



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

"ESTUDIO DE LOS EFECTOS TOXICOS DEL ASPARTAME EN RATAS WISTAR"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

MARIA YOLANDA CASTRO ANGUIANO

JOSE HILARIO FLORES MARTINEZ

ASESOR: Q.F.B. GABRIELA ESCALANTE REYNOSO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudio de los efectos tóxicos del aspartame

en ratas wistar

que presenta 1a pasante: María Yolanda Castro Anguiano
 con número de cuenta: 9402330-1 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Noviembre de 2003

PRESIDENTE	<u>QFI. Leticia Zúñiga Ramírez</u>	
VOCAL	<u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. Gabriela Escalante Reynoso</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QBP. Ma. Elena Mondragón Esquivel</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MFC. Cecilia Hernández Barba</u>	



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudio de los efectos tóxicos del aspartame
en ratas wistar

que presenta el pasante: José Hilario Flores Martínez
con número de cuenta: 9754068-5 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Noviembre de 2003

- | | | |
|------------------|-------------------------------------------|--|
| PRESIDENTE | <u>QFI. Leticia Zuñiga Ramírez</u> | |
| VOCAL | <u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u> | |
| SECRETARIO | <u>QFB. Gabriela Escalante Reynoso</u> | |
| PRIMER SUPLENTE | <u>QBP. Ma. Elena Mondragón Esquivel</u> | |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>MFC. Cecilia Hernández Barba</u> | |

DEDICATORIA

A mis padres que les puedo decir, lo son todo para mí ya que me dieron la vida, su cariño amor y comprensión. En especial a mi madre por alentarme y compartir algunos desvelos por eso y mucho más gracias.

A mis hermanos Juan Salvador y Ana Esperanza □ , por esos momentos tan bellos que me han dado.

A mi abuelita Ana María y a mis tías(os) Josefina, María Luisa por apoyarme en lo bueno y en lo malo sin pedirme nada a cambio a Luz María, Inés, Armando, Manolo, Humberto, Jaime, Seniorina, Juan por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A dios gracias por darme una familia maravillosa, por darme amigos sinceros, por haberme permitido llegar a este momento tan especial de mi vida y sobre todo por iluminar nuestras vidas.

A mi asesora QFB Gabriela Escalante Reynoso por su apoyo tanto como maestra, asesora y amiga.

A mi compañero de tesis Pelayo por su apoyo y su sincera amistad durante toda la carrera.

A mis grandes amigas Pato, Lucha, Mary Chuy, Sandy, Cristina, Norma, lili por brindarme su valiosa amistad además de su apoyo incondicional y su gran cariño.

A mis sinodales por su ayuda y comprensión durante la realización de esta tesis.

A todas aquellas personas que me brindaron apoyo, cariño, comprensión y que de alguna u otra forma estuvieron conmigo en todo momento no me queda más que sólo decirles gracias.

- La paciencia es un árbol de raíz amarga pero de frutos dulces.
- Muchos anhelos se pueden realizar cuando van acompañados de la fe, amor y entusiasmo
- Para hacer grandes cosas, no basta ser un genio, ni estar por encima de los demás hay que estar con ellos
- La felicidad es gratitud por el presente, gozo del pasado y fe en el futuro

Ma. Yolanda Castro Anguiano

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi familia por el gran apoyo que me brindaron durante toda la carrera y en la realización de esta tesis ya que gracias a sus esfuerzos y a su amor me a sido posible cumplir otro de mis objetivos en la vida, gracias siempre los amare.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México:
Por que fue, es y será siempre la máxima casa de estudios

A mi asesora QFB Gabriela Escalante Reynoso:
Por ser no solo una excelente profesora sino también por
Tu guía en los momentos difíciles, por ser una excelente persona
Y principalmente por tu amistad

A mi compañera de tesis Yola :
Por el gran trabajo, los buenos momentos y por
Haberme soportado todo este tiempo

A mis sinodales:
Por el apoyo que nos brindaron durante la realización de la
Tesis y por sus sabios consejos

A todos mis amigos y compañeros:
Por los consejos y el gran apoyo que me brindaron,
Y por los momentos inolvidables que pasamos juntos

A todos, mil gracias.

José Hilario Flores Martínez

ÍNDICE

	Página
1 Introducción _____	7
1.1 Resumen _____	10
2 Definición de edulcorantes _____	11
2.1 Clasificación _____	11
2.2 Poder edulcorante _____	12
2.3 Sinergismo del aspartame _____	14
3 Aspartame _____	15
3.1 Definición de aspartame _____	15
3.2 Aplicaciones _____	16
3.3 Antecedentes históricos _____	17
3.4 Propiedades fisicoquímicas y estructura _____	17
3.5 Solubilidad del aspartame _____	19
3.6 Síntesis química _____	21
3.7 Síntesis enzimática _____	24
3.8 Estabilidad _____	25
4 Metabolismo _____	28
4.1 Metabolitos _____	31
4.1.1 Ácido aspártico _____	31
4.1.2 Fenilalanina _____	32
4.1.3 Metanol _____	36

5	Toxicidad _____	38
5.1	Aspartame y diabetes _____	40
5.2	Aspartame y fenilcetonuria _____	41
5.3	Aspartame y embarazo _____	44
5.4	Aspartame y tumores cerebrales _____	45
6	Regulación legal _____	47
7	Objetivos _____	49
8	Desarrollo experimental _____	50
8.1	Material y equipo _____	50
8.2	Procedimiento _____	51
9	Resultados _____	54
9.1	Tratamiento estadístico efectuado _____	66
9.1.1	Descripción de los datos _____	66
9.1.2	Modelo _____	66
9.1.3	Formulación de hipótesis _____	67
9.1.4	Prueba estadística _____	67
9.1.5	Decisión estadística _____	68
9.1.6	Prueba DVS de Tukey _____	68
9.1.6.1	Diferencia entre medias _____	69
9.1.7	Decisión estadística para cada prueba _____	69

10.	Análisis estadístico de los resultados _____	71
11	Discusión _____	80
12	Conclusiones _____	84
13	Anexo _____	85
14	Bibliografía _____	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Poder edulcorante del aspartame _____	12
Tabla 2. Tipos de edulcorantes _____	13
Tabla 3. Solubilidad del aspartame _____	19
Tabla 4. Solubilidad del aspartame _____	20
Tabla 5. Resultados en la prueba de glucosa _____	54
Tabla 6. Resultados en la prueba de proteínas totales _____	56
Tabla 7. Resultados en la prueba de bilirrubina _____	58
Tabla 8. Resultados en la prueba de albúmina _____	60
Tabla 9. Resultados en la prueba de TGP _____	62
Tabla 10. Resultados en la prueba de TGO _____	64
Tabla 11. Símbolos utilizados en el análisis estadístico _____	66
Tabla 12. Diferencia entre medias _____	69
Tabla 13. Decisión estadística para la prueba de Tukey _____	69
Tabla 14. Análisis estadístico para los resultados de glucosa _____	71
Tabla 15. Análisis estadístico para los resultados de proteínas totales _____	72
Tabla 16. Análisis estadístico para los resultados de bilirrubina _____	74
Tabla 17. Análisis estadístico para los resultados de albúmina _____	75
Tabla 18. Análisis estadístico para los resultados de TGP _____	77
Tabla 19. Análisis estadístico para los resultados de TGO _____	78

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pagina
Gráfico 1. Resultados de glucosa _____	55
Gráfico 2. Resultados de proteínas totales _____	57
Gráfico 3. Resultados de bilirrubina _____	59
Gráfico 4. Resultados de albúmina _____	61
Gráfico 5. Resultados de TGP _____	63
Gráfico 6. Resultados de TGO _____	65

SIGLAS

FDA	Food and Drug Administration
FAO	Food and Agriculture Organization
NRC	National Research Committee
NAS	National Academy Science
Asp	Aspartil
Phe	fenilalanina
AMP	Adenosin monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DKP	Dicetopiperazina
t ½	Tiempo de vida media
°C	Grados Centígrados
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
Co A	Coenzima A
GTP	Guanin trifosfato
FAD	Flavina adenina dinucleótido
ACTH	Hormona adrenocortitropica
ADI	Ingesta Diaria Aceptable
JEC/FA	Expert Committee on Fodd Additives
MIT	Massachussets Institute Tecnologic
PKU	Fenilcetonuria
SCF	Comité Científico de la Alimentación
OMS	Organización Mundial de la Salud
TGO	Enzima Transaminasa glutámico oxalacética
TGP	Enzima Transaminasa glutámico pirúvica

1 INTRODUCCIÓN

Descubierto en 1965, el aspartame es un edulcorante sintético de bajas calorías que es más dulce que la sacarosa (aproximadamente 200 veces) sin un regusto amargo, su dulzura varía con el pH y diferentes temperaturas, además de su uso como edulcorante, el aspartame intensifica el sabor de algunos alimentos, principalmente en las frutas. Se vende en Estados Unidos por las compañías Ajinomoto EE.UU., La Compañía Edulcorante Holanda y la Compañía de NutraSweet®. El aspartame esta compuesto de dos aminoácidos la L-fenilalanina y del ácido aspártico.(1,9)

En 1981, el aspartame se volvió el primer edulcorante de bajas-calorías aprobado por la FDA en más de 25 años. Hoy, el aspartame se ha establecido como un componente importante en centenares de comidas y bebidas. Su sabor excelente y conveniencia para una gran variedad de productos es una opción apropiada para las personas que desean un sabor dulce sin las calorías. (3,4)

El dulce ha sido siempre para el hombre uno de los mayores placeres . El sabor dulce es por mucho el más agradable de los “sabores” básicos (agrio, salado, amargo y dulce) que todos experimentamos diariamente. Pero, hasta ahora, la búsqueda de la dulzura a significado para las personas calorías indeseables, caries o un sabor menos que perfecto.(9)

El sabor dulce del aspartame ha sido objeto de varias investigaciones con el fin de encontrar la relación entre la estructura química y el sabor. El sabor dulce del aspartame se puede explicar por la teoría AH,B propuesta por shallenberger y Acree. En adición a esta teoría se puede observar que un grupo hidrofóbico (x) de la estructura, participa en la producción del dulzor según estudios realizados de la síntesis del aspartame.

Especialmente se concluye que el sabor dulce es exhibido por las unidades funcionales en la molécula la cual esta formada de un grupo alfa-amino (AH electropositivo) y beta carbonilo (B-electronegativo) grupos de los residuos del ácido L-aspártico y de la cadena hidrofóbica del residuo de L-fenilalanina (x).

El sabor como otros procesos biológicos, ocurre por la interacción entre una sustancia y un receptor. En el caso del aspartame las unidades trifuncionales, AH-x-B, interaccionan con un receptor de la papila gustativa.

El dulzor es una propiedad subjetiva de los alimentos que hasta la fecha ningún instrumento, salvo los botones gustativos, ha sido capaz de medir. El azúcar es todavía el agente edulcorante estándar, pero tiene el inconveniente de producir obesidad y caries dental.

En tiempos de escasez, los edulcorantes artificiales permitieron la elaboración de alimentos dulces facilitando el ahorro de azúcar, pues su precio era alto. Para los diabéticos siempre han sido importantes, ya que endulzan sin aportar glucosa. Ambas son razones importantes que justifican su empleo. En la actualidad los edulcorantes se emplean cada vez más y en mayor número de productos con el pretexto del ahorro calórico; prácticamente el aspartame no tiene impacto calórico debido a su intenso poder edulcorante, produciendo con tan solo pequeñas cantidades el sabor dulce deseado en el alimento final.(1,2,9)

Aunque en los últimos años el aspartame ha causado polémica y preocupación debido a innumerables quejas referentes a sus posibles daños secundarios por su consumo, esto posiblemente debido a su toxicidad causada por sus metabolitos (metanol, ácido aspártico y

fenilalanina), hoy el aspartame se ha establecido como un componente de bajas calorías importante en muchos, alimentos sin azúcar y bebidas además ha sido el principal responsable para el crecimiento durante las últimas dos décadas del mercado en alimentos sin azúcar. Un testimonio al sabor excelente de aspartame y conveniencia para una gran variedad de productos.

Actualmente, más de 100 millones de personas alrededor del mundo consumen aspartame contenido en varios productos. El edulcorante está disponible en los EE.UU. para su uso en más de 1,500 productos, como: bebidas en polvo, vitaminas masticables, cereales, chicles, gelatinas, budines y rellenos de pastel, mezclas secas para los postres, bebidas carbonatadas, jarabes de la bebida carbonatados, mentas, los productos del tipo yogur, postres helados, bebidas de vino de fruta, dulces duros y suaves, pastillas para la tos, bebidas de malta y farmacéuticas entre otros.(1,51)

1.1 Resumen

El presente trabajo, nos muestra los resultados obtenidos en un estudio de comparación del edulcorante sintético aspartame realizado durante tres meses en ratas wistar. En dicho trabajo el aspartame, fue administrado a las ratas por vía oral con el fin de observar cambios en las pruebas bioquímicas realizadas una vez que termino el período de administración, esto fue realizando comparaciones estadísticas entre los resultados obtenidos para las concentraciones estudiadas de aspartame y un lote control en el que solo fue administrado agua.

Los resultados estadísticos obtenidos, nos ayudaran a concluir si el aspartame durante el tiempo de administración y a las concentraciones administradas provocan un efecto hepatotóxico en las ratas o si no hay evidencias de daños hepatotóxicos.

2 DEFINICIÓN DE EDULCORANTES

El término aditivo se deriva del latín *addere*, poner. La Organización de Agricultura y Alimento (FAO) define a los aditivos de los alimentos como “una sustancia no nutritiva agregada a la comida generalmente en cantidades pequeñas para mejorar su apariencia, textura o propiedades de almacenamiento” (Davis 1967).

Por otro lado el Comité de la Protección de Alimentos de los E.U., el Concilio de Investigación Nacional (NRC), y la Academia Nacional de Ciencias (NAS) (1970) define los aditivos de alimentos como “sustancias agregadas directa e intencionalmente a los alimentos con un propósito funcional, o indirectamente durante una fase de producción, proceso, almacenamiento o empaquetado sabiéndose que ellos permanecen o sirven a un propósito en el producto final”(18).

Así pues, a los agentes que proporcionan un sabor dulce añadido a algunos alimentos ya sea producido por el hombre o la naturaleza se les denomina edulcorantes(21).

2.1 Clasificación

Existen dos tipos de sustitutos del azúcar: aquellos que no aportan energía (edulcorantes no nutritivos) y aquellos que aportan energía (edulcorantes nutritivos). También suelen conocerse como edulcorantes artificiales y naturales respectivamente.

Los edulcorantes nutritivos tienen un valor calórico por unidad de peso idéntico al de la sacarosa. En este grupo se incluyen el sorbitol, la fructosa, los jarabes de maíz, la dextrosa, el manitol y el xilitol.

Los edulcorantes no nutritivos se caracterizan por un sabor intensamente dulce. Si bien algunos aportan calorías, generalmente se emplean en cantidades tan pequeñas que su contribución a la ingesta calórica total resulta despreciable. Entre los edulcorantes no nutritivos podemos encontrar la sacarina, el ciclamato, el acelsufamo K y el aspartame entre otros. Los edulcorantes artificiales constituyen una clase importante de aditivos en los alimentos que están usándose progresivamente en cantidades cada vez mayores, estos son considerados seguros en cantidades normales, por ejemplo la cantidad diaria empleada en 3 o 4 tazas de té, pero debe evitarse el consumo excesivo(9,38,63,43).

2.2 Poder edulcorante

El poder edulcorante del aspartame es de 160 a 220 veces el de la sacarosa (teniendo la sacarosa un poder edulcorante de 1), encontrándose que el poder edulcorante del aspartame disminuye a medida que la concentración de sacarosa aumenta cuando ambos se emplean en mezcla.

Tabla 1. Poder edulcorante del aspartame en relación con la sacarosa en una mezcla acuosa

Sacarosa (%)	Aspartame(%)	Poder edulcorante
0.34	0.001 - 0.007	4
4.3	0.02	2.1
10	0.075	1.3
15	0.15	1

En estudios realizados por el doctor Robert H: Mazur, se ha indicado que el reemplazo de la fenilalanina por otro aminoácido conduce a la disminución del poder edulcorante relativo y que el producto obtenido sería únicamente 50 veces más dulce que la sacarosa.

El uso de edulcorantes en los alimentos es controlado por el Sweeteners in Food Regulations y dan una lista de los edulcorantes permitidos y algunos ejemplos de su uso y su poder edulcorante en la tabla 2. (36,77).

Tabla 2. Edulcorantes permitidos y algunos ejemplos de su uso(28,73).

Edulcorante	Ejemplo de uso	Poder Edulcorante
Acelsulfame K	Alimentos enlatados, bebidas gaseosas, table-top sweeteners.	200
Aspartame	Gaseosas, Yoghurts, postres y mezcla de bebidas, tabletas	140
-Hydrogenated glucose. -Syrup isomalt. -Manitol.	Azúcar para confitería	0.6
Sacarina: -Sacarina de sodio. -Sacarina de calcio.	Gaseosas, sidra, tabletas edulcorantes, table-top sweeteners.	450
Sorbitol, almibar de sorbitol	Azúcar para confitería, mermelada para diabéticos	0.5
Thaumatococcus	Table-top sweeteners, yoghurt.	2 a 3.5
Xylitol	Azúcar para goma de mascar	1.1

2.3 Sinergismo del aspartame

El aspartame puede usarse libremente en combinación con carbohidratos y edulcorantes artificiales tales como: sacarosa, glucosa, fructuosa y sacarina. Y como se ha comprobado, este en combinación con muchos edulcorantes presenta un efecto sinergista. Por ejemplo 0.25g de aspartame combinado con 40g de sacarosa (0.62% de aspartame) es tan dulce como 100g de sacarosa pura. De igual manera 0.55g de aspartame es equivalente en dulzor a 100g de sacarosa, lo que representa un 15% de nivel sinérgico.

El nivel sinergista más alto que es de 25% se puede encontrar en la combinación de aspartame/glucosa(7)

3 ASPARTAME

3.1 Definición de aspartame

El aspartame es un potente edulcorante. Es cerca de 200 veces más dulce que la sacarosa, por lo que sólo se necesitan unas bajas concentraciones para endulzar alimentos y bebidas. Las cantidades utilizadas son tan pequeñas que el aspartame casi no aporta calorías. El excelente perfil de su gusto lo ha convertido en uno de los principales edulcorantes bajos en calorías de todo el mundo.

Otros nombres con los que se puede encontrar el aspartame son:

- N-L-alfa-Aspartil-L-fenilalanina 1-metil éster
- 3-Amino-N-(alfa-carboxyfenetil) succinimico éster del N-metilo ácidos
- APM
- SC-18862
- Canderel™
- Equal™
- NutraSweet™ (4,6)

3.2 Aplicaciones

El aspartame se utiliza para endulzar una gran variedad de alimentos y bebidas. Actualmente se utiliza en marcas conocidas de los siguientes tipos de alimentos y bebidas(9):

- bebidas refrescantes
- bebidas carbonatadas
- pudines, rellenos de pasteles, gelatinas
- postres y cremas pasteleras
- goma de mascar
- chicles
- frutas escarchadas
- Coberturas para pastel
- postres helados
- productos lácteos
- confituras, mermeladas
- cereales para el desayuno
- repostería
- bebidas de chocolate calientes
- refrescos en polvo
- multivitaminas
- caramelos de menta para el aliento
- productos farmacéuticos

3.3 Antecedentes históricos

Descubrimiento. Era diciembre de 1965 cuando Jim Schlatter, un químico de G.D Searle se encontraba trabajando en un proyecto para descubrir nuevos tratamientos para las úlceras gástricas. Probaban un nuevo compuesto anti-ulceroso (un tetrapéptido) producido normalmente en el estomago, Schlatter estaba sintetizando este tetrapéptido en el laboratorio y uno de los pasos en el proceso era hacer un dipéptido intermediario, el aspartil-fenilalanina metil éster.

En el curso de su trabajo, Schlatter tuvo contacto accidentalmente con el compuesto en su mano sin notarlo, después de esa mañana el lamió su dedo al tratar de alcanzar un fragmento de papel y fue cuando noto un sabor dulce. La curiosidad le preguntaba de donde podría venir ese sabor dulce y su primer pensamiento era del buñuelo que el había comido durante el descanso pero recordó que había ido al baño y se había lavado las manos desde entonces. Podría ser solo por el aspartil-fenilalanina metil éster con el que había trabajado, recordó que el ácido aspártico y la fenilalanina constituyentes de este producto son dos aminoácidos naturales presentes en las proteínas y decidió probar el compuesto para comprobar que en verdad el sabor dulce provenía de este compuesto(72,63).

3.4 Propiedades fisicoquímicas y estructura

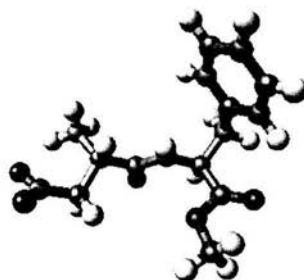
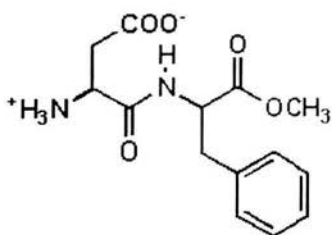
El dipéptido se presenta como un polvo blanco cristalino, inodoro con un peso molecular de 294.3g, cuya característica más importante es la de tener una capacidad edulcorante de 180 a 200 veces superior a la de la sacarosa, con un punto de fusión de 196°C, sin sabor residual amargo.

Las pruebas químicas para su identidad son: aminoácido-positivo; éster-positivo. Para detectar su pureza: claridad y color de la solución al 0.8% -claro e incoloro, sin partículas suspendidas; metal pesado 5ppm; arsénico 0.1ppm. El estudio microbiológico realizado: E. Coli negativo; salmonella negativo; staphiloccoco coagulasa positivo – negativo.(19)

El aspartame es una molécula simple, compuesta por la combinación de dos aminoácidos y una pequeña cantidad de metanol. Cada uno de estos tres componentes es un constituyente habitual de los alimentos. Los aminoácidos -ácido aspártico y fenilalanina- forman parte del grupo de componentes que constituyen los bloques generadores de proteínas. El ácido aspártico y la fenilalanina se encuentran naturalmente en casi todas las proteínas, mientras que el metanol (concretamente un grupo éster metílico) aparece ampliamente distribuido en los polisacáridos, como la pectina, que están presentes en todas las frutas y verduras.(22)

El aspartame tiene un sabor dulce con amargor mínimo para la mayoría de los catadores. Su ataque de dulzura puede ser ligeramente más lento que la sacarosa, y la dulzura puede demorar. La naturaleza peptídica del aspartame lo hace susceptible a la hidrólisis, a las interacciones con otros compuestos químicos y a las degradaciones microbianas.(7).

El edulcorante de bajo contenido calórico denominado aspartame (comercializado bajo el nombre de nutra-sweet) es el éster metílico de un dipéptido, la L-aspartil-L-fenilalanina (L-Asp-Lphe-OCH₃) y su estructura es mostrada en la figura 1(33,29,61).



Aspartil-fenilalanina metil éster

Fórmula molecular: $C_{14}H_{18}N_2O_5$

Peso molecular: 294.31

Figura 1. Estructura del aspartame.(29)

3.5 Solubilidad del aspartame

El aspartame es muy soluble en alcohol y ligeramente en agua; su solubilidad es función de dos factor importantes como son: el pH y la temperatura, su máxima solubilidad se ha encontrado a un pH de 2.2 y su mínima solubilidad a un pH de 5.2. Si se somete el aspartame a un pH de 4.0 a 20°C pierde el 20% de su sabor en un periodo de 4 a 5 meses.

Tabla 3. La solubilidad de aspartame a 25°C en (10.20 mg/ml)(46)

Agua destilada	8.68mg/ml
Metanol	3.72mg/ml
Etanol 95%	0.26mg/ml
Cloroformo	0.04mg/ml
Heptano	0.001 - 0.007%

Algunas bebidas carbonatadas tienen un pH menor, pudiendo ser la pérdida de sabor mucho más rápida, al igual que en disoluciones neutras pH 7.0, donde el 50% de su sabor puede perderse en horas (el aspartame tiene un tiempo de vida media que es número de días donde alcanza un 50% de pérdida de aspartame) como se observa en la figura 4 (46,15).

La solubilidad del aspartame a 25°C en agua y a diferentes valores de pH se muestran en la tabla 4, donde se observa que la solubilidad disminuye conforme aumenta el pH.(46)

Tabla 4. Solubilidad del aspartame a diferentes valores de pH(46)

pH	Solubilidad (mg/ml a 25°C)
3.72	18.2
4	16.1
4.05	15.2
4.27	14.5
4.78	13.8
5.3	13.5
6	14.2
7	10.2

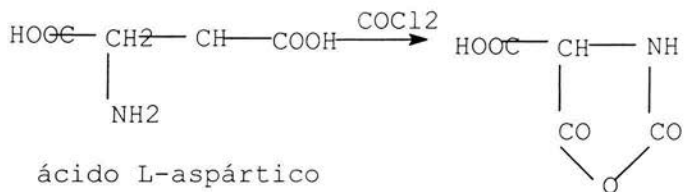
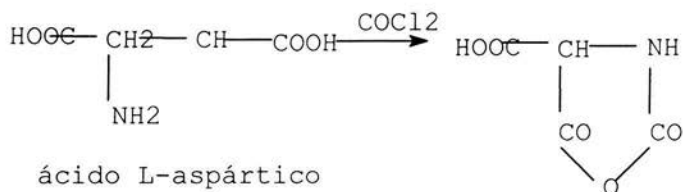
3.6 Síntesis Química

La obtención del aspartame es por una síntesis química que consta de los siguientes pasos:

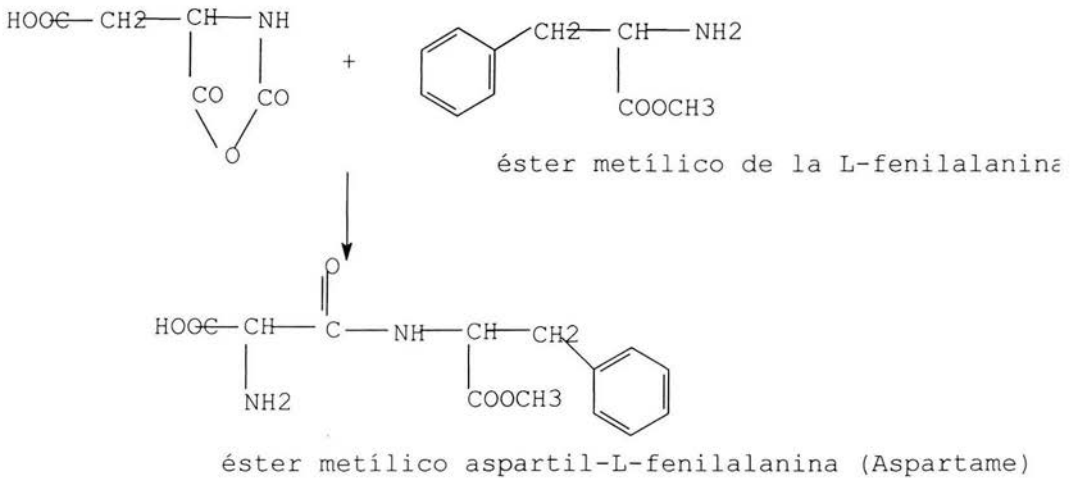
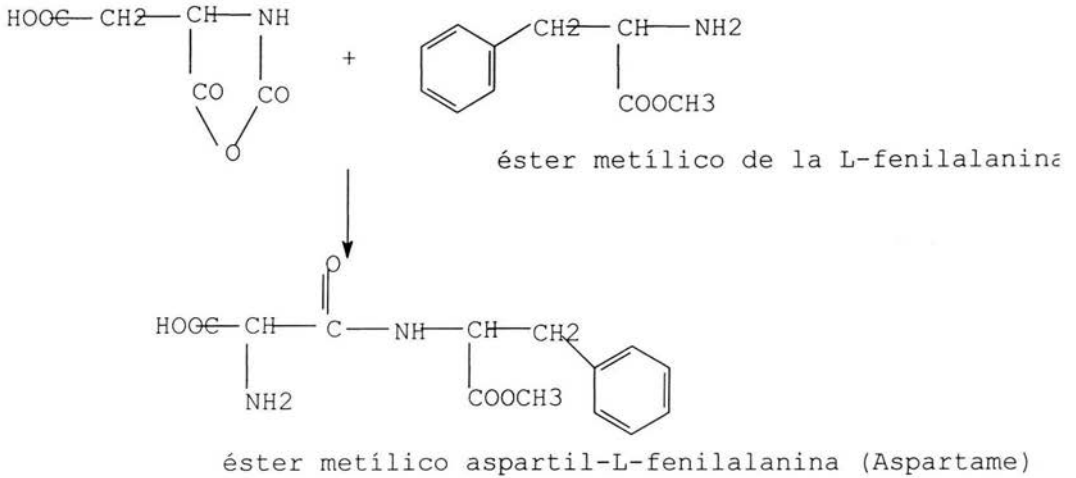
a) Esterificación de la L-fenilalanina.



b) Ciclización del ácido L-aspártico a carboxiamidas este paso es una modalidad del método de Ajinomoto que favorece la reacción del grupo carboxilo en alfa respecto al grupo amínico del ácido L-aspártico.



c) Reacción del éster metílico de la L-fenilalanina y carboxianhídrica interna del ácido L-aspartico.



La síntesis de la compañía japonesa toyosoda ha estudiado la condensación de los dos aminoácidos para producir aspartame por una vía

enzimática, evitando la necesidad de agentes bloqueantes del aminoácido y el inconveniente de obtención de isómeros.(22,78,6,11)

Aunque existen tres procesos para sintetizar de forma química el aspartame, el método clásico es efectuar la condensación del ácido N-benziloxicarbonil y el éster metílico de la fenilalanina con reactivos como el N,N-diciclohexilcarbodiimida.

El producto obtenido es reducido a aspartame mediante hidrogenación catalítica. Una desventaja de la síntesis química es la obtención de los α y β isómeros, aunque la separación del isómero es relativamente simple al disolverse en ácido clorhídrico diluido y cristalizarse posteriormente(6).

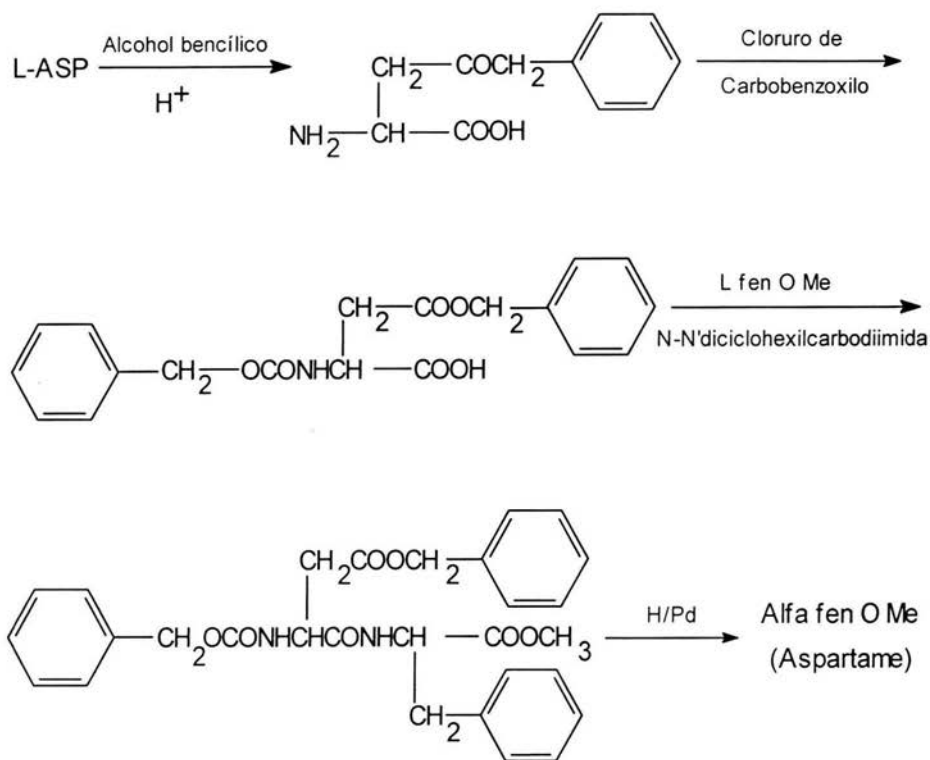


Figura 2. Síntesis química del aspartame(24)

3.7 Síntesis enzimática

Existen varios procesos enzimáticos más específicos desarrollados para la síntesis del aspartame. Por ejemplo:

tenemos el desarrollado por Genex, usando la enzima fenilalanina amonioliasa y como sustratos ácido transcinámico y amoníaco. El de la Purification Engineering Inc. que implica la trans-eliminación del ácido fenilpirúvico con la enzima aminotransferasa de *Paracoccus dentrificans*.

La de Searle, Ajinomoto, Biotécnica por fermentación directa de glucosa.

Otras compañías han desarrollado la síntesis enzimática del dipéptido mediante termolisina inmovilizada en una resina de intercambio iónico o mediante exopeptidasas microbianas.

Otro método para obtener el aspartame es con la enzima aminoacil-t-RNA sintetasa extraída de *Bacillus stearothermophilus*. En este proceso la cataliza la síntesis de la forma activa del aminoácido aminoacil-AMP en presencia de ATP. (47,29)

3.8 Estabilidad

Algunas limitantes de la estabilidad del aspartame derivan de su identidad química como el éster metílico del dipéptido aspartilfenilalanina. La molécula de este tiene dos grupos que en forma individual condiciona el comportamiento y la estabilidad; uno es el grupo carboxilo esterificado de la fenilalanina. El grupo carboxilo permite la formación de la sal del aspartame generalmente de sodio y potasio; facilitando la solubilidad de este en agua.

La estructura del aspartame contiene un par de enlaces, de los cuales depende la estabilidad del sistema donde se use este. El más sensible de estos enlaces es la unión éster. Bajo ciertas condiciones de humedad, temperatura y pH, este enlace puede hidrolizarse para producir aspartilfenilalanina o recicla el hidrolizado y producir dicetopiperazina. La dicetopiperazina puede abrirse para regresar a fenilalanina y por último ésta se puede hidrolizar para dar los aminoácidos individuales, ácido aspártico y fenilalanina.

Las reacciones químicas de hidrólisis y ciclización del aspartame son rápidas a altas temperaturas. Esta característica limita el potencial de uso para este edulcorante en productos que llevan un proceso de cocinado o que involucran el emplear altas temperaturas por tiempo prolongado. En algunos casos debido a esta característica del aspartame, para poderlo emplear en ciertos productos es necesario adicionar una cantidad extra para compensar el que se descomponga.

Estabilidad en forma seca

La estabilidad del aspartame en forma seca o polvo es completamente buena, bajo condiciones muy severas. Se necesitan temperaturas mayores a 150°C (302°F) para poder descomponer esta sustancia en su forma seca (Fig.3). No hay evidencia de una pérdida significativa de este o conversión a dicetopiperazina cuando se almacena en bolsas de polietileno.

En periodos mayores a un año, la estabilidad es buena, así como en mezclas secas.

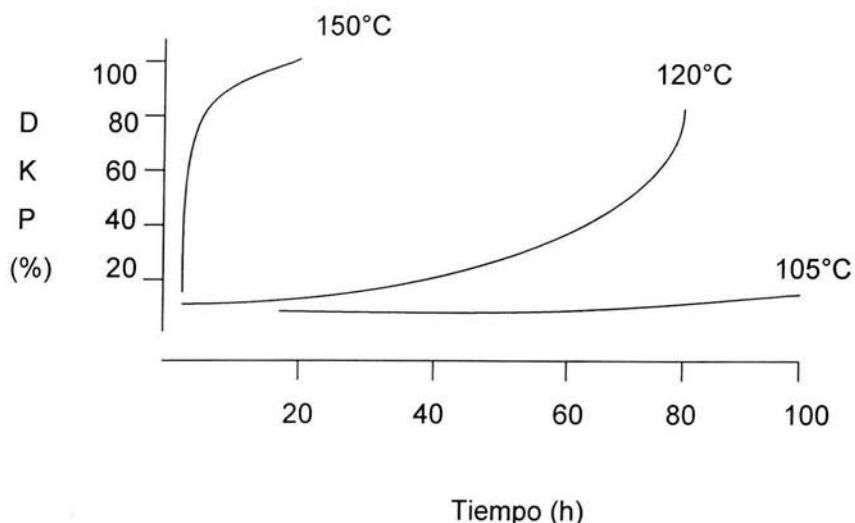


Figura 3. Descomposición del aspartame en forma seca por calor (9).

Estabilidad en solución

El aspartame contiene una unión éster que bajo ciertas condiciones de humedad, temperatura y pH pueden hidrolizarse al dipéptido o ciclohidrolizarlo a su dicetopiperazina (DKP). Entonces, la estabilidad del aspartame en solución es función de tres factores interrelacionados, tiempo, temperatura y pH (9).

Cuando el tiempo se incrementa a una temperatura dada, el porcentaje de aspartame hidrolizado aumenta. Similarmente cuando aumenta la temperatura para un proceso de tiempo dado, la cantidad de aspartame hidrolizado aumenta. El control y ajuste de cualquiera de los tres factores (tiempo, temperatura y pH) permitirá perfeccionar la estabilidad del aspartame para una gran gama de productos y las condiciones de los procesos.

El pH es especialmente importante ya que el aspartame es muy estable en el rango de pH de 2.5-5.5 (el pH óptimo es de 4.2 como puede observarse en la fig.4) rango de pH en el que la mayoría de los productos alimenticios líquidos o húmedos se encuentran, entre 3 y 5 (46,9)

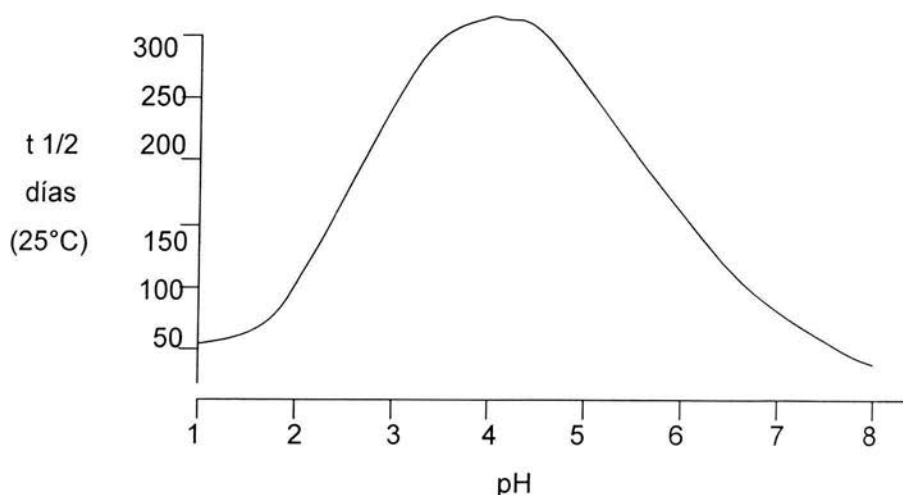


Figura 4. Perfil de estabilidad del aspartame a 25°C (9)

Hay que recordar que ninguno de los productos de la conversión (ni la aspartilfenilalanina ni la diketopiperazina) presentan sabor dulce, sin embargo, la calidad del sabor no se ve afectada.

Como se puede observar su estabilidad es un inconveniente a largo plazo y por el calor se hidroliza, fuera de un rango de pH 3-6, especialmente a temperaturas de 70°C; a esta temperatura el metanol proveniente de la descomposición del aspartame se transforma en formaldehído y ácido fórmico los cuales pueden producir acidosis metabólica(63).

4 METABOLISMO

El aspartame se metaboliza de forma segura como cualquier otro péptido, generando dos aminoácidos y produciendo metanol , al cual el cuerpo humano lo trata de forma igual al presente en las frutas cítricas y tomate.

Una vez ingerido el aspartame puede absorberse y metabolizarse en el intestino a través de dos vías principales:

- 1) Se hidroliza en el borde del cepillo de las células intestinales a sus componentes: ácido aspártico, fenilalanina y metanol, mediante enzimas proteolíticas e hidrolíticas.
- 2) Posteriormente los componentes se absorben en el intestino y pasan al sistema circulatorio de una manera similar a como lo realizan los aminoácidos procedentes del consumo de proteínas para ser llevados y metabolizados principalmente en el hígado.
- 3) Alternativamente el aspartame puede ser metilado en el intestino para producir un dipéptido formado por el ácido aspártico y la fenilalanina. Este dipéptido se absorbe directamente en las células de la mucosa mediante el mecanismo de transporte de péptidos, como una subsecuente hidrólisis . Posteriormente la fenilalanina y el ácido aspártico entran en la circulación para ser llevados a su metabolismo en el hígado. (11,30,34)

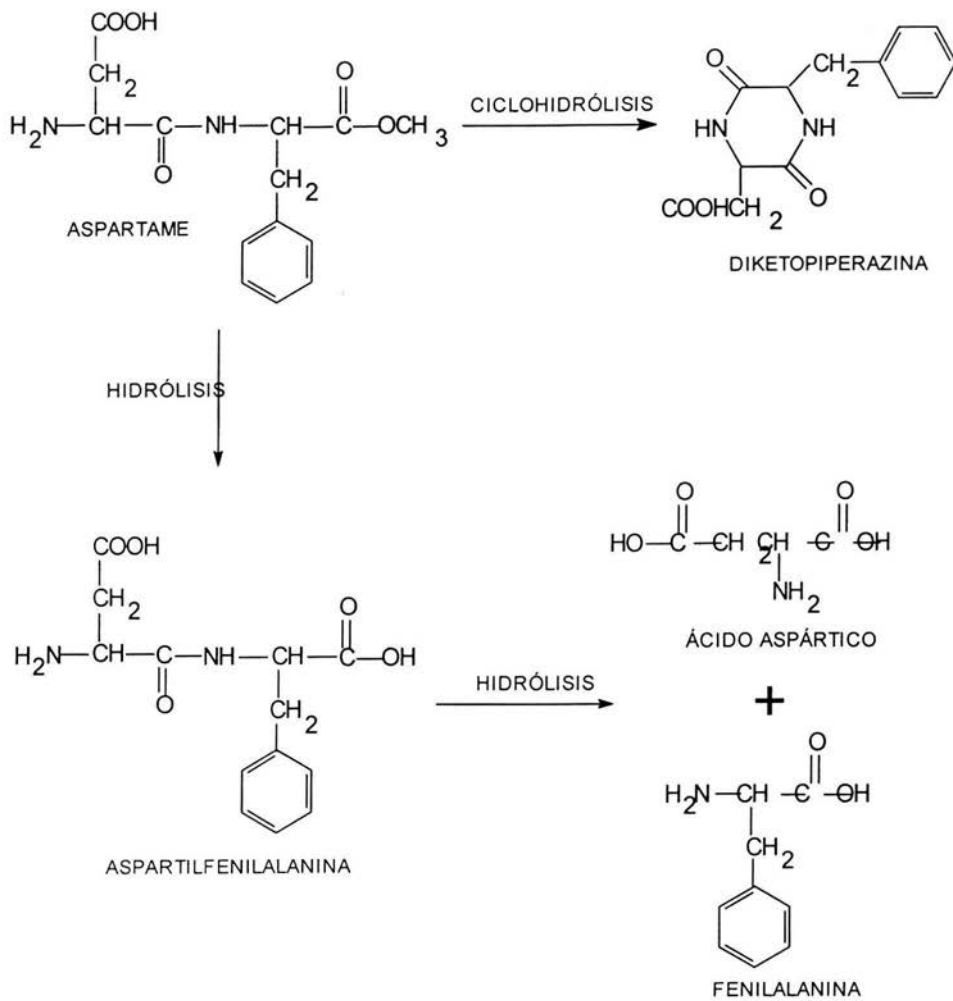


Fig.5 Productos de conversión del aspartame(29)

El metabolismo del aspartame sigue la misma vía metabólica de las proteínas la cual es la siguiente:

La digestión de las proteína se inicia en el estomago, donde se encuentran unas enzimas llamadas pepsinas, las cuales rompen algunos enlaces peptídicos . Las pepsinas son secretadas en forma de precursores inactivos (proenzimas) y se activan en el intestino. Los precursores de las pepsinas se llaman pepsinógenos y son activados por el HCl del estomago.

Las pepsinas hidrolizan las uniones entre los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina o la tirosina y un segundo aminoácido, de manera que los productos de la digestión péptica son polipéptidos de muy diversos tamaños, debido que estas enzimas tienen un pH optimo de 1.6 – 3.2, su acción termina cuando el contenido gástrico se mezcla con el jugo pancreático alcalino en el duodeno donde el pH es de 6.3.

En el intestino delgado, los polipéptidos formados en el estomago, son digeridos por las potentes enzimas proteolíticas del páncreas y de la mucosa intestinal. La tripsina, la quimotripsinas y la elasteasa actúan sobre las uniones pépticas interiores en las moléculas polipeptídicas y reciben el nombre de endopeptidasas. La carboxipeptidasas del páncreas y las aminopeptidasas del borde en cepillo son exopeptidasas que hidrolizan los aminoácidos en las terminales carboxílicas y aminas de los polipéptidos. Algunos aminoácidos son liberados en la luz intestinal, pero otros son liberados en las superficies celulares por aminopeptidasas y dipeptidasas del borde en cepillo de las células de la mucosa.

Algunos dipéptidos y tripéptidos son transportados activamente al interior de las células intestinales e hidrolizados por peptidasas intracelulares, pasando a los aminoácidos a la corriente sanguínea. Por lo tanto, la digestión final a aminoácidos ocurre en tres ciclos; la luz intestinal, el borde del cepillo y el citoplasma de las células de la mucosa.(70,34)

4.1 Metabolitos

4.1.1 Ácido aspártico

Este puede dar lugar a lesiones cervicales en rata, pero la dosis necesaria para ello sería enorme (en un ser humano sería de unos 120g), ya que es metabolizado rápidamente por transaminación convirtiéndose en un componente natural de la célula: el oxalacetato (10)

El ácido aspártico es un aminoácido natural (aminoácido no esencial), que es un componente de todas las proteínas. El ácido aspártico puede ser interconvertido en el organismo en glutamato, el cual junto con el ácido aspártico, son constituyentes de las células, siendo los principales aminoácidos que se encuentran en la mitocondria. Ambos participan en el metabolismo de la energía y del nitrógeno (ciclo de Krebs), ya que al ser eliminado el grupo amino en su molécula produce la formación de alfa-cetoácidos (en este caso el ácido oxalacético), que son compuestos intermedios del ciclo de krebs.

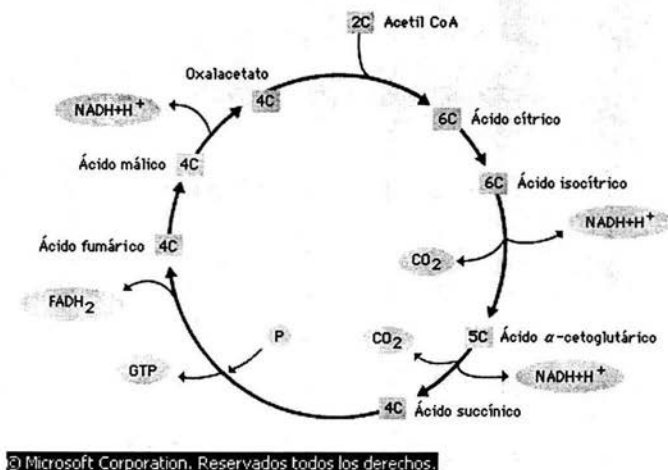


Figura 6 Ciclo de Krebs(11)

Así mismo participan activamente en el ciclo de la urea. Así pues, el ácido aspártico es importante en la síntesis de nuevo ADN y como un neurotransmisor en el cerebro. Como tal, se regulan sus niveles en el cuerpo cuidadosamente. Si el cuerpo necesita ácido aspártico, sintetiza más, usando ácido oxalacético del ciclo de Krebs. Si el cuerpo tiene un sobrante de ácido aspártico, convierte el exceso a fumarato que entra en el ciclo de krebs para proporcionar energía.

4.1.2 Fenilalanina

La fenilalanina es un aminoácido aromático esencial y en el metabolismo normal, el único papel conocido de la fenilalanina, además de su utilización para la síntesis de proteínas es su conversión en tirosina (proceso realizado en el hígado). La fenilalanina es el precursor de las catecolaminas en nuestro cuerpo (como dopamina, epinefrina, norepinefrina). Muchas drogas de las que conocemos como psicotrópicas, contienen fenilalanina. La fenilalanina es un constituyente importante de los neuropéptidos cerebrales, como la somatostatina, vasopresina, melanotropina, encefalina, ACTH, angiotensina, sustancia P y colecistoquinina. La fuente más importante de fenilalanina son los alimentos ricos en proteínas, como es la carne y los productos lácteos(49). Es importante señalar que este aminoácido se requiere en la síntesis de las proteínas y que interviene en una serie de funciones metabólicas.(26)

La fenilalanina constituye un 60% de la molécula de aspartame, es un componente esencial de las proteínas del cuerpo y un precursor importante de varios componentes aromáticos necesarios para un buen funcionamiento del organismo. La fenilalanina es un aminoácido esencial por lo que se debe suministrar en la dieta de los mamíferos, ya que estos no la pueden sintetizar.

En 1913 Embden y Baldes descubrieron que la fenilalanina puede ser convertida a tirosina en el hígado de los mamíferos. Posteriormente se comprobó que esta conversión es el paso inicial en el metabolismo de la fenilalanina.

La tirosina es el precursor inmediato de muchos de los componentes aromáticos formados por la fenilalanina. Por lo tanto los papeles nutricionales de la fenilalanina y la tirosina están íntimamente ligados.

La conversión de fenilalanina a tirosina es el primer paso en la vía principal del catabolismo de fenilalanina, consiste de una hidroxilación irreversible; también puede experimentar una transaminación con piruvato; también la fenilalanina puede ser convertida a feniletilamina por medio de una carboxilación directa con una descarboxilasa, pero esta es menos frecuente en el metabolismo de la fenilalanina.

El sistema de la enzima responsable de la conversión de fenilalanina a tirosina se encuentra en el hígado pero también en pequeñas cantidades en los riñones y páncreas. La reacción de hidroxilación depende de la coenzimas reducidas como la NADH, el sistema de enzimas consiste en dos componentes proteícos, Kaufman estableció que el sistema completo de hidroxilación consiste de dos enzimas, una fenilalanina hidroxilasa con hierro y una dihidropteridina reductasa, las cuales requieren de dos cofactores; la tetrahidropterina y el fosfato de nicotinamina adenindinucleitido reducido. Estas consumen cantidades equimoleculares de fenilalanina, oxígeno y NADPH, para producir cantidades equivalentes de tirosina.

También se requiere de la dihidrofolata reductasa la cual es un componente auxiliar necesario para la conversión inicial de la forma inactiva 7,8-dihidropterin a la forma activa 5,6,7,8,-tetrahidropterin del cofactor, el oxígeno molecular es la fuente de oxígeno necesario para la reacción en el grupo hidróxilo de la tirosina y el NADH es la coenzima reducida que es más activa que el NADPH en la reacción de la dihidropteridina reductasa(fig.6)(61).

La tirosina es el precursor inmediato de:

- a) Catecolaminas neurotransmisoras, dopamina y norepinefrina en el cerebro.
- b) Las hormonas epinefrina y norepinefrina en la médula suprarrenal, y tirosina y triyodotironina en la glándula tiroides.
- c) El pigmento melanina en la piel y otros órganos
- d) Ubiquinona que es transportadora de electrones.

Su importancia nutricional de la fenilalanina se ha determinado en ciertos estudios realizados en ratas donde si la fenilalanina se proporciona en la dieta no es necesario suministrar tirosina. También se ha encontrado que el requerimiento de fenilalanina para adultos humanos es en promedio de 12 mg por Kg. de peso corporal por día; para infantes de 2-6 meses es de 141 mg. por Kg. de peso corporal por día.(40,45)

La utilización de aspartame a los niveles concebibles en la dieta, produce una elevación de la concentración de fenilalanina en la sangre menor que la producida por una comida normal. Cantidades muy elevadas, solo ingeribles por accidente, producen elevaciones en la concentración de fenilalanina en la sangre inferiores a las consideradas nocivas, que además desaparecen rápidamente.

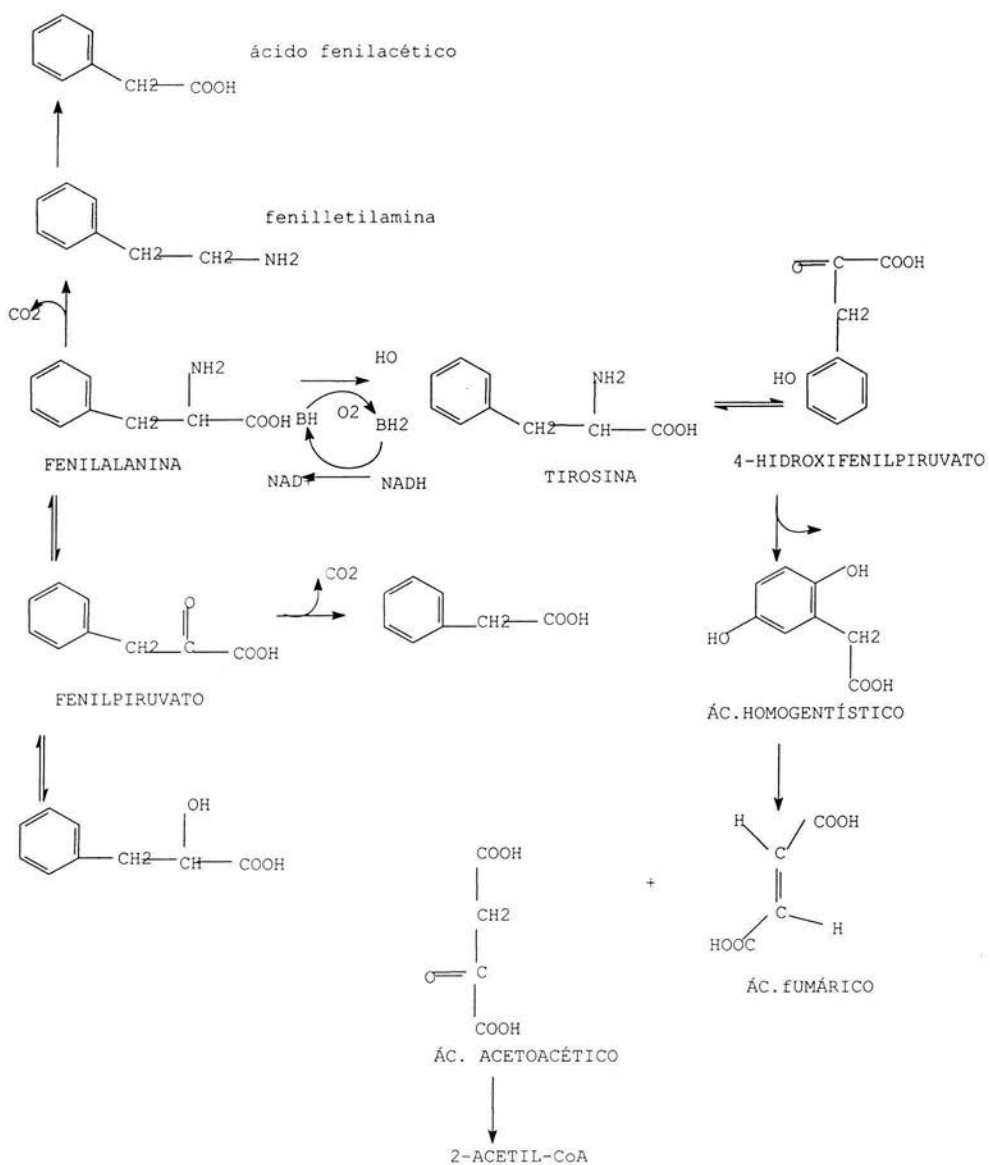


Fig. 7 Principal vía catabólica para la fenilalanina(11,61)

4.1.3 Metanol

El metanol es otro de los productos resultantes del metabolismo de aspartame, por lo que es importante mencionar la forma en que se metaboliza en el organismo.

El metanol al igual que el etanol es absorbido rápidamente del intestino y distribuido uniformemente en el organismo.

Los efectos tóxicos del metanol se deben a su conversión en formato (vía formaldehído), el cual produce entre otras cosas acidosis y ceguera. El metanol puede ser oxidado a formaldehído con la intervención de dos enzimas, la alcoholdehidrogenasa y la catalasa; aunque Lutwat-Mann mostró que esta enzima (alcoholdehidrogenasa) oxida al metanol a una velocidad menor al etanol(66).

La eliminación del metanol de la sangre es muy lenta en todas las especies, especialmente cuando se compara con el etanol(1,40,66).

Durante el metabolismo, el metanol que se ingiere, es oxidado por la acción de la enzima alcoholdehidrogenasa, en formaldehído, el cual es oxidado para producir ácido fórmico por la formaldehídedeshidrogenasa. Su biotransformación se realiza principalmente en el hígado y su eliminación como ácido fórmico por vía urinaria.

Se cree que la acumulación de formaldehído en la retina es parcialmente responsable de la ceguera que se presenta al ingerir metanol, también tiene la propiedad de precipitar las proteínas de las vías nerviosas causando daño irreparable. El ácido fórmico es un ácido orgánico bastante fuerte; por lo tanto puede sobre pasar la capacidad buffer de la sangre y producir acidosis.

No obstante se ha encontrado que la ingestión de 200mg/kg de aspartame en una sola toma (lo que es equivalente a la ingestión consecutiva de 20mg de metanol por kilogramo de peso corporal o es igual a la ingestión consecutiva de 60 latas de bebida gaseosa de una persona de 60 Kg de peso), no se ha incrementado el nivel del ácido fórmico urinario, lo cual no excede la velocidad de excreción.

Otros estudios han demostrado que dosis de aspartame de 34 mg/kg de peso corporal no produjeron aumentos detectables en la concentración de metanol en la sangre. Al ingerir 200 mg/kg el nivel fue de 2.58 mg/dl, disminuyendo rápidamente el nivel inicial al cabo de 8 horas, y no se detectó formato(66).

Respecto a su posible efecto en el embarazo, se ha determinado que dada la baja concentración de metanol que presenta el aspartame, no presenta un riesgo para las mujeres embarazadas.(13,14)

5 TOXICIDAD

La toxicidad potencial del aspartame (éster metílico de aspartilfenilalanina) se atribuye a los productos de degradación tales como: dekeopiperazina (DKP), sus componentes aminoácidos ; ácido aspártico y fenilalanina, y al metanol.

Los estudios preclínicos formaron las bases para la deliberación por la Bursau of Foods o the U.S.,Food and Drug Administration (FDA) y subsecuentemente, por los comisionados de la FDA quienes dieron la decisión final para permitir el uso de Aspartame como un aditivo alimenticio. Estos datos fueron evaluados también por la Joint FAO/WHO Expert Comité on Food Additives (JEC/FA) y fue la base para establecer la ingesta diaria (ADI).(71,47)

Para una persona de 70 Kg de peso, la ingestión de 40 mg/Kg de aspartame en una toma, puede producir aproximadamente 14 mg/KG de ácido aspártico, 17mg/Kg de fenilalanina y 3.3mg/Kg de metanol. Según la FDA la ingestión diaria aceptable es de 40mg/Kg de peso, lo cual representa 12 latas de bebida gaseosa de 12 onzas endulzadas al 100% con aspartame o el equivalente a 62 latas de bebida gaseosa endulzada con aspartame y sacarina.(42,75)

Por otra parte, otro producto de descomposición del aspartame, es la diketopiperazina (DKP), la cual se forma en la hidrólisis del éster y de la aspartilfenilalanina para posteriormente sufrir una ciclización a diketopiperazina; respecto a su toxicidad, se ha determinado que en su nivel de 3000mg/Kg de peso corporal, es aceptable ya que no contribuye a la formación de sustancias nocivas o al deterioro de la salud.

Los estudios realizados por los científicos norteamericanos Richard wurtman del Instituto tecnológico de Massachusetts (MIT) y Timothy Maher del colegio de Farmacología de Massachusetts (1986), al mostrar su preocupación sobre la toxicidad del aspartame comercializado como Nutrasweet (uso industrial) y Equal (uso público). Dichos investigadores recopilaron resultados de diferentes investigaciones, encontrando que el cerebro humano es más susceptible a los efectos del aspartame que las ratas de laboratorio y que pueden presentarse convulsiones en dosis tan bajas como 15mg/Kg de peso, debido a que la fenilalanina inhibe la síntesis de monoaminas, cuya carencia se ha asociado con padecimientos de este tipo. Así mismo se cree que el aspartame ocasiona cambios en la química cerebral lo que puede influenciar el comportamiento humano u ocasionar dolores de cabeza. Sin embargo la FDA ha rechazado la solicitud de prohibición del aspartame.(74,50,5)

Se han reportado efectos tóxicos al consumir aspartame como son (50,12,5):

- ♣ Náuseas.
- ♣ Depresión.
- ♣ Fatiga.
- ♣ Irritabilidad.
- ♣ Taquicardia.
- ♣ Insomnio.
- ♣ Problemas de visión (visión borrosa).
- ♣ Vértigo.
- ♣ Perdida de la memoria.
- ♣ Dolores de cabeza.

5.1 Aspartame y diabetes

La diabetes mellitus es la incapacidad para metabolizar adecuadamente la glucosa, lo cual origina hiperglucemia y glucosuria, se caracteriza por la alteración del metabolismo de los carbohidratos con modificaciones importantes en el metabolismo de los lípidos y proteínas; es una de las enfermedades crónicas más comunes de las sociedades industrializadas hoy en día.

La terapia de dieta es parte del tratamiento de todos los diabéticos y requiere manejo de grasas, proteínas y carbohidratos refinados. Aunque no es necesario el requerimiento de edulcorantes en la dieta del diabético, la disponibilidad de edulcorantes bajos en calorías da facilidad para diseñar comidas para estos.

Se han efectuado estudios para el empleo de aspartame por sujetos diabéticos, en los que se ha determinado la seguridad en el empleo de este edulcorante, estableciéndose que no afecta en forma adversa el control glicémico de personas insulino-dependientes, así la American Dabetes Association ha aprobado el consumo de alimentos que contienen aspartame en diabéticos.(55,53,39,48)

5.2 Aspartame y fenilcetonuria

Folling en 1934 descubrió la enfermedad genética humana relacionada al metabolismo de la fenilalanina; conocida como fenilcetonuria(PKU), la cual fue identificada como un defecto debido a la deficiencia en el sistema de oxidación de la fenilalanina.

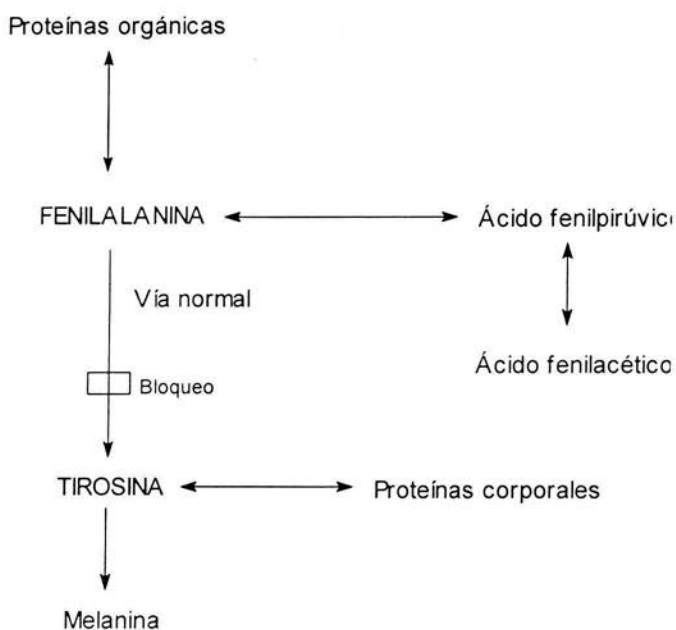


Fig. 8. *Vía normal del metabolismo de la fenilalanina, que muestra un bloqueo en la fenilcetonuria causado por falta de fenilalanina hidroxilasa(53).*

Aproximadamente se diagnostican 400 casos de fenilcetonuria cada año, el defecto se presenta en el momento del nacimiento y las anomalías metabólicas se manifiestan cuando el niño comienza a ingerir proteínas (leche).

Esta enfermedad se identifica por análisis en sangre y orina, donde son encontradas altas concentraciones de fenilalanina en la sangre, acompañado de bajos niveles en la sangre de tirosina; además en la orina se encuentra, fenilalanina junto con grandes cantidades de ácido fenilpirúvico y ácido feniláctico (la vía alterna del metabolismo de la fenilalanina es el ácido fenilpirúvico, un cetoácido de fenilalanina, y de ahí el nombre de fenilcetonuria fig.8), productos de la transaminación de la fenilalanina que normalmente se encuentra en pequeñas cantidades.

Otros compuestos aromáticos identificados son: o-hidroxifenilacetato y fenilacetilglutamina en la orina. Estos últimos le comunican a la orina un olor rancio, la cantidad de estos productos dependen de la cantidad de proteínas consumidas.

Los fenilcetonúricos son intolerantes a concentraciones elevadas de fenilalanina porque se tiene una deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa del hígado (la actividad de fenilalanina hidroxilasa en el hígado de pacientes con fenilcetonuria es aproximadamente un 0.27% de la actividad normal) que convierte este aminoácido en tirosina; la acumulación de fenilalanina o de sus derivados en la sangre provoca una mielinización deficiente del cerebro y en consecuencia un retraso mental, otro mecanismo que con mayor probabilidad explica retraso mental es la competencia entre los niveles elevados de fenilalanina y otros aminoácidos por el transporte hacia el interior de las neuronas, que generan un desequilibrio de aminoácidos que inhibe la síntesis de proteínas y la sinaptogénesis.

Restringiendo en la dieta diaria de los niños fenilcetonúricos el aporte de fenilalanina, se reduce el nivel en sangre de la fenilalanina, y se evita en grado considerable el retraso mental (68,59,49).

La forma común de esta enfermedad resulta de la ausencia hereditaria o un defecto en la síntesis de la enzima fenilalanina hidroxilasa, que se debe al estar el homocigoto de un sencillo gen recesivo autosomal, el cual es llevado por uno de cada 60 individuos, la proporción exacta varía de población a población.

Dicha enfermedad provoca desarrollo de retraso mental y anomalías electroencefalográficas, escasa pigmentación en la población que la padece; además una proporción de ellos sufren agarrotamiento.

La fenilalanina requiere especial atención al estar relacionado con esta enfermedad que se ha indicado que cerca de 1 de cada 15,000 personas (quienes heredan 2 genes autosomales recesivos), carecen de la enzima fenilalanina hidroxilasa. Al acumularse la fenilalanina en la sangre y los tejidos, se causa un daño progresivo al cerebro, manifestándose dicha enfermedad.(59)

Se han identificado tres tipos de fenilalaninemia (exceso de fenilalanina en sangre: el tipo I, fenilcetonuria clásica, se caracteriza por la elevada concentración sanguínea de fenilalanina, siempre superior a 20mg por 100ml, y por excreción de este ácido y sus metabolitos en la orina. La hiperfenilalaninemia de tipo II se caracteriza por una elevada concentración sanguínea (menos de 15 o 20mg por 100ml) de fenilalanina acompañada por excreción de ácido fenilpirúvico y la hiperfenilalaninemia transitoria y benigna de tipo II, se caracteriza por un alto valor de este ácido (mayor de 20mg por 100ml, cifra que con el tiempo se acerca a normal(37,61).

Puesto que el aspartame también es una fuente de fenilalanina, todos los productos de comida que contienen aspartame son claramente etiquetados para indicar la presencia de fenilalanina para que esas personas que padecen fenilcetonuria puedan evitar consumir estos productos. Este etiquetado es un requisito legal(42).

5.3 Aspartame y embarazo

Desde la introducción del aspartame al mercado, ha existido considerable polémica sobre su seguridad, incluyendo posibles efectos teratogénicos sobre el feto en crecimiento.

La ingesta diaria aceptable (IDA) de aspartame es de 50 mg/kg de peso corporal, para alcanzar la IDA, sería preciso que una persona de 50 kg de peso consumiese el equivalente a 12 latas de bebida gaseosa dietética endulzada con aspartame al 100% o 71 sobrecitos de EQUAL.

Estudios realizados con mujeres y animales, en los que se les administraba cantidades de aspartame significativamente superior al IDA (200 mg/kg para humanos, 100 mg/kg para animales o el equivalente a 100-200 latas de soda dietética para una persona de 68 kg) no parecieron demostrar efectos adversos sobre el feto en crecimiento. Basándonos en las investigaciones realizadas, es mejor aconsejar a las embarazadas que consumen in forma regular productos endulzados con aspartame que no ingieran más de 2-3 porciones diarias de los mismos(49).

En otras investigaciones en el que se sabe que la fenilalanina se concentra en el lado fetal de la placenta, se han realizado varios estudios con el fin de determinar si el consumo de aspartame eleva las concentraciones de fenilalanina en el plasma en una cantidad suficiente para causar daños al feto. Se ha demostrado que a concentraciones de 18mg/dl en el nivel sanguíneo materno puede provocar al infante un retraso mental severo, mientras que a concentraciones de 20mg/dl en el nivel sanguíneo materno hay presencia de microcefalia, en comparación con un nivel menor de 10mg/dl es el que se considera seguro(40)

5.4 Aspartame y tumores cerebrales

Las tasas de incidencia del cáncer del cerebro han estado aumentando en los Estados Unidos, tanto en adultos como en niños. La posibilidad de que el aspartame, un edulcorante artificial ampliamente ingerido, pueda ser una causa del cáncer del cerebro en humanos fue sugerida en un reporte reciente de Olney y otros. A partir de un análisis descriptivo de datos nacionales acerca del cáncer, se observó un crecimiento en las tasas de cáncer del cerebro en los Estados Unidos, lo cual coincidía con la introducción del aspartame en los productos alimenticios en los primeros años de los 1980.

Como parte de un estudio a nivel de la población de casos bajo control relacionados con los factores de riesgo ambientales y nutricionales para un tumor cerebral pediátrico, se recolectaron datos acerca del consumo del aspartame antes de la fecha de diagnóstico para los pacientes del caso (o una fecha que sirve de referencia comparable para los sujetos del control). Estos datos fueron proporcionados en entrevistas personales por las madres biológicas de los niños sometidos al estudio (32).

Los resultados indicaban que no era más probable que los niños del caso consumiesen en comparación más que los niños del control en cuanto a alimentos conteniendo aspartame, ya sea de todas las fuentes combinadas de aspartame o proveniente de los refrescos de dieta. No se observó riesgo elevado de tumor cerebral para un niño, que se haya producido por el consumo de aspartame por la madre durante el embarazo, ni tampoco se encontraron riesgos elevados durante ningún trimestre del embarazo ni durante la lactancia. Además no hubo evidencia de asociación alguna entre el aspartame y el tumor cerebral cuando el análisis se estratificó por subgrupos histológicos (astroglial, neuroectodermal primitivo, y demás) (32).

Han habido numerosos estudios relacionados con los efectos neurotóxicos potenciales del aspartame. Sin embargo, pocos reportes experimentales o bioquímicos relacionados con el carácter carcinógeno del aspartame aparecen en la literatura científica existente. Antes de la aprobación del aspartame para el consumo humano, la FDA y una junta pública de encuestas designada por la FDA examinó varios estudios para determinar si el aspartame podía inducir neoplasmas en el cerebro de ratones o ratas. Los estudios con los ratones fueron negativos, pero la interpretación de dos de los tres estudios de ratas diferían inicialmente entre la FDA y su junta pública de encuestas. Estas diferencias fueron resueltas y el comisionado de la FDA concluyó que el aspartame no contribuía a la formación de tumores cerebrales en las ratas (32).

6 REGULACIÓN LEGAL

Este edulcorante fue aceptado inicialmente para su uso en E.U. Sin embargo, por las objeciones de algunos científicos, la FDA detuvo la aprobación de este edulcorante en Diciembre 5, de 1976. Tras varias investigaciones posteriores la FDA aprobó el uso de aspartame en 1981 para usos en ciertos alimentos.

El aspartame es un edulcorante aprobado en la *Directiva 94/35/EC del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de Junio 1994, relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios*. Esta Directiva entró en vigor para los Estados Miembros el 31 de diciembre de 1995.

El aspartame está autorizado en más de 90 países. El aspartame se utiliza ampliamente a lo largo y ancho de Europa Oriental y Occidental, Estados Unidos, Canadá, Sudamérica, Australia y Japón.

El aspartame ha sido revisado y encontrado seguro por el Comité Científico de la Alimentación de la Comisión Europea (SCF), el Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) de la FAO/OMS¹, así como por la Administración de Estados Unidos para Alimentos y Medicamentos (FDA).

Evaluación de Seguridad. La seguridad en el uso de un aditivo de alimentos o el riesgo por consumir un aditivo de alimentos es evaluado con ensayos donde son alimentados animales de laboratorio. La aceptabilidad de un aditivo de comida es determinada entonces normalmente de los resultados calculados en estos estudios, un calculo de la ingesta diaria aceptada (IDA) para el hombre.

La Ingesta Diaria Admisible (IDA) para el aspartame se ha fijado en 40 mg por kilo de peso corporal (JECFA) en 1981 a e, 1984 por el Comité Científico de la Alimentación (SCF) de la Comisión Europea.(56)

Es una política de la Comunidad Europea que, "todos los aditivos alimentarios deben mantenerse en observación continua y deben ser reevaluados siempre que sea necesario en función de los cambios que se produzcan en sus condiciones de uso y de la aparición de nuevas evidencias científicas."

Este edulcorante ha sido considerado como seguro para su empleo por cerca de 90 países incluyendo a México por organismos tales como el Comité científico de Productos Alimenticios de la CEE y el comité conjunto de expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS y por diversos organismos como el consejo de Asuntos Científicos de la Asociación Médica Americana, la Rama Canadiense de Protección a la Salud, el Instituto Danés de la Alimentación, la Academia Americana de Pediatría y el Comité Británico Sobre la Toxicidad de los Químicos en Alimentos.

Con el fin de asegurar el empleo adecuado de este edulcorante, el producto que lo obtenga debe mostrar en su etiqueta "contiene fenilalanina".(3,77,74)

En la actualidad aun existe la controversia con respecto a la toxicidad y efectos adversos ocasionados por el aspartame, controversia que se va disipando poco a poco debido a los numerosos estudios que aun se realizan para asegurar que el consumo de los productos que contienen este edulcorante no producirán daño alguno al organismo. Sin embargo debe tenerse una especial atención para las personas con el síndrome de fenilcetonuria y las mujeres embarazadas ya que estos podrían presentar complicaciones por el consumo de aspartame.

Así pues, el empleo de edulcorantes artificiales representa una alternativa de consumo para personas con problemas de salud (por ejemplo en la diabetes o en la obesidad), o para aquellas personas con problemas de consumo que deben limitar su ingestión calórica de una manera adecuada, uno de los que más se utiliza es el aspartame más conocido como Nutrasweet, no obstante a los resultados del presente trabajo deben considerarse las limitaciones que se presentan para su empleo.

7 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos tóxicos del edulcorante sintético aspartame, administrando dosis diarias a ratas wistar y determinando parámetros bioquímicos para corroborar su seguridad en el consumo humano.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estudiar tres concentraciones diferentes de aspartame a partir de cuatro lotes homogéneos, de los cuales uno será el lote control.

Evaluar y comparar los datos obtenidos para observar posibles cambios en los resultados debido al aspartame.

Determinar si existe algún efecto agudo por el consumo del aspartame en el tiempo de administración.

8 DESARROLLO EXPERIMENTAL

8.1

Material y equipo

- 58 ratas wistar machos como material biológico
- Tubos de ensaye
- Gradillas metálicas para tubos de ensaye
- Pipetas graduadas de 0.1, 1, 2 y 5 ml
- Piseta
- Termómetro
- Vasos de precipitado de 250, 500 y 1000 ml
- Vidrio de reloj
- Probeta de vidrio 100 ml
- Sonda metálica
- Jeringas de 10 ml
- Agujas para insulina
- Pipeta Pasteur
- Balanza granataria de 1 plato
- Balanza granataria de 2 platos
- Balanza analítica
- Centrifuga de camisas
- Baño María
- Espectrofotómetro digital compur M 2000 CS
- Celdas para espectrofotómetro

Reactivos

- Aspartame (NutraSweet™)
- Agua destilada
- Kit de bilirrubina directa Diagnósticos Delta®
- Kit de transaminasas 200
- Kit para la prueba de Glucosa
- Proteínas totales: Reactivo de Biuret
 - Solución de NaCl 0.9%
 - Std. de albúmina
- Determinación de albúmina: Solución de sulfatos-sulfitos
 - Éter etílico
 - Solución de NaCl 0.9%
 - Reactivo de Biuret

8.2

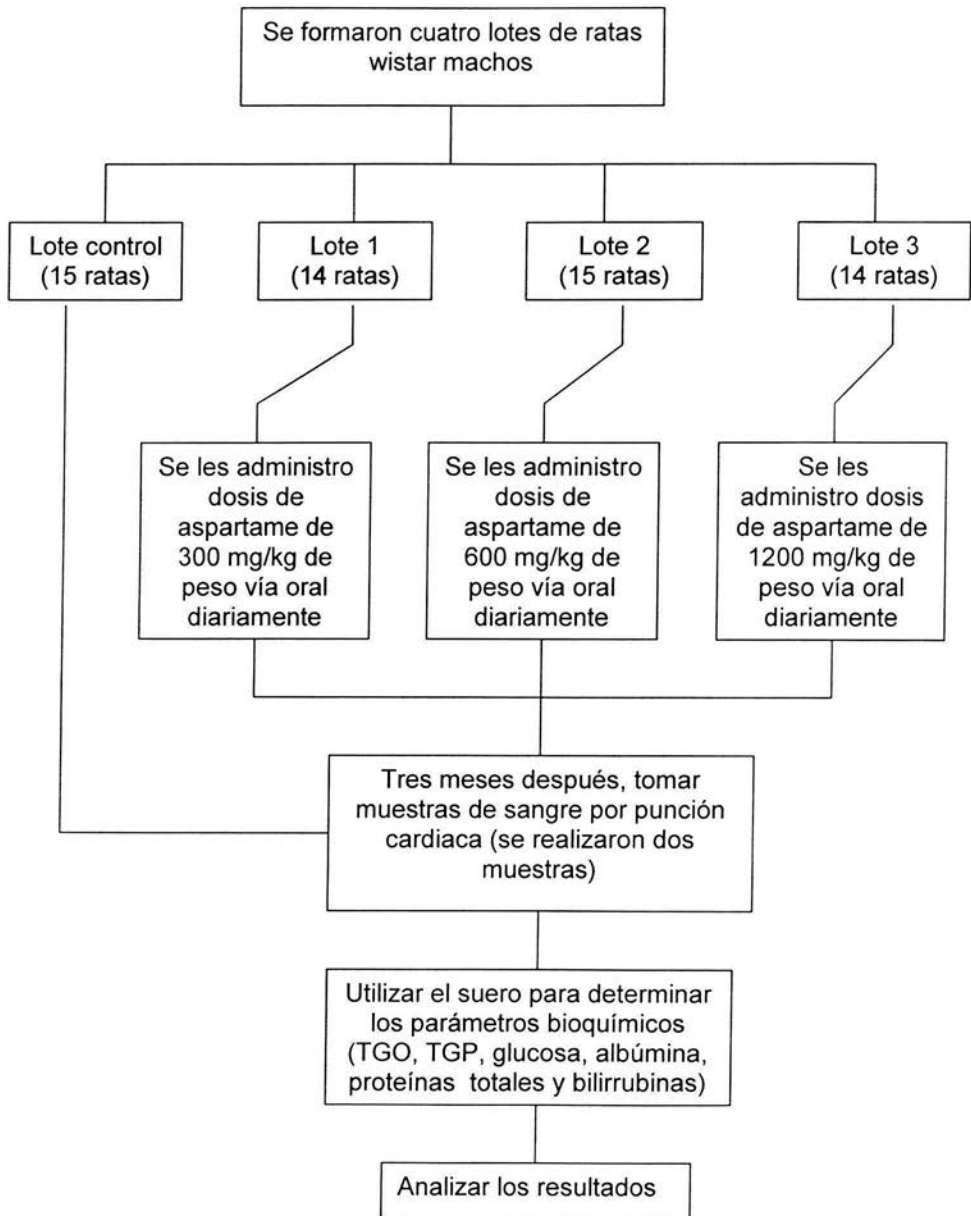
Procedimiento.

- Se marcaron, sexaron y pesaron 58 ratas wistar para dividir en 4 lotes.
- De estos 4 lotes, uno corresponde al control y los restantes a los lotes problema que se repartirán de la siguiente forma:
 - Lote Control 15 ratas
 - Lote 1 14 ratas
 - Lote 2 15 ratas
 - Lote 3 14 ratas
- Los lotes problema se trataron con el edulcorante sintético aspartame (NutraSweet™) el cual se disolvió en agua a temperatura ambiente y se administro por vía oral con ayuda de una sonda, mientras que el lote control solo bebió agua.
- El aspartame se administro diariamente por un lapso de 3 meses
- Al lote 1 se le administro dosis de aspartame de 300 mg/kg de peso*
- Al lote 2 se le administro dosis de aspartame de 600 mg/kg de peso*
- Al lote 3 se le administro dosis de aspartame de 1200 mg/kg de peso*
- Una vez transcurrido el tiempo de administración, se le realizo la punción cardiaca a todas las ratas para obtener las muestras de sangre.
- Se tomaron 2 muestras para cada rata, la segunda muestra se tomo 3 días después de haberse realizado la primera muestra.
- Se centrifugaron las muestras a 2500 rpm para obtener el suero

- Se separo con cuidado el suero con una pipeta Pasteur para evitar la hemólisis
- A partir del suero obtenido se determinaron los parámetros bioquímicos TGO (transaminasa glutámico oxalacético), TGP (transaminasa glutámico pirúvica), Proteínas totales, Albúmina, bilirrubina directa y determinación de glucosa (ver anexo).
- Las ratas se sacrificaron una vez obtenida la segunda muestra de sangre.
- A los datos obtenidos en las pruebas bioquímicas se les realizo el tratamiento estadístico de Análisis de Varianza (ANADEVA) y la prueba de Tukey.
- Por último se concluyo a partir de los datos analizados.

* **Nota.-** Justificación de las dosis utilizadas para este experimento: Dado que hoy en día el consumo de alimentos dietéticos se encuentra en auge, la mayoría de estos alimentos dietéticos son endulzados con aspartame y además las persona no suelen consumir solo un producto con este edulcorante, sino que llegan a consumir una gran cantidad de estos alimentos durante el día, lo que puede ocasionar que se rebase la ingesta diaria admitida por la OMS (40 mg/kg de peso corporal), por esta razón decidimos utilizar concentraciones muy elevadas para nuestro experimento (300 mg/kg, 600 mg/kg, 1200 mg/kg) y poder demostrar si a estas concentraciones el aspartame puede producir efectos hepatotóxicos.

Diagrama 1. Diagrama de flujo que explica el proceso que se llevo a cabo durante la fase experimental



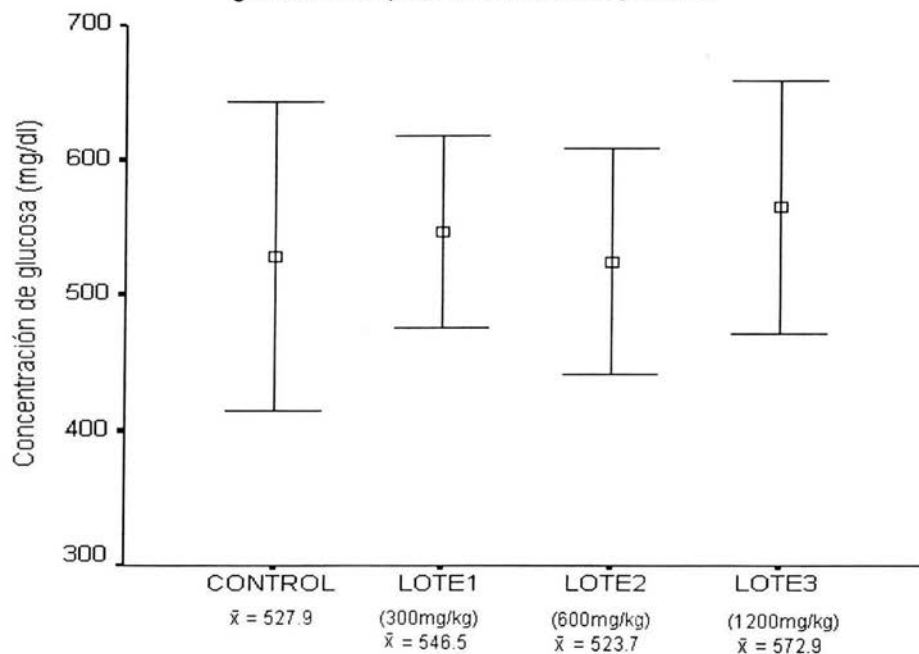
9 RESULTADOS

Tabla 5 Tabla que presenta los mg/dl de glucosa obtenidos en el experimento de comparación del aspartame bajo cuatro condiciones diferentes.

# de rata	Control	Lote 1 (300 mg/kg)	Lote 2 (600 mg/kg)	Lote 3 (1200 mg/kg)
1	553	553	547	531
2	464	504	518	591
3	504	514	606	434
4	652	458	580	818
5	799	516	573	600
6	640	553	621	621
7	624	647	105	503
8	56	183	398	852
9	660	576	598	866
10	604	642	585	551
11	270	691	567	273
12	509	739	587	260
13	----	480	----	567
14	----	595	----	554
15		----		436

Nota: Casillas vacías debido a muerte o por hemólisis de la muestra

Gráfico 1. Resultados de glucosa obtenidos a partir del estudio de concentraciones diferentes y un grupo control representados gráficamente para un estudio comparativo



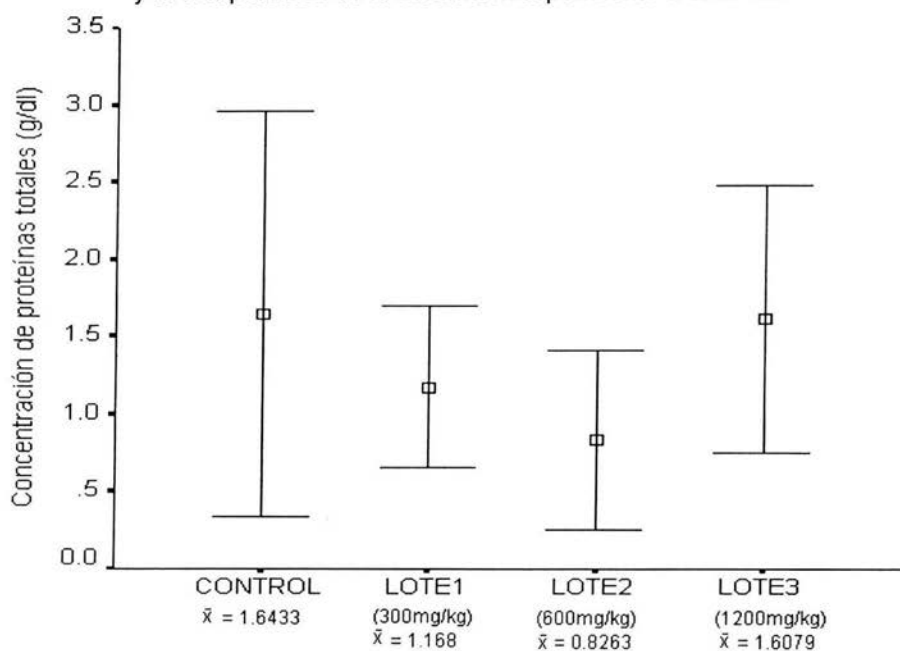
El cuadrado al centro de cada barra representa la media de cada lote

Tabla 6 La siguiente tabla corresponde a los resultados obtenidos en la determinación de proteínas totales en g/dl bajo cuatro condiciones diferentes en la dosis de aspartame.

# de rata	Control	Lote 1 (300 mg/kg)	Lote 2 (600 mg/kg)	Lote 3 (1200 mg/kg)
1	0.3	0.95	0.09	1.37
2	0.93	0.75	0.38	3.49
3	0.84	0.78	2.02	0.29
4	0.4	0.27	0.18	0.39
5	7.42	3.11	0.24	2.74
6	0.45	0.72	0.6	2.82
7	0.5	0.94	0.11	0.69
8	0.21	0.41	3	2.16
9	3.35	2.2	1.62	1.02
10	0.91	0.48	0.39	0.67
11	0.03	0.86	0.46	0.11
12	4.38	0.54	----	5.77
13	----	3.66	----	0.61
14	----	1.13	----	0.38
15		0.72		----

Nota: Casillas vacías debido a muerte o por hemólisis de la muestra

Gráfico 2. Gráfico de barras de los datos obtenidos en la prueba de proteínas totales donde se observa la distribución de las concentraciones y la comparación de la media correspondiente a cada lote

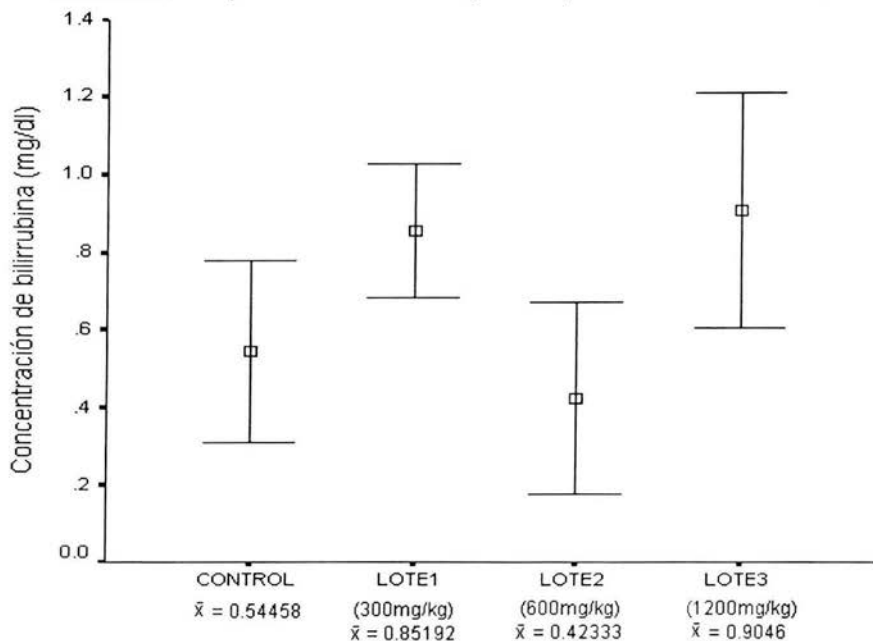


El cuadrado al centro de cada barra representa la media del lote

# de rata	Control	Lote 1 (300 mg/kg)	Lote 2 (600 mg/kg)	Lote 3 (1200 mg/kg)
1	0.17	1.03	0.59	1.215
2	0.54	0.88	0.17	0.635
3	0.43	0.39	0.11	0.625
4	0.8	0.7	0.52	0.4
5	0.785	0.465	0.19	1.075
6	0.49	1.09	0.17	0.8
7	0.71	0.81	0.23	0.33
8	0.17	1.14	0.27	1.19
9	1.46	0.87	0.95	0.505
10	0.18	1.25	0.29	1.47
11	0.28	1.22	0.2	0.54
12	0.52	0.61	1.39	1.45
13	----	0.62	----	1.35
14	----	----	----	1.8
15	----			----

Nota: Casillas vacías debido a muerte o por hemólisis de la muestra

Gráfico 3. Gráfico de barras que muestra la variabilidad de los resultados obtenidos en la prueba de bilirrubina y la comparación de sus medias

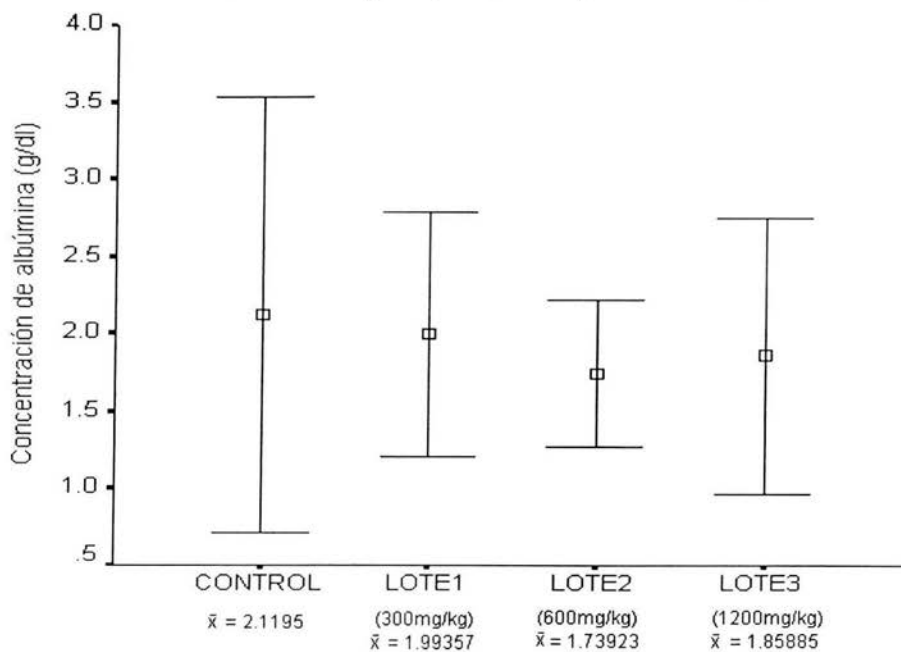


El cuadrado al centro de cada barra representa la media del lote

# de rata	Control	Lote 1 (300 mg/kg)	Lote 2 (600 mg/kg)	Lote 3 (1200 mg/kg)
1	1.025	4.77	1.95	4.785
2	1.22	0.82	1.17	2.58
3	2.45	0.455	1.93	0.415
4	8.07	3.07	1.54	1.2
5	2.86	1.355	0.64	0.3
6	0.42	5.195	2.38	1.155
7	0.39	0.81	2.03	5.53
8	1.5	1.46	1.11	1.665
9	1.42	1.46	3.79	1.62
10	1.84	2.42	1.25	0.94
11	----	0.95	1.73	1.96
12	----	0.915	0.63	0.6
13	----	2.69	2.46	1.35
14	----	1.54	----	----
15	----			----

Nota: Casillas vacías debido a muerte o por hemólisis de la muestra

Gráfico 4. Representación gráfica en barras de los resultados obtenidos en la prueba de albúmina donde puede observarse la variabilidad de los resultados y comparar sus respectivas medias



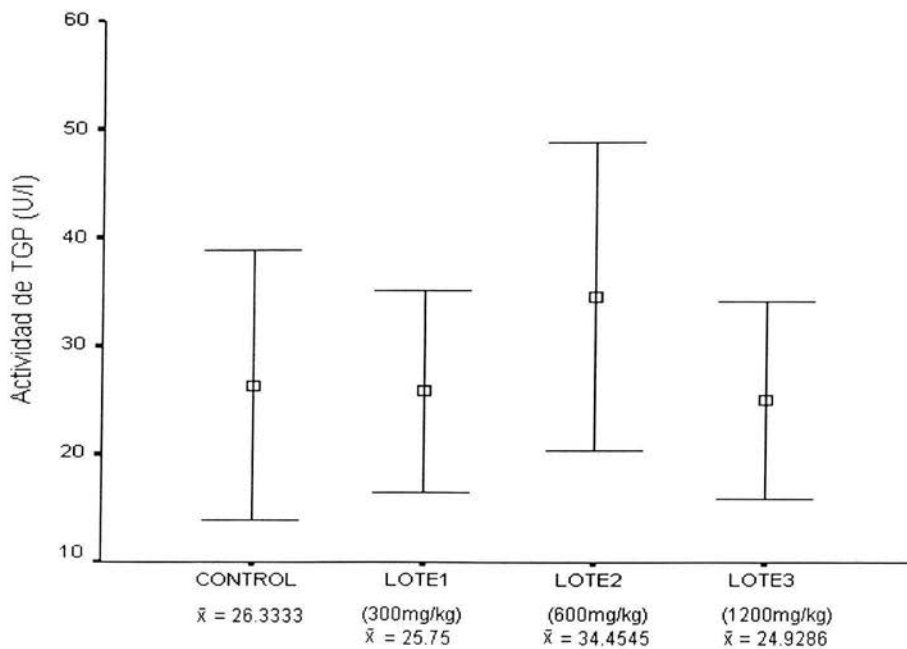
El cuadrado al centro de cada barra representa la media del lote.

indica la actividad en U/I de la enzima bajo las cuatro condiciones diferentes de aspartame.

# de rata	Control	Lote 1 (300 mg/kg)	Lote 2 (600 mg/kg)	Lote 3 (1200 mg/kg)
1	11	30	8	44
2	15	37	35	10
3	82	38	11	15
4	20	27	19	59
5	11	14	54	33
6	18	12	8	53
7	25	3	45	12
8	10	14	78	4
9	71	48	42	12
10	21	3	60	28
11	2	46	19	12
12	12	37	----	27
13	59	----	----	27
14	12	----	----	13
15	26			----

Nota: Casillas vacías debido a muerte o por hemólisis de la muestra

Gráfico 5. Gráfico de barras que muestra la variabilidad en la actividad de la enzima TGP y la comparación de las medias obtenidas para cada lote



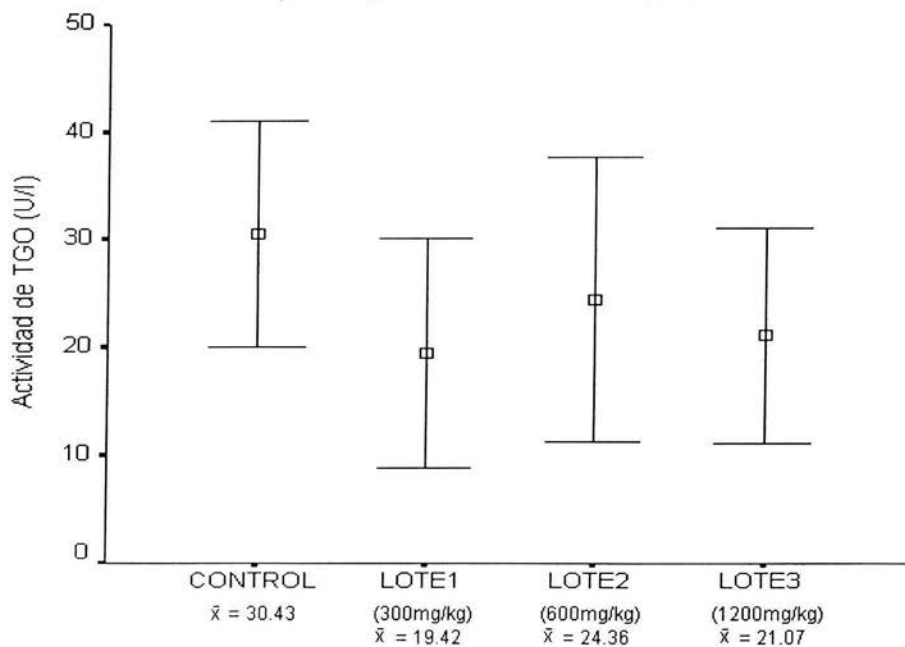
El cuadrado al centro de cada barra representa la media de cada lote.

Tabla 10 Los siguientes datos representan la actividad de la enzima TGO (Transaminasa Glutámico Oxalacética) en U/l, para un estudio comparativo bajo condiciones diferentes en la dosis de aspartame.

# de rata	Control	Lote 1 (300 mg/kg)	Lote 2 (600 mg/kg)	Lote 3 (1200 mg/kg)
1	11	75	12	8
2	22	8	41	11
3	44	22	16	2
4	42	12	9	14
5	35	15	6	58
6	22	11	8	6
7	29	13	78	9
8	23	6	44	23
9	20	12	20	17
10	45	14	19	36
11	6	20	15	6
12	10	25	----	27
13	34	----	----	18
14	83	----	----	60
15	----			----

Nota: Casillas vacías debido a muerte o por hemólisis de la muestra

Gráfico 6. Gráfico en barras que muestra la variabilidad en la actividad de la enzima TGO y la comparación de las medias para cada lote



El cuadrado al centro de cada barra representa la media de cada lote.

Se eligió un análisis unilateral de varianza, para el cual se investiga la fuente de variación, para probar la hipótesis nula que indica que los cuatro tratamientos en nuestra investigación son iguales

9.1.1 Descripción de los datos

El tratamiento estadístico se aplicó a cada parámetro medido: Albúmina, proteínas totales, glucosa, transaminasas, bilirrubinas y a cada uno de los cuatro lotes estudiados.

9.1.2 Modelo

Para cada lote se obtuvo la media, sumatoria de los valores por lote, la media de todos los valores (los cuatro lotes). Teniendo un valor de $K=4$, ya que estas son el número de poblaciones y un valor de significancia de 0.005

Tabla 11 Símbolos utilizados en el análisis estadístico

VALOR	SÍMBOLO
Valor representado por la muestra	X
Media por lote	μ_x
Gran media	μ
Sumatoria por lote	Σx
Sumatoria total	$\Sigma \Sigma x$ o T
Número de muestras por lote	n
Número por poblaciones	K
Nivel de significación	A
Total de observaciones en el experimento	N

9.1.3 Formulación de hipótesis

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Se trata de probar que la hipótesis nula que indica que todas las medias del tratamiento o la población completa son iguales, contra la alternativa de que los miembros de al menos un par sean diferentes.

Ho: $\mu_1=\mu_2=\mu_3=\mu_4$; Donde μ_x corresponde a las medias por lote

HA: no todas las μ_x son iguales

9.1.4 Prueba estadística

Suma total de cuadrados

$$SC_{\text{total}} = (X_1 + X_2 + \dots + X_N) - (T)^2 / N$$

Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$SC_{\text{dentro}} = (X_1 + x_2 + \dots + X_N) - (\Sigma x_1^2 / n_1 + \Sigma x_2^2 / n_2 + \Sigma x_3^2 / n_3 + \Sigma x_4^2 / n_4)$$

Suma de cuadrados entre grupos

$$SC_{\text{entre}} = (\Sigma x_1^2 / n_1 + \Sigma x_2^2 / n_2 + \Sigma x_3^2 / n_3 + \Sigma x_4^2 / n_4) - (T)^2 / N$$

Cuadrado de las medias dentro de grupos

$$CM_{\text{dentro}} = SC_{\text{dentro}} / (N - K)$$

Cuadrado de la media entre grupos

$$CM_{\text{entre}} = SC_{\text{entre}} / (K - 1)$$

Relacion de variancia

$$RV = CM_{\text{entre}} / CM_{\text{dentro}}$$

Valor critico de F

Se obtuvo de la tabla G(73) , determinando alfa y los grados de libertad siendo $F = 4.98$.

9.1.5 Decisión estadística

Para llegar a la decisión estadística fue necesario comparar la RV con el valor crítico de F; si el valor de RV era mayor que el valor crítico de F, la hipótesis nula se rechazaba, por lo tanto se indica que las fluctuaciones en el comportamiento del parámetro analizado presentan variaciones debidas al dosis de aspartame.

9.1.6 Prueba de DVS de Tukey

Se utilizó para probar la hipótesis nula respecto a la igualdad de todos los posibles pares de medias del tratamiento. El nivel de significación alfa es la probabilidad de que una o más hipótesis nulas sean falsas. Con este análisis se determinó la variación que presentaban entre si el par de lotes comparados (lote 1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 y 3-4)

La diferencia verdaderamente significativa se obtuvo:

$$DVS = q_{\alpha, K, N-K} * \sqrt{(CM_{dentro} / n_i)}$$

Donde n_i es el valor de muestras más pequeño entre las 2 poblaciones o lotes comparados. El valor de q es el mismo para todos los parámetros en nuestra investigación, teniendo $q = 3.79$, obtenido de la tabla H (73).

9.1.6.1 Diferencia entre medias

Se preparo una tabla con todas las posibles diferencias entre las medias. Los resultados de estas diferencias se expresan en valor absoluto.

Tabla 12 Diferencias entre medias por lotes.

	μ_1	μ_2	μ_3	μ_4
μ_1		$\mu_1 - \mu_2$	$\mu_1 - \mu_3$	$\mu_1 - \mu_4$
μ_2			$\mu_2 - \mu_3$	$\mu_2 - \mu_4$
μ_3				$\mu_3 - \mu_4$
μ_4				

9.1.7 Decisión Estadística Para Cada Prueba

Se probó cada hipótesis nula comparando las interpolaciones de la tabla anterior con el valor DVS para esa misma hipótesis, rechazando H_0 si el valor de la diferencia entre medias es mayor que el valor correspondiente de DVS, y aceptándolo si el valor es menor que DVS.

Tabla 13 Decisión estadística para la prueba de Tukey

HIPOTESIS	DVS	DECISIÓN ESTADÍSTICA
Ho : $\mu_1 = \mu_2$	$q_{\alpha, K, N-K} * \sqrt{(CM_{dentro} / n_i)}$	Rechazar o no rechazar Ho
Ho : $\mu_1 = \mu_3$	$q_{\alpha, K, N-K} * \sqrt{(CM_{dentro} / n_i)}$	Rechazar o no rechazar Ho
Ho : $\mu_1 = \mu_4$	$q_{\alpha, K, N-K} * \sqrt{(CM_{dentro} / n_i)}$	Rechazar o no rechazar Ho
Ho : $\mu_2 = \mu_3$	$q_{\alpha, K, N-K} * \sqrt{(CM_{dentro} / n_i)}$	Rechazar o no rechazar Ho
Ho : $\mu_2 = \mu_4$	$q_{\alpha, K, N-K} * \sqrt{(CM_{dentro} / n_i)}$	Rechazar o no rechazar Ho
Ho : $\mu_3 = \mu_4$	$q_{\alpha, K, N-K} * \sqrt{(CM_{dentro} / n_i)}$	Rechazar o no rechazar Ho

Si una hipótesis es aceptada, se determina que los dos lotes comparados no presentan variación dentro de un valor de significancia de 0.005, esto quiere decir que ambos lotes tienen tendencias similares dentro de los días de valoración.

Por el contrario si una hipótesis es rechazada, indica que los dos lotes comparados presentan variaciones mayores al valor de significancia 0.005, por lo que sugiere que dicha variación es debida a la administración en diferentes dosis de aspartame.

10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Tabla 14 Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para los resultados de glucosa

	Control	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Promedio	527.916667	546.5	523.75	572.928571
S	197.434205	132.619612	144.186196	184.371475
Suma	6335	7651	6285	8021

Suma de valores total = 28292

Sctotal = 1638282.11

Scdentro = 69604813.2

Scentre = 67966531.1

Cmdentro = 1450100.27

Cmentre = 1332677.08

RV = 0.91902409

F = 4.98

DECISIÓN ESTADÍSTICA: $0.91902409 < 4.98$ entonces H_0 No se rechaza

Diferencia entre medias (Prueba de Tukey)

		X1	X2	X3	X4
X1	527.916667		18.5833	4.166667	45.011904
X2	546.5			22.75	26.428571
X3	523.75				49.178571
X4	572.928571				

Hipótesis	DVS	Diferencia	Decisión estadística
Ho: m1=m2	1317.490838	18.5833<1317.491	No se rechaza Ho
Ho: m1=m3	1317.490838	4.166<1317.491	No se rechaza Ho
Ho: m1=m4	1317.490838	45.011<1317.491	No se rechaza Ho
Ho: m2=m3	1317.490838	22.75<1317.491	No se rechaza Ho
Ho: m2=m4	1219.759499	26.428<1219.7595	No se rechaza Ho
Ho: m3=m4	1317.490838	49.178<1317.491	No se rechaza Ho

Tabla 15 Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para los resultados de Proteínas Totales (g/dl)

	Control	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Promedio	1.64333333	1.168	0.82636364	1.60785714
s	2.26038747	1.007742881	0.95767711	1.61752032
Suma	19.72	17.52	9.09	22.51

Suma de valores total = 68.84
 Sctotal = 119.045631
 Scdentro = 316.373416
 Scentre = 197.327786
 Cmdentro = 6.591112842
 Cmentre = 3.869172267
 RV = 0.587028679
 F = 4.98

DECISIÓN ESTADÍSTICA: $0.587028679 < 4.98$ entonces H_0 No se rechaza

Diferencia entre medias (Prueba de Tukey)

		X1	X2	X3	X4
X1	1.64333333		0.4753333	0.8169697	0.0354761
X2	1.168			0.34163636	0.43985714
X3	0.82636364				0.7814935
X4	1.60785714				

Hipótesis	DVS	Diferencia	Decisión estadística
Ho: $m_1 = m_2$	2.808846	$0.475333 < 2.808846$	No Se rechaza H_0
Ho: $m_1 = m_3$	2.808846	$0.816969 < 2.808846$	No Se rechaza H_0
Ho: $m_1 = m_4$	2.808846	$0.035476 < 2.808846$	No Se rechaza H_0
Ho: $m_2 = m_3$	2.808846	$0.3416363 < 2.808846$	No Se rechaza H_0
Ho: $m_2 = m_4$	2.600486	$0.4398571 < 2.600486$	No Se rechaza H_0
Ho: $m_3 = m_4$	2.808846	$0.781493 < 2.808846$	No Se rechaza H_0

Tabla 16 Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para los resultados de Bilirrubinas (mg/dl)

	Control	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Promedio	0.54458333	0.85192308	0.42333333	0.95607143
s	0.36787756	0.28382461	0.38829074	0.46626247
Suma	6.535	11.075	5.08	13.385

Suma de valores total = 36.075

Sctotal = 9.36371765

Scdentro = 88.4157225

Scentre = 79.0520048

Cmdentro = 1.88118558

Cmentre = 1.55003931

RV = 0.82396937

F = 4.98

DECISIÓN ESTADÍSTICA: $0.82396937 < 4.98$ entonces H_0 No se rechaza

Diferencia entre medias (Prueba de Tukey)

		X1	X2	X3	X4
X1	0.544583		0.30734	0.12125	0.41149
X2	0.851923			0.42859	0.10415
X3	0.423333				0.53274
X4	0.956071				

Hipótesis	DVS	Diferencia	Decisión estadística
Ho: $m_1=m_2$	0.4205	$0.30734 < 0.4205$	No se rechaza Ho
Ho: $m_1=m_3$	0.4205	$0.12125 < 0.4205$	No se rechaza Ho
Ho: $m_1=m_4$	0.4205	$0.41149 < 0.4205$	No se rechaza Ho
Ho: $m_2=m_3$	0.4205	$0.42859 > 0.4205$	Se rechaza Ho
Ho: $m_2=m_4$	0.4040	$0.10415 < 0.4040$	No se rechaza Ho
Ho: $m_3=m_4$	0.4205	$0.53274 > 0.4205$	Se rechaza Ho

Tabla 17 Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para los resultados de Albúmina

	Control	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Promedio	2.1195	1.99357143	1.73923077	1.85384615
s	2.23367466	1.47710271	0.8621375	1.60198855
Suma	21.195	27.91	20.15	24.1

Suma de valores total = 93.355

Sctotal = 123.064805

Scdentro = 909.711373

Scentre = 786.646569

Cmdentro = 19.3555611

Cmentre = 15.4244425

RV = 0.79689979

F = 4.98

DECISIÓN ESTADÍSTICA: $0.79689979 < 4.98$ entonces H_0 No se rechaza

Diferencia entre medias (Prueba de Tukey)

		X1	X2	X3	X4
X1	2.1195		0.125928	0.38027	0.260653
X2	1.99357143			0.254341	0.134725
X3	1.73923077				0.119616
X4	1.85384615				

Hipótesis	DVS	Diferencia	Decisión estadística
$H_0: X1=X2$	5.27281	$0.125928 < 5.27281$	NO SE RECHAZA H_0
$H_0: X1=X3$	5.27281	$0.38027 < 5.27281$	NO SE RECHAZA H_0
$H_0: X1=X4$	5.27281	$0.260653 < 5.27281$	NO SE RECHAZA H_0
$H_0: X2=X3$	4.62456	$0.254341 < 4.62456$	NO SE RECHAZA H_0
$H_0: X2=X4$	4.62456	$0.134725 < 4.62456$	NO SE RECHAZA H_0
$H_0: X3=X4$	4.62456	$0.119616 < 4.62456$	NO SE RECHAZA H_0

Tabla 18 Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para los resultados de TGP (U/I)

	Control	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Promedio	26.33333	25.75	34.45455	24.92857
s	24.15624	16.03476	23.50899	17.0946
Suma	395	309	379	349

Suma de valores total =1432

Sctotal = 21004.92

Scdentro = 171399.9

Scentre = 150394.9

Cmdentro = 3570.83

Cmentre = 2948.92

RV = 0.825836

F = 4.98

DECISIÓN ESTADÍSTICA: $0.825836 < 4.98$ entonces H_0 No se rechaza

Diferencia entre medias (Prueba de Tukey)

		X1	X2	X3	X4
X1	26.33333		0.58333	8.121212	1.40476
X2	25.75			8.704545	0.82143
X3	34.45455				9.52597
X4	24.92857				

Hipótesis	DVS	Diferencia	Decisión estadística
Ho: X1=X2	65.37823	0.58333<65.37823	No Se rechaza Ho
Ho: X1=X3	68.28534	8.121212<68.28534	No Se rechaza Ho
Ho: X1=X4	60.52848	1.40476<60.52848	No Se rechaza Ho
Ho: X2=X3	68.28534	8.704545<68.28534	No Se rechaza Ho
Ho: X2=X4	65.37823	0.82143<65.37823	No Se rechaza Ho
Ho: X3=X4	68.28534	9.52597<68.28534	No Se rechaza Ho

Tabla 19 Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para los resultados de TGO (U/I)

	Control	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Promedio	30.42857	19.41667	24.36364	21.07143
s	19.6653	18.3623	21.7682	18.50765
Suma	4.26	233	268	295

Suma de valores total = 1412

Sctotal = 45918.77

Scdentro = 177214.3

Scentre = 131295.5

Cmdentro = 3691.964

Cmentre = 2574.422

RV = 0.697304

F = 4.98

DECISIÓN ESTADÍSTICA: 0.697304<4.98 entonces Ho No se rechaza

Diferencia entre medias (Prueba de Tukey)

		X1	X2	X3	X4
X1	30.42857		11.011903	6.064934	9.35714
X2	19.41667			4.94697	1.65476
X3	24.36364				3.29221
X4	21.07143				

Hipótesis	DVS	Diferencia	Decisión estadística
Ho: X1=X2	66.4779	11.0119<66.4779	No Se rechaza Ho
Ho: X1=X3	69.4339	6.06493<69.4339	No Se rechaza Ho
Ho: X1=X4	61.5466	9.35714<61.5466	No Se rechaza Ho
Ho: X2=X3	69.4339	4.94697<69.4339	No Se rechaza Ho
Ho: X2=X4	66.4779	1.65476<66.4779	No Se rechaza Ho
Ho: X3=X4	69.4339	3.29221<69.4339	No Se rechaza Ho

11 DISCUSIÓN

En la actualidad aun existe la controversia con respecto a la toxicidad y efectos adversos ocasionados por el aspartame, controversia que se va disipando poco a poco debido a los numerosos estudios que aun se realizan para asegurar que el consumo de los productos que contienen este edulcorante no producirán daño alguno al organismo.

El hígado es el órgano bioquímico central del organismo, presta diversos servicios por absorción, conversión, almacenamiento, reacondicionamiento, transporte, síntesis, detoxificación y secreción de una amplia gama de materiales, y el hecho de que el hígado tenga una circulación doble (por la arteria hepática y la vena porta) que lo constituye como un filtro de la mayor parte del drenaje venoso de los órganos abdominales, esto lo lleva comprometerse de forma secundaria con muchas afecciones que originalmente no le son propias.

Para evaluar la salud general y la salud del hígado fueron empleados los análisis bioquímicos del hígado, a partir de estas pruebas se determinaron las concentraciones de ciertas enzimas liberadas por el hígado en la sangre, además de evaluar otras funciones hepáticas.

Al administrar el aspartame diariamente a los animales de experimentación en dosis de 300 mg/kg, 600 mg/kg y 1200 mg/kg de peso para comprobar si este es tóxico o no, hemos podido demostrar que el aspartame podría ser inocuo para las personas (a excepción de aquellas personas con el síndrome de fenilcetonuria), ya que no se presentaron cambios significativos en las pruebas estadísticas entre el lote control y los lotes con tratamiento en ninguno de los parámetros bioquímicos aquí estudiados.

La prueba de glucosa, en la que es determinada la concentración de azúcar en la sangre, un posible problema provocado por el consumo de aspartame en las ratas no presentó variaciones como puede observarse en la gráfica 1 y en la tabla 14, donde puede observarse que en la comparación de las medias por lote no se observaron cambios estadísticamente significativos mientras que en la prueba estadística de Tukey donde se realizó una comparación de los resultados obtenidos en cada lote administrado con aspartame contra el lote control tampoco se encontró diferencia significativa en los análisis estadísticos. Por los resultados obtenidos podemos decir que el aspartame no provocó ningún efecto que pudiera inducir la elevación de la concentración de glucosa en la sangre de los animales de experimentación a las concentraciones estudiadas.

En la determinación de la concentración de proteínas totales los resultados son presentados en la gráfica 2 de forma puntual para poder observar la distribución de todos los datos y de las medias de cada lote y donde se puede hacer una comparación de los resultados de las ratas en estudio contra las ratas no tratadas o lote control. De esta gráfica podemos decir que existe variabilidad entre los resultados obtenidos en la prueba pero no podemos asegurar si los cambios observados son significativos por lo que tendremos que apoyarnos en los análisis estadísticos obtenidos en la tabla 15 donde están representados los estudios de análisis de varianza y la prueba de Tukey para cada lote. El cambio que podíamos haber esperado en caso de daño hepático por causa del aspartame, era el de la disminución de la concentración de proteínas totales (este dato está relacionado con el de albúmina), pero dado que la decisión estadística para las dos pruebas no rechazan la hipótesis nula podemos asegurar que el aspartame administrado a 300 mg/kg, 600 mg/kg y 1200 mg/kg de peso no provocaron cambios en las concentraciones de proteínas totales en la sangre de los

animales de experimentación en comparación con el lote que fue utilizado como control ya que las medias de los lotes no cambiaron significativamente.

Los resultados obtenidos en la prueba de bilirrubina directa son presentados en la gráfica 3 y los análisis estadísticos en la tabla 16. En la gráfica podemos observar una gran variabilidad de los resultados en las pruebas y se observa que las medias obtenidas en las concentraciones de 600 mg/kg y 1200 mg/kg de peso son altas en comparación con la media obtenida en el lote control. Al observar la decisión estadística obtenida en la prueba de análisis de varianza de la tabla 16 nos indica que al ser rechazada la hipótesis nula las medias no sufrieron cambios significativos entre sí, y al querer reafirmar este análisis realizando la prueba de Tukey que es donde podemos hacer una comparación del lote control contra cada uno de los lotes que fueron tratados con aspartame también observamos que no hay cambios estadísticamente significativos que nos demuestren que haya una variación de la concentración de bilirrubina directa debido al efecto del aspartame. Y aunque estadísticamente se encontró una diferencia significativa entre las concentraciones de el lote que fue tratado con dosis de 600 mg/kg con respecto a los lotes tratados con 300 mg/kg y 1200 mg/kg de peso debido a que las concentraciones obtenidas fueron más bajas con respecto a estas dos últimas dosis esta variación no es de gran relevancia dado que la comparación principal y de importancia es la de el lote control (que no fue tratado de ninguna manera con el aspartame), con lotes que si fueron tratados y estudiados con las dosis de aspartame. Aun así no es completamente seguro afirmar que no existe un daño en la función hepática que haya provocado el aumento o el descenso en la concentración de bilirrubina en la sangre.

Cuando se presenta una enfermedad o daño en el hígado este puede verse reflejado en una disminución de la concentración en sangre de albúmina ya que esta proteína es sintetizada por el hígado. Pero los resultados obtenidos en el estudio de la concentración de esta proteína en la sangre de los animales de experimentación que son presentados en la gráfica 4 y el análisis estadístico en la tabla 17 nos indican que no hay gran variabilidad entre la comparación de los resultados obtenidos del lote control y los lotes en estudio de aspartame. Ya que como se puede observar en el análisis de varianza la hipótesis nula no se rechaza lo que quiere decir que el aspartame no provoca ninguna variación o fluctuaciones entre los resultados y al corroborar esto en la prueba de Tukey donde se hace la comparación de los resultados del lote control contra los resultados de cada dosis estudiada (donde fue rechazada también la posibilidad de que hubiese variaciones en los resultados provocados por las dosis de aspartame) nos es posible asegurar que el aspartame a las dosis administradas no provoco una función hepática deficiente en la síntesis de albúmina.

En las gráficas 5 y 6 podemos observar los resultados de la actividad de las enzimas TGP y TGO respectivamente obtenidos de los estudios de sangre en los animales de experimentación. A primera vista los datos se pueden observar con variabilidad entre los resultados, aunque las medias de cada lote no parecen encontrarse tan lejanas unas de otras, así que para asegurarnos si existen diferencias significativas entre los datos es mejor observar los resultados en las tablas 18 y 19 correspondientes a los análisis estadísticos obtenidos para los resultados de TGP y TGO respectivamente. Los resultados esperados para esta prueba es la de la elevación de la actividad de estas dos enzimas debido al posible daño hepático producido por el aspartame en comparación con el lote control, ya que estas son enzimas producidas en el interior de las células hepáticas o hepatocitos y

los niveles de estas enzimas aumentan en la sangre cuando los hepatocitos están dañados o existe inflamación del hígado (aunque también puede aumentar el nivel de estas enzimas por necrosis de células del miocardio, eritrocitos o células del músculo esquelético). De acuerdo al análisis de varianza y a la prueba de Tukey presentados en las tablas 18 y 19 donde no se rechaza ninguna de las hipótesis y esto nos indica por tanto que entre los datos (comparación del lote control con los lotes tratados con aspartame) no existe estadísticamente ninguna diferencia significativa y así podemos afirmar que el aspartame a las concentraciones administradas no tuvo ningún efecto tóxico en el hígado y en general en la salud de los animales de experimentación.

12 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos afirmar que no hay evidencia estadística que nos indique que el aspartame pueda producir efectos hepatotóxicos en las ratas.

Las dosis que fueron utilizadas en el presente trabajo (300 mg/kg, 600 mg/kg y 1200 mg/kg) son seguras para su consumo.

Es posible extrapolar los resultados encontrados en este trabajo al ser humano, aunque no debemos olvidar las diferencias fisiológicas, dietéticas y de hábitos que existen entre ambas especies y por ello podrían observarse cambios o diferencias en los resultados.

13 ANEXO

Fundamentos y técnicas de las pruebas bioquímicas.

Glucosa.

La glucosa (a y b D-glucopiranososa) es un sustrato hidrosoluble que constituye el principal alimento energético de las células. Es absorbida, casi siempre, bajo la forma de polisacáridos (almidón, glucógeno), o de disacáridos (sacarosa, lactosa maltosa). Estas sustancias son degradadas parcialmente por la acción de la amilasa salivar y posteriormente por una hidrólisis ácida en el estómago. Los oligosacaridos liberados por las amilasas pancreáticas y los disacaridos intestinales en monosacáridos, de los cuales el principal es la glucosa. La absorción de la glucosa a nivel de tubo digestivo es un mecanismo de transporte activo que, una vez entrado en circulación, se reparte entre los diferentes compartimentos: circulatorio (sanguíneo y linfático), intestinal y tisular.

A nivel de hígado y de los músculos, la forma primaria de almacenamiento de la glucosa es el glucógeno (polímero de almacenaje). La glucosa circulante es captada por las células de diferentes órganos y les sirve de sustrato energético principal (glucólisis). En caso de necesidad energética anormal, hay una movilización de glucógeno (glucogenólisis) y/o una biosíntesis de glucosa (noeuglucogenólisis).

Fundamento De La Técnica:



Proteínas totales

El principio de la reacción de biuret, es la siguiente: las proteínas séricas reaccionan con sulfato de cobre en hidróxido de sodio formando un complejo violeta de "biuret". La intensidad del color violeta es proporcional a la concentración de proteína.

Bilirrubinas

La Bilirrubina en solución neutra forma con el ácido sulfanílico diazotado un compuesto de color rojo, y en solución alcalina de color azul.

El glucurónido de bilirrubina hidrosoluble reacciona directamente.

Transaminasa Glutámico Pirúvica y Transaminasa Glutámico Oxalacético.

TGP, es una enzima del hígado, siendo este el centro de biotransformaciones de medicamentos y otras sustancias que ingerimos, los hepatocitos, cuando sufren de un efecto hepatotóxico se rompen liberando las enzimas presentes en el hígado (TGO y TGP) al torrente sanguíneo. En este caso no parece haber hepatotoxicidad ya que no hay cambios significativos entre los resultados del lote control con los lotes tratados.

Las transaminasas TGO y TGP son enzimas ampliamente difundidas en el organismo con elevada concentración en corazón, hígado, músculo esquelético, riñón y eritrocitos. La actividad sérica en condiciones normales es baja y nula.

Un daño o enfermedad en cualquiera de estos tejidos conduce a un aumento en los niveles séricos.

En hepatitis virales y otras formas de enfermedad hepática que involucren necrosis tisular, predominará la actividad sérica.

Fundamento de la técnica

La GOT cataliza la siguiente reacción:

l-aspartato + alfa-cetoglutarato GOT glutamato + oxalacetato

La GPT cataliza la siguiente reacción:

l-alanina + alfa-cetoglutarato GTP glutamato + piruvato

14 BIBLIOGRAFIA

1. Aumenta el consumo de edulcorantes artificiales en E.U. (1990), *Geplacea* VII(4), 2.
2. Edulcorantes sustitutivos del azúcar; edulcorantes no calóricos. (1990), *Geplacea*. VII(1), 1-8.
3. En E.U. la FDA podría autorizar el consumo de los climatos. (1990), *Geplacea*. VII(6), 2.
4. Getting a product to market without approval. (1990), *Food Engineering International*. 15(5), 19-20.
5. [http://www.aspartame\(NutraSweet\)toxicityinformationcentermainpage.html](http://www.aspartame(NutraSweet)toxicityinformationcentermainpage.html)
6. Badui, D. Química de los alimentos. 3ed., Addison-Wesley longman, México (1993),484-485.
7. Becerro, B. Edulcorante artificial: aspartame. *Alimentaria*, (1990), 23-24.
8. Belitz, H.D. y Grosch, W. *Food Chemistry*. 2ed., Springer, Alemania (1999), 36,37,414,415.
9. Birch, G. y Lindley, G. *Low-calorie products*. Elsevier Applied Sciences, Inglaterra (1988), 113-125, 151-163, 276-279.
10. Black, R.M. Sofá drinks with aspartame: effect on subjective hunger, food selection, and food intake of young adult males. (1991), *Physiology and Behavior*, (49), 803-810.
11. Bohinski, R. *Bioquímica*. 5ed. Addison-Wesley Iberoamericana, E.U.A. (1991), 520-527.

12. Brastock K, Serdula M.K, Marks I.S. Evaluation of reactions to food additives; the aspartame experience. (1986), *The American Journal of Clinical Nutrition* (43), 464-469.
13. Branen L., Davidson P. M., Salminen S. Food additives. Marcel Dekker, New York (1990), 305-309.
14. Butchko, H. Seguridad del consumo de aspartame. The Nutrasweet company, investigación clínica y preclínica, (1990), 1-3, 5-6.
15. Calderon, M. C. Identificación de oportunidades para la producción de aditivos de bajo contenido calórico en México, Universidad Iberoamericana, Tesina de licenciatura, México (1994), 55-59, 86.
16. <http://www.caloriecontrol.org/aspartame.html>
17. Coenders, A. Química culinaria: estudio de lo que loes sucede a los alimentos antes, durante y después de cocinados. Acribia, S. A., España (1996), 45-48.
18. Concon, J. Food toxicology; Part B: Contaminants an Additives. Marcel Dekker, E.U.A. (1998), 1249-1251, 1292, 1293.
19. Coultate, T. P. Manual de química y bioquímica de los alimentos. 2ed. Acribia, España (1998), 188, 189.
20. Derache, R. Toxicología y Seguridad de los Alimentos. Ediciones Omega, España (1990), 379.
21. Diario Oficial. Aditivos para los alimentos, titulo noveno, capitulo único (1988), 71, 72, 74, 77, 78, 91.
22. Drummond, E. Nutrition for the food service professional. E.U.A. (1989), 27-29.
23. European Commission. Opinión of the Scientific Committe on Food: Update on the Safety of Aspartame. 10 December 2002, Health and Consumer Protection Directorate-General, 34.

24. <http://www.fda.gov>
25. Fennema, O. Química de los alimentos. Acribia, España (1993), 738-740.
26. Fernstrom, M. Effects of aspartame ingestion on the carbohydrate-induced rise in tryptophan hydroxylation rate in rat brain. (1986), The American Journal of Clinical Nutrition (44), 195-205.
27. Fregene, J. A. La Ciencia de los Alimentos de la A a la Z. Acribia, España (1990), 34.
28. Gaman, P. y Sherrington, K. The science of food; An introduction to food science, nutrition and microbiology. 3ed. Pergamon Press, Inglaterra (1990), 248,249.
29. Garard, I. Introductory Food Chemistry. The Avi Publishing Company Inc., E.U.A. (1976), 134, 135, 285-287.
30. García, M., Ramírez, Q. R. y Munguía, L. A. Biotecnología alimentaria. Limusa, México (1993), 521-523, 542-546.
31. Goerss, L., Wagner, C. y Hill, L. Acute effects of aspartame on aggression and neurochemistry of rats. (2000), Life Sciences, (67), 1325-1329.
32. Gurney, J. G., Pagoda, J. M., Holly, E. A., Hecht, S. S., Martin, S. P. El Consumo del Aspartame en relación con el riesgo de tumor cerebral en la niñez. (1997), Journal of the National Cancer Institute, (89), No. 14.
33. Guzman, C. Edulcorantes artificiales, consideraciones sobre su inocuidad. (1984), Alimentaria, (21), 25-27.
34. Helferich, W. Food toxicology. Editorial CRC Press, Washington (2001), 193-197.
35. Homler, B. Properties and stability of aspartame. Food Technology, (1984), 50-55.
36. Hughes, C. C. Guía de aditivos. Acribia, España (1994), 43.

37. Jeffrey, F. Aspartame consumption in rats selectively bred for high versus low saccharin intake. (1998), *Physiology and behavior* (65), No. 2, 393-396.
38. Kamrin, M. *Toxicology*. Lewis Publisher, Michigan (1990), 75-78.
39. Kullesa, J. Aspartame use by persons with diabetes. (1985), *Diabetes care* (8), 415-417.
40. <http://www.lahepatitis.org/transaminasas>
41. Lewis, D. S., Filer, L. J., Bell, E. F., Ziegler, E. E., Tephly, T. R. El efecto de la ingestión repetida de bebidas endulzadas con aspartame sobre el amino en el plasma, el metanol y la cantidad de formiato en la sangre en adultos normales. (1989), *Metabolism*, (38), No. 4, 357-363.
42. Lindner, E. *Toxicología de los alimentos*. 2ed. Aurubia, S.A., España (1990), 192.
43. Mason, P. *Asesoramiento Nutricional y Dietético en la Oficina de Farmacia*. Acribia, España (1995), 208.
44. Mc Laren, D. *La nutrición y sus trastornos. El manual moderno*, S.A. de C.V., México (1983), 218.
45. <http://www.misfocus.org/aspart.htm1>
46. Moler, B. Properties and stability of aspartame. *Food Technology*, (1984), 50-55.
47. Montgomery. *Diseño y análisis de experimentos*. Iberoamericana, México (1991), 45-72, 650, 652.
48. Morgan, L. S. y Weinsier, R. R. *Nutrición Clínica*. 2ed. Ediciones Harcourt, España (2000), 30.
49. Nelson, J.K., Moxness K.E., Jensen M., Gastineau C.F. *Dietética y Nutrición: Manual de la Clínica Mayo*. 7ed. Mosby/Domay Libros, España (1996), 109, 110, 159, 160, 522-525.

50. <http://www.nerusmagazine.com/aspartame.html>
51. Niesink, Introduction to havioral toxicology, food and enviroment. CRCpress, E.U.A. (1999), 299, 300.
52. <http://www.nutrasweet.com>
53. Pecina, H. J. Nutrición y dieta de Cooper. 17ed. Interamericana, México (1985), 200.
54. <http://www.presidiotex.com/asparspam/FDA/fda.html>
55. Rebollar, C. M. Aditivos alimentarios: Propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud. Editores Mira, España (1991), 123, 124.
56. Rodríguez. Enfermedades y otros riesgos asociados con el consumo de alimentos. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarias de Ourense, Editorial Celarayn, España (1998), 269, 270.
57. Ronsivalli, L. y Vieira, E. Elementary Food Science. 3ed. An Avi Book, E.U.A. (1992), 65-68.
58. Rowan, J., Shaywitz, B. A., Tuchman, L., French, J. A., Luciano, D. Sullivan, C. M. El aspartame y la susceptibilidad a los ataques epilépticos u otros resultados de un estudio clínico en individuos reportados como sensibles. (1995), Epilepsia, (36), No. 3, 270-275.
59. Ryan-Harshman. Phenylalanine and aspartame fail to alter feeding behavior, mood and arousal in men. (1987), Physiology and behavior, (39), 247-253.
60. Schiffman, S., Buckley III, C. E., Sampson, H. A. Massey, E. W., Baraniuk, J. N., Follett, J. V., Warwick, Z. S. El aspartame y la susceptibilidad al dolor de cabeza. (1987), Journal of Medicina, (317), 1181-1185.
61. Searle de México. Cronología del aspartame. Searle and Co. Box 1045, skokie Illinois 60076. 3,7.

62. Shaywitz A, Anderson GM, Novotny EJ, Ebersole JS, Sullivan CM, y Gillespie SM. El aspartame no tiene ningún efecto sobre los ataques epilépticos en niños epilépticos. (1994), *Ann. Neurol*, (35): 98-103.
63. Sheule B. *Introductory Foods*. Editorial Prentice Hall , Columbus Ohio (1995), 211,212.
64. Silvestre A. *Toxicología de los alimentos*. Editorial Hemisferio Sur, Argentina (1995), 240-242.
65. Spiers A.P., Sabounjian A.L., Reiner A., Myers K.D., Wurtman J., y Schomer L.D. El aspartame: neuropsicología y neurofisiología de efectos agudos y crónicos. (1998), *American Journal of Clinical Nutrition*, (68): 204-215.
66. Stegink L. The aspartame store: a model for clinical testing of a food additive. (1987), *American Journal of Clinical Nutrition*, (46): 204-215.
67. <http://www.sweeteners.org>
68. Taylor S. *Food toxicology*. Editorial Marcel Dekker, Chicago, Institute of food technologists (1989), 231-273.
69. Vega y León S. Aditivos alimentarios y salud. Cuadernos CBS No. 20, México, UAM Xochimilco, Unidad de Ciencias Biológicas y de la Salud (1989), 17.
70. Vidaud C. Acción, uso, análisis y toxicidad de los edulcorantes sintéticos de empleo actual y potencial en Cuba. (1989), *Alimentaria*, (26): 47, 48, 51,52.
71. Vollmer G. *Elementos de bromatología descriptiva*. Editorial Acribia, España (1990), 70, 71, 250.
72. Vries J. *Food safety and toxicity*. Editorial CRCpress, New York (1997), 67, 68, 129-131.

73. Wayne W.D. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa, México (2001), 345-347.
74. White A., Handler P., Smit E. Principios de bioquímica. Mc Graw-Hill, México (1997), 89, 216, 248, 540, 573, 574, 606, 607, 700, 953, 954.
75. William H. y Carl K.W. Food toxicology, CRCpress, New York (2001), 193-199.
76. Wong D. Química de los alimentos: mecanismos y teoría. Acribia, España (1989), 295-302.
77. Yufera E. Química de los alimentos. Editorial Síntesis, España (1998), 412, 413.