphoid organs. *J Occup Health.* 2006b; 48(1): 20-27.
- Pepino MY, Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011; 14: 391-395.
- Perez-Torres I, Ibarra B, Soria-Castro E, Torrico-Lavayen R, Pavon N, Diaz-Diaz E. Effect of glycine on the cyclooxygenase pathway of the kidney arachidonic acid metabolism in a rat model of metabolic syndrome. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011; 89: 899-910.
- Philippi ST. *Nutrição e Técnica Dietética.* 3ª Ed. Barueri, SP: Ed. Manole, 2014.
- Popkin BM, Nielsen SJ. The sweetening of the world's diet. *Obes Res.* 2003. 11: 1325-1332.
- Prokic MD, Paunović MG, Matić MM, Djordjević NZ, Ognjanović BI, Štajn AS. Prooxidative effects of aspartame on antioxidant defense status in erythrocytes of rats. *J Bio Sci.* 2017; 39: 859-866.

- Prokic MD, Paunović MG , Matić MM , Djordjević NZ , Ognjanović BI , Štajn AS, Saičić ZS. Effect of aspartame on biochemical and oxidative stress parameters in rat blood. *al. Arch Biol Sci.* 2015; 67: 535-545.
- Quevedo J, Moretto A, Colvero M, Roesler R, Ferreira MB. The Nmethyl-D-aspartate receptor blocker MK-801 prevents the facilitatory effects of naloxone and epinephrine on retention of inhibitory avoidance task in rats. *Behav Pharmacol.* 1997; 8(5): 471-474.
- Raben A, Vasilaras TH, Møller AC, Astrup A. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(4): 721-729.
- Reis C. Efeitos do adoçante dietético (aspartame) e da sacarose no peso corporal e na ingestão calórica de ratos *Wistar* [dissertação de mestrado]. Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi MB, Bernardi GF. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol.* 2006; 28: 489-496.
- Roberts HJ. Aspartame as a cause of allergic reactions, including anaphylaxis. *Arch Intern Med.* 1996; 13: 156-167.
- Robinson MB, Coyle J. Glutamate and related acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application. *FASEB J.* 1987; 1(6): 446-55.
- Roesler R, Schroder N, Vianna MRM, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MBC. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res.* 2004; 975: 207-213.
- Rogers P, Hogenkamp P, de Graaf C, Higgs S, Lluch A, Ness A, Penfold C, Perry R, Putz P, Yeomans M. Does low-energy sweetener consumption affect energy intake and body weight? A systematic review, including meta-analyses, of the evidence from human and animal studies. *Int J Obes (Lond).* 2016; 40(3): 381-394.
- Romano M, Diomedede G, Guiso L, Caccia S, Perego C, Salmona M. Plasma and brain kinetics of large neutral amino acids and of striatum monoamines in rats given aspartame. *Food Chem Toxicol.* 1990; 28: 317-321.
- Rycerz K, Jaworska-Adamu JE. Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. *Folia Neuropathol.* 2013; 51(1):10-17.
- Saris WH, Tarnopolsky MA. Controlling food intake and energy balance: which macronutrient should we select? *Curr Opin Clin Nutri Metab Care.* 2003; 6(6): 609-613.
- Saunders C, Padilha PC, Lima HT, Oliveira LM, Queiroz JA, Theme MLM. Revisão da literatura sobre recomendações de utilização de edulcorantes em gestantes portadoras de diabetes mellitus. *Rev Femina.* 2010; 38(4): 179-185.

Santana FC, da Silva JV, Carvalho VCB, Marins MLCL, Wartha ERSA, Marcellini PS, da Silva MAZP. Impacto do tipo de edulcorante sobre a aceitação de biscoitos dietéticos junto a consumidores portadores e não portadores de diabetes mellitus. *B.CEPPA*. 2012; 30(2): 287-300.

Sclafani A, Ackroff K. The relationship between food reward and satiation revisited. *Physiol Behav*. 2004; 82: 89-95.

Schernhammer ES, Bertrande KA, Birmann BM, Sampson G, Willett WC, Feskanich D. Consumption of artificial sweetener– and sugar-containing soda and risk of lymphoma and leukemia in men and women. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96(6): 1419-1428.

Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA*. 2004; 292(8): 927-934.

Silva AE, Souza MA, Gomes MSC, Souza ECM, Frazão MF, D'assunção CG, Maia CS, Tenório FCAM, Soares JKB. Evaluation of aspartame effects on food intake, physical, biochemical, and histopathological parameters in rat. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2016; 68(6): 1516-1522.

Simansky KJ. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res*. 1996; 73: 37-42.

Simintzi I, Schulpis KH, Angelogianni P, Liapi C, Tsakiris S. The effect of aspartame on acetylcholinesterase activity in hippocampal homogenates of suckling rats. *Pharmacol Res*. 2007; 56: 155-159.

Smeets PAM, de Graaf C, Stafleu A, Van Osch MJP, Van der Grond J. Functional magnetic resonance imaging of human hypothalamic responses to sweet taste and calories. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82: 1011-1016.

Sofritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D, Lambertini G, Tibaldi E, Rigano A. First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect*. 2006; 114(3): 379-385.

Solis-Medina A, Martínez-Magaña JJ, Quintanar-Jurado V, Gallegos-Silva I, Juaréz-Rojop IE, Tovilla-Zárate CF, Díaz-Zagoya JC, Hernández-Díaz YH, González-Catro TB, López-Narváez ML, Genis-Mendoza AD, Nicolini H. Astrogliosis and decreased neural viability as consequences of early consumption of aspartame and acesulfame potassium in male *Wistar* rats. *Metab Brain Dis*. 2018; 33(6): 2031-2038.

Souza MLGV, Cosata AMDD, Terra FS, Souza FV. Avaliação do efeito do aspartame em ratas tratadas durante a prenhez e o reflexo do tratamento em seus fetos. *Rev Bras Clín Méd*. 2010; 8: 328-332.

Stegink LD. The aspartame story: a model for the clinical testing of food additive. *Am J Clin Nutr*. 1987; 46(1): 204-215.

Stegink LD, Filer LJ, Jr. & Baker GL. Repeated ingestion of aspartame sweetened beverage: effect on plasma amino acid concentrations in normal adults. *Metabolism*. 1988; 37: 246-251.

- Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014; 514(7521): 181-186.
- Swithers SE, Baker CR, Davidson TL. General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behav Neurosci*. 2009; 123(4): 772-780.
- Swithers SE, Davidson TL. A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behav Neurosci*. 2008; 122(1): 161-173.
- Swithers SE, Martin AA, Davidson TL. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiol Behav*. 2010; 100(1): 55-62.
- Swithers SE. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrinol Metab*. 2013; 24(9): 431-441.
- Swithers SE, Sample CH, Davidson TL. Adverse effects of high-intensity sweeteners on energy intake and weight control in male and obesity-prone female rats. *Behav Neurosci*. 2013; 127: 262-274.
- Sylvetsky A, Rother KI, Brown R. Artificial sweetener use among children: epidemiology, recommendations, metabolic outcomes, and future directions. *Pediatr Clin North Am*. 2011; 58: 1467-1480.
- Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front. Endocrinol*. 2013; 3: 181.
- Te Morenga L, Mallard S, Mann J. Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *Brit Med J*. 2013; 346: e7492.
- Toledo MC, Ioshi SH. Potential intake of intense sweeteners in Brazil. *Food Addit Contam*. 1995; 12(6): 799-808.
- Tordoff MG, Alleva AM. Oral stimulation with aspartame increases hunger. *Physiol Behav*. 1990; 47: 555-559.
- Torloni MR, Nakamura MU, Megale A, Sanchez VHS, Mano C, Fusaro AS, Mattar R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007; 29(5): 267-273.
- Trefz F, de Sonneville G, Matthis P, Benninger C, Lanz-Englert B, Bickel H. Neuropsychological and biochemical investigations in heterozygotes for phenylketonuria during ingestion of high dose aspartame (a sweetener containing phenylalanine). *Hum Genet*. 1994; 93: 369-374.
- Udayabanu M, Kumaran D, Nair RU, Srinivas P, Bhagat N, Aneja R. Nitric oxide associated with iNOS expression inhibits acetylcholine esterase activity and induces memory impairment during acute hypobaric hypoxia. *Brain Res*. 2008; 1230: 138-149.

Von Poser Toigo E, Huffell AP, Mota CS, Betolini D, Pettenuzzo LF, Dalmaz C. Metabolic and feeding behavior alterations provoked by prenatal exposure to aspartame. *Appetite*. 2015; 87: 168-74.

White CL, Kashima K, Bray GA, York DA. Effect of a serotonin 1-A agonist on food intake of Osborne-Mendel and S5B/P1 rats. *Physiol Behav*. 2000; 68: 715-722.

Wurtman RJ. Neurochemical changes following high-dose aspartame with dietary carbohydrates. *New Engl J Med*. 1983; 309(7): 429-430.

Yang Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience. *Yale J Biol Med*. 2010; 83(2): 101-108.

Zafra MA, Molina, Puerto A. The neural/cephalic phase reflexes in the physiology of nutrition. *Neurosci Biobehav*. 2006; 30: 1032-1044.

Zanini RV, Araújo CL, Matínez-Mesa J. Use of diet sweeteners by adults in Pelotas, Rio Grande do Sul State, Brazil: a population-based study. *Cad Saúde Pública*. 2011; 27(5): 924-934.

**ANEXO**

**ANEXO A – Parecer CEUA**



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **26/02/2019**.

<b>Título do projeto</b>	EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ASPARTAME EM RATOS WISTAR: IMPACTOS NO CÉREBRO E RISCO PARA ESQUIZOFRENIA
<b>Project title</b>	BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF ASPARTAME ADMINISTRATION IN WISTAR RATS: IMPACTS ON THE BRAIN AND RISK FOR SCHIZOPHRENIA
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	055/2018-2 versão 2
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Alexandra Ioppi Zugno
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Amanda Kunz Godoi, Angelo Diego Supp, Isabela Hubbe, Louyse Suzbach Damázio, Patricia Gomes Wessler.

Finalidade	( ) Ensino      ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2019 a 01/01/2020
Espécie/inhagem/raça	Rato heterogênico/ <i>Wistar</i>
No de animais	80 machos e 80 fêmeas = 160
Idade/Peso	21-60 dias / 100 – 300 g
Gênero	Masculino e femininos
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

  
Samira da Silva Valvassori  
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 26 de Fevereiro de 2019.