

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA DOSE PROGRESSIVA DE SACARINA, ASSOCIADO À GLICOSE, NO
GANHO DE PESO, NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E NA SENSIBILIDADE
À INSULINA DE RATOS WISTAR**

KELLY CARRARO FOLETTTO

Porto Alegre
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA DOSE PROGRESSIVA DE SACARINA, ASSOCIADO À GLICOSE, NO
GANHO DE PESO, NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E NA SENSIBILIDADE
À INSULINA DE RATOS WISTAR**

KELLY CARRARO FOLETTTO

Orientador: Prof. Marcello Casaccia Bertoluci

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2022

Este estudo recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho a minha família.

Especialmente aos meus pais, Geraldo e Sônia pelo apoio e incentivo nas minhas escolhas.

Ao meu filho, Otto, por seu amor incondicional e pelas horas tomadas do mútuo convívio.

Ao meu marido Igor pela confiança, pelo exemplo de dedicação, persistência e perseverança.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pela oportunidade e pelo qualificado ensino e incentivo à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA por viabilizar este trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci, pela parceria na pesquisa há mais de uma década, pela confiança, constante incentivo e compromisso com o rigor científico.

À Prof^a Daisy Crispim Moreira, pela sua contribuição técnica e científica na coleta de material biológico.

À Vânia Naomi Hirakata e à Aline Mancuso pelo qualificado suporte nas análises estatísticas.

Aos colaboradores da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) e da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA pelo agradável convívio e receptividade em seus laboratórios.

Em especial, às veterinárias da UEA, Daniela Campagnol e Tuane Nerissa Alves Garcez, e à Marta Giotti Cioato, pela amizade e apoio técnico ao longo desses meses de pesquisa.

Aos colegas e professores do PPGCM pelo companheirismo, pela discussão de ideias e sugestões.

À minha família, meus pais, Sônia e Geraldo pelo exemplo de vida, carinho, pelos incentivos constantes e por compartilharem dessa minha trajetória acadêmica.

Ao meu bem mais valioso, meu filho Otto, que apesar de sua pouca idade, foi paciente e compreensivo com a ausência da mamãe.

Por fim, ao meu marido Igor Gorski Benedetto, pelo incentivo e apoio incondicional. Obrigada pelo amor, confiança, carinho e compreensão.

RESUMO

Introdução: Estudos sugerem que adoçantes de alta intensidade (AAIs) podem promover ganho de peso, induzir resistência à insulina e intolerância à glicose. Os mecanismos potenciais podem estar relacionados ao comportamento alimentar, diminuição do gasto energético, alterações na microbiota intestinal ou aumento da absorção intestinal de glicose no período pós-absortivo.

Objetivo: Neste experimento, avaliamos o efeito de doses progressivas de sacarina, no ganho de peso, na ingestão calórica, na dinâmica do comportamento alimentar e seus padrões microestruturais. Também investigamos se a exposição à sacarina pode induzir resistência à insulina e intolerância à glicose.

Métodos: Em um experimento de 13 semanas, 42 ratos machos Wistar receberam 0,5 mg/g de glicose (CONT) ou 0,5 mg/g de glicose + 0,5 mg/g de sacarina (SAC+) ou 0,5 mg/g de glicose + 1,5 mg/g de sacarina (SAC+++). A ração padrão e a água com glicose a 5% para hidratação permaneceram *ad libitum*. A ingestão calórica e a microestrutura do comportamento alimentar foram avaliadas continuamente por meio do sistema BioDAQ®. O ganho de peso foi aferido semanalmente, o teste oral de tolerância à glicose (OGTT) e teste de tolerância à insulina (ITT) foram realizados no início e no final do período.

Resultados do estudo I: A sacarina associada à glicose promoveu maior ganho de peso na dose submáxima (SAC+: $p = 0,003$) e máxima (SAC+++ : $p = 0,02$), sem aumentar a ingestão calórica, sem causar resistência à insulina ou intolerância à glicose. As análises longitudinais mostraram que as diferenças no ganho de peso começaram a partir da 6^a-7^a semana de intervenção.

Resultados do estudo II: O uso de sacarina na dose máxima (SAC+++) aumentou a duração, o tamanho e tempo gasto em *bouts* (até a 4-7^a semana). Além disso, o tamanho dos *bouts* também foi superior no grupo suplementado com a dose submáxima (SAC+, até a 3^a semana), e SAC+ gastou mais tempo em *bouts* (até a 5^a semana) em relação ao CONT. Ao considerar a dependência dos fatores (tempo*grupo), verificamos que o tamanho dos *bouts* no grupo SAC+++ teve magnitude de efeito crescente, com diferença de 0,3% e 0,4%/semana em relação ao CONT ($p = 0,01$) e SAC ($p = 0,007$), respectivamente. Além disso, uma taxa crescente de *bouts*/refeição, e intervalo entre refeições (IMI), na ordem de 16%/semana ($p <$

0,009) e 3%/semana ($p < 0,01$) em relação ao CONT. SAC+ também demonstrou aumentar o IMI, mas em menor grau (2%/semana, $p = 0,04$). O uso de sacarina não alterou a eficiência alimentar, a taxa de saciedade nem o consumo alimentar.

Conclusão: Esse conjunto de dados sugere que a sacarina associada à glicose, promove ganho de peso de maneira não dose-dependente, o que pode indicar um efeito sinérgico da glicose co-administrada. A sacarina também alterou o IMI e alguns parâmetros relacionados aos *bouts*. Apesar dos efeitos mais pronunciados ocorrerem com a dose máxima, não houve relação dose-dependente. Tais implicações não foram capazes de alterar o consumo calórico, nem os parâmetros relacionados à dinâmica do comportamento alimentar, como a eficiência alimentar ou a taxa de saciedade. Além disso, a hipótese de que a exposição crônica à sacarina promove resistência à insulina e intolerância à glicose não foi sustentada neste modelo experimental. Esses resultados fornecem evidência que apoia a contraindicação do uso de adoçantes como estratégia adjuvante ou isolada no controle do peso corporal.

Palavras-chave: sacarina, ganho de peso, excesso de peso, ingestão energética, ingestão alimentar, comportamento alimentar, relação dose-resposta, metabolismo da glicose, resistência à insulina

ABSTRACT

Background: Studies suggest that non-nutritive sweeteners (NNSs) may promote weight gain, and induce insulin resistance and glucose intolerance. Potential mechanisms may be related to feeding behavior, decreased energy expenditure, changes in the intestinal microbiota, or increased intestinal glucose absorption in the post-absorptive period.

Objective: In this experiment, we evaluated the effect of progressive doses of saccharin, on weight gain, caloric intake, the dynamics of feeding behavior, and its microstructure patterns. We also investigated whether exposure to saccharin can induce insulin resistance and glucose intolerance.

Methods: In a 13-week experiment, 42 male Wistar rats received 0.5 mg/g of glucose (CONT) or 0.5 mg/g of glucose + 0.5 mg/g of saccharin (SAC+) or 0.5 mg/g of glucose + 1.5 mg/g of saccharin (SAC+++). Standard chow and 5% glucose water for hydration remained *ad libitum*. Caloric intake and the microstructure of feeding behavior were continuously evaluated using the BioDAQ™ system. Weight gain was measured weekly, and oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed at the beginning and end of the period.

Study results I: Saccharin associated with glucose promoted greater weight gain at submaximal (SAC+: $p = 0,003$) and maximal (SAC+++ : $p = 0,02$) doses, without increasing caloric intake, without causing insulin resistance or glucose intolerance. Longitudinal analyzes showed that differences in weight gain started from the 6th-7th week of intervention.

Study results II: The use of saccharin at the maximum dose (SAC+++) increased the duration, size, and time spent in bouts (until the 4-7th week). In addition, the bout size was also superior in the group supplemented with the submaximal dose (SAC+, up to 3rd week), and SAC+ spent more time in bouts (up to 5th week) compared to CONT. When considering the dependence of the factors (time*group), we found that the bout size in the SAC+++ group had an increasing effect magnitude, with a difference of 0.3% and 0.4%/week to the CONT ($p = .01$) and SAC ($p = .007$), respectively. Furthermore, an increasing rate of bouts/meal and intermeal interval (IMI), in the order of 16%/week ($p < .009$) and 3%/week ($p < .01$) about CONT. SAC+ has also been

shown to increase IMI, but to a lesser extent (2%/week, $p = .04$). The use of saccharin did not change the eating rate, the satiety ratio, or food consumption.

Conclusion: This dataset suggests that saccharin associated with glucose promotes weight gain in a non-dose-dependent manner, which may indicate a synergistic effect of co-administered glucose. Saccharin also altered the IMI and some parameters related to seizures. Although the most pronounced effects occurred with the maximum dose, there was no dose-dependent relationship. Such implications were not able to change caloric consumption nor parameters related to the dynamics of eating behavior, such as food efficiency or satiety rate. Furthermore, the hypothesis that chronic exposure to saccharin promotes insulin resistance and glucose intolerance was not supported in this experimental model. These results provide evidence that supports the contraindication of the use of sweeteners as an adjuvant or isolated strategy in the control of body weight.

Keywords: saccharin, weight gain, overweight, energy intake, food intake, feeding behavior, dose-response relationship, glucose metabolism, insulin resistance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema comparativo das distintas rotas envolvidas na absorção, digestão, distribuição, metabolismo e excreção dos principais adoçantes de alta intensidade	32
Figura 2 - Adoçantes de alta intensidade e mecanismos envolvidos	50
Figura 3 - Receptores de sabor ativados pelos adoçantes de alta intensidade e respectivos locais de expressão.....	52
Figura 4 - Representação diagramática da estrutura do heterodímero T1R2/T1R3 e múltiplos sítios de ligação para diferentes substâncias doces	53
Figura 5 - Detecção e metabolismo dos adoçantes	55
Figura 6 - Relação entre intensidade sensorial doce e palatabilidade na ingestão alimentar e no comportamento hedônico	57
Figura 7 - Conceitos básicos na regulação comportamento alimentar.....	58
Figura 8 - Cascata de saciedade.....	59
Figura 9 - Desacoplamento entre teor calórico e sabor doce.....	61
Figura 10 - Efeito dos adoçantes de alta intensidade no sistema de recompensa cerebral	64
Figura 11 - Efeitos da sacarina na microbiota intestinal e na tolerância à glicose.....	67
Figura 12 - Mecanismos propostos dos efeitos subjacentes dos adoçantes de alta intensidade no desenvolvimento da síndrome metabólica e da resistência à insulina	69
Figura 13 - Adipogênese induzida por adoçantes artificiais	71
Figura 14 - Marco conceitual esquemático do estudo	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratégias de busca nas bases de dados.....	19
Tabela 2 - Características dos adoçantes de alta intensidade aprovados pela FDA.	22
Tabela 3 - Estudos observacionais de coorte prospectiva que avaliaram associação entre o consumo de AAls e efeitos metabólicos adversos	38
Tabela 4 - Estudos clínicos que avaliaram o consumo de AAls e potenciais efeitos metabólicos adversos.....	41
Tabela 5 - Estudos experimentais que avaliaram o consumo de AAls e potenciais efeitos metabólicos adversos	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAs: adoçantes artificiais

AAI: adoçantes de alta intensidade

Ace-K: acessulfame de potássio

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ACs: adoçantes calóricos

ANCs: adoçantes não-calóricos

ANNs: adoçantes não-nutritivos

BE: balanço energético

CaSR: *calcium-sensing receptor*

CCK: colecistoquinina

COOH: ácido carboxílico

CRD: *cysteine-rich domain*

DCA: doença cardiovascular aterosclerótica

DCC: doença cardíaca coronária

DCV: corporal doenças cardiovasculares

DM2: diabetes mellitus tipo 2

ECR: ensaio clínico randomizado

FAO: *Food and Agriculture Organization*

GABA_B: ácido gama-aminobutírico B

GIP: peptídeo inibidor gástrico

GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon 1

GLUT2: transportador de glicose 2

GPCRs: receptores acoplados à proteína G

GRAS: geralmente reconhecido como seguro

IDA: ingestão diária aceitável

ID: *intracellular domain*

IMC: índice de massa corporal

JECFA: *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*

LHA: área hipotalâmica lateral

LPS: lipopolissacarídeo

LPL: lipoproteína lipase

MANs: moduladores alostéricos negativos
MCH: hormônio concentrador de melanina
mGluR: glutamato metabotrópico
MI: microbiota intestinal
NAc: núcleo accumbens
HCT: hematócrito
NHDC: neoesperidina dihidrocalcona
ARC: núcleo arqueado hipotalâmico
OMS: Organização Mundial de Saúde
PA: pressão arterial
PFC: córtex pré-frontal
PYY: peptídeo YY
ROS: espécies reativas de oxigênio
SGLT1: transportador de glicose sódio-dependente 1
SGS: *siraitia grosvenorii swingle*
SM: síndrome metabólica
SNC: Sistema Nervoso Central
SR: *stevia rebaudiana*
TGI: trato gastrointestinal
TCRs: *taste receptor cells*
TMD7: *heptahelical transmembrane domain*
T1Rs: *taste receptors, type 1*
T2Rs: *taste receptors, type 2*
T1R1: *taste receptor, type 1, member 1*
T1R2: *taste receptor, type 1, member 2*
T1R3: *taste receptor, type 1, member 3*
WHO: *World Health Organization*
VO: via oral
VTA: área tegmental ventral
VTFM: *venus flytrap module*
2,4-DP: ácido 2-(2,4-diclorofenoxi) propiônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .	19
2.2. ADOÇANTES DE ALTA INTENSIDADE: ASPECTOS GERAIS.....	20
2.2.1. <i>Sacarina</i>	22
2.2.2. <i>Aspartame</i>	23
2.2.3. <i>Acessulfame-K</i>	24
2.2.4. <i>Sucralose</i>	25
2.2.5. <i>Neotame</i>	25
2.2.6. <i>Stevia</i>	26
2.2.7. <i>Luo Han Guo</i>	27
2.2.8. <i>Advantame</i>	28
2.2.9. <i>Neoesperidina dihidrocalcona</i>	29
2.3. METABOLISMO DOS ADOÇANTES DE ALTA INTENSIDADE.....	30
2.4. POTENCIAIS EFEITOS METABÓLICOS ADVERSOS:.....	33
2.5. MECANISMOS ASSOCIATIVOS ENVOLVIDOS.....	49
2.5.1. <i>Ativação dos Receptores para o Sabor Doce</i>	50
2.5.2. <i>Percepção do Sensorial e Comportamento Alimentar</i>	56
2.5.3. <i>Desacoplamento Calórico-sensorial</i>	60
2.5.4. <i>Sistema Neuroendócrino</i>	63
2.5.5. <i>Microbiota Intestinal</i>	66
2.5.6. <i>Síndrome Metabólica</i>	68
2.5.7. <i>Adiposidade</i>	69
3. MARCO CONCEITUAL	72
4. JUSTIFICATIVA	73
4.1. HIPÓTESES	734
5. OBJETIVOS	75
5.1. OBJETIVO GERAL.....	75

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
7. ARTIGOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
7.1. ARTIGO I.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
7.2. ARTIGO II.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
8. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	142
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	143
10. ANEXOS.....	144
ANEXO I – Parecer de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa.....	144
ANEXO II – Comprovante de submissão do ARTIGO I.....	145
ANEXO III – ARRIVE <i>guideline</i> , ARTIGO I.....	146
ANEXO IV – ARRIVE <i>guideline</i> , ARTIGO II.....	149

1. INTRODUÇÃO

Mudanças nos padrões alimentares foram fortemente influenciados devido a industrialização, movimentos sociais, culturais e econômicos. Alimentos processados de elevada densidade energética e com alto teor de açúcar têm contribuído significativamente para a alta prevalência de doenças como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV) (1). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência mundial de obesidade triplicou desde 1975 (2). Sobrepeso e obesidade estão associados ao aumento da mortalidade por todas as causas (3).

Dentre as estratégias nutricionais para o manejo do peso corporal e controle glicêmico, destacam-se o déficit calórico e a redução de carboidratos simples, logo, é racional a substituição do açúcar convencional por adoçantes de alta intensidade (AAIs) (4).

Comercializados como adoçantes de uso geral ou disponíveis numa ampla gama de produtos industrializados (versões rotuladas como “*diets*”, “*sugar-free*”, com teor de calorias e de carboidratos reduzidos), há um crescente e considerável consumo destes aditivos, especialmente por indivíduos diabéticos, obesos (5, 6) ou por aqueles que simplesmente objetivam controle/perda de peso (7, 8). Um recente estudo publicado no *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* (9) identificou que as compras domésticas *per capita* de produtos alimentícios contendo adoçantes calóricos (ACs) diminuíram 17% entre 2002 e 2018, mas aumentaram 335% para produtos contendo adoçantes não calóricos (ANCs) nos EUA. Essa diferença foi ainda mais expressiva quando foi avaliado o consumo na forma de bebidas (queda de 63% para ACs e aumento de 431% para ANCs).

Apesar dos AAIs terem sido amplamente utilizados por décadas, ainda há resultados divergentes e inconclusivos sobre seus efeitos metabólicos e impacto balanço energético (BE). Nos últimos anos houve um interesse renovado nesta discussão, principalmente após uma série de estudos de coorte prospectivos em que foi observado que o risco de ganho de peso aumenta de modo responsivo à dose entre os consumidores de bebidas adoçadas artificialmente (10, 11). Outros estudos longitudinais também indicam associação entre o consumo de AAIs e aumento do IMC (índice de massa corporal) – além do aumento do risco cardiometabólico em adultos

(12) e da adiposidade em crianças (13). Uma recente meta-análise de estudos de coorte prospectivo verificou associação dose-dependente entre o consumo de bebidas adoçadas (seja com açúcar ou adoçantes) e risco de DM2, DCV e mortalidade por todas as causas (14).

Especula-se que estes adoçantes desencadeiam propensão para a ingestão de alimentos doces, aumentando o risco de obesidade por meio do aumento do apetite e da ingestão calórica, além de desencadear um desequilíbrio nos mecanismos envolvidos na regulação do BE. Estudos experimentais sugerem que a alta ingestão de substâncias doces (isolados ou associados a uma dieta rica em gorduras) promove ganho de peso por meio de alterações de neuropeptídeos relacionados ao controle alimentar e ao gasto energético (15).

Além disso, apesar de não impactarem na glicemia, os AAls não são fisiologicamente inertes ao metabolismo da glicose (16, 17). Primeiramente, foi demonstrado que o pâncreas (18, 19) e o trato gastrointestinal (TGI) (20, 21) podem detectar estes AAls através de receptores para o sabor doce, T1R2 e T1R3, e de mecanismos de transdução que são semelhantes aos identificados na língua. Em segundo lugar, a ativação dos receptores T1R2 e T1R3 no intestino, em células isoladas L-duodenais, e em células β -pancreáticas desencadeia a secreção do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e de insulina (19, 22). Em terceiro lugar, estudos experimentais demonstram que os AAls interagem com os receptores de sabor doce expressos nas células enteroendócrinas, aumentando a absorção de glicose no lúmen intestinal mediante a expressão e regulação do transportador de glicose sódio-dependente 1 (SGLT1) (21, 23-25), e aumentando a translocação do transportador de glicose 2 (GLUT2) na membrana apical do epitélio intestinal (26).

Estudos experimentais prévios, conduzidos por nosso grupo de pesquisa, mostram que o uso de sacarina aumentou o ganho de peso sem aumento da ingestão calórica correspondente (27-30). A relação dose-resposta de qualquer AAI nos parâmetros metabólicos e comportamentais visados com este trabalho ainda não foi estudado de maneira controlada. Além disso, pode haver algum fator de confusão o fato de a maioria das pesquisas utilizar versões comerciais de adoçantes, que são compostas por *blends*.

Neste contexto, o presente estudo se propõe a testar a hipótese de que o uso crônico de sacarina (versão com elevado grau de pureza), associada à glicose, altera

o comportamento alimentar, a ingestão calórica, o ganho de peso, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina de modo dose-dependente. Estabelecer esta relação causal e elucidar mecanismos envolvidos teria ampla repercussão clínica no manejo nutricional do peso corporal, especialmente em indivíduos com sobrepeso/obesidade, diabéticos ou propensos a desenvolver diabetes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura contempla efeitos metabólicos relacionados ao uso de AAls, especialmente a sacarina, na gestão do peso corporal, metabolismo da glicose e comportamento alimentar.

A estratégia de busca para seleção dos artigos envolveu as seguintes bases de dados: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (PubMed), Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Banco de Teses da CAPES. Na busca, foram interseccionados o fator em estudo e o desfecho de interesse principal. Uma combinação de MeSH *terms* e palavras-chave foi utilizada (Tabela 1). As pesquisas foram limitadas apenas a adoçantes de alta intensidade aprovados pela FDA. Não houve restrição quanto ao desenho do estudo, população ou data da publicação.

Tabela 1 - Estratégias de busca nas bases de dados

	Descritores	Bases de Dados	Estudos (n)
Fator em estudo	"high-intensity sweeteners" OR "sugar substitutes" OR "nonnutritive sweeteners" OR "noncaloric sweeteners" OR "low-caloric sweeteners" OR "artificial sweeteners" OR "saccharin"	LILACS	56
		PubMed	643
Desfecho	"weight gain" OR "obesity" OR "overweight" OR "weight loss" OR "energy intake" OR "feeding behavior" OR "energy balance" OR "glucose metabolism" OR "insulin resistance" OR "glucose homeostasis"	SciELO	7
		Capes	1

Fonte: autoria própria.

Foram priorizados os estudos mais recentes e que melhor adequaram-se às necessidades teóricas e metodológicas deste trabalho original. Além das estratégias de busca descritas acima, publicações específicas potencialmente pertinentes, identificadas acerca da discussão deste tema, de pesquisa foram utilizadas e indicadas nas referências.

2.2. ADOÇANTES DE ALTA INTENSIDADE: ASPECTOS GERAIS

Devido à crescente prevalência mundial de sobrepeso, obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), há um forte apelo quanto ao consumo excessivo de açúcar e ao teor calórico dos alimentos. Uma abordagem frequente no intuito de reduzir o impacto no índice glicêmico e a densidade energética dos alimentos e bebidas é substituir açúcares convencionais por adoçantes de alta intensidade (AAI). Entretanto, há escassez de estudos sobre os efeitos metabólicos do uso destes adoçantes por longo prazo em humanos (31) e evidências disponíveis são heterogêneas, conflitantes ou inconclusivas.

Estes aditivos alimentares também são descritos como substitutos do açúcar, adoçantes não-nutritivos (ANNs), ANCs ou de baixa caloria, pois não apresentam teor energético, ou quando apresentam, são insignificantes devido seu elevado grau de doçura (ex.: aspartame). Geralmente são versões sintéticas, por isso também são chamados de adoçantes artificiais (AAs). As versões naturais incluem o steviol, os polióis e o estrado de Luo Han Guo (32), e representam uma alternativa crescente na indústria alimentícia em resposta à tendência dos consumidores em evitar substâncias sintéticas, porém, não são amplamente utilizados devido ao custo elevado (33).

Os adoçantes são majoritariamente consumidos por meio de produtos industrializados na forma de aditivo, como intensificador sensorial, na qualidade de versão “*diet*”.

Os critérios mínimos de segurança para a comercialização são revisados periodicamente por comitês de especialistas, entidades científicas e regulamentados por autoridades federais como o FDA (*Food and Drug Administration, EUA*), EFSA (*European Food Safety Authority*), JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), *Codex Alimentarius* da FAO/OMS e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Atualmente, nove adoçantes de alta intensidade são aprovados pela FDA (34-36), em 1969 o ciclamato foi banido nos EUA devido propriedades carcinogênicas. Já no Brasil, o ciclamato possui aprovação pela ANVISA (37-39), o advantame foi aprovado em 2019 (40) em algumas categorias alimentares, enquanto o extrato de Luo Han Guo (*monk fruit*) ainda não é reconhecido como edulcorante.

Conforme padrões de segurança definidos nas normas do FDA, os AAI são regulamentados como aditivos alimentares e passam por uma revisão de estudos

toxicológicos antes da aprovação e comercialização. Excepcionalmente, nos casos de uma substância geralmente reconhecida como segura (GRAS) não requer aprovação antes da comercialização. Especialistas qualificados concluem com base em informações publicamente disponíveis que a substância é segura nas condições de uso a que se destina. Uma empresa pode fazer uma determinação GRAS independente para uma substância, notificando ou não o FDA (34). Comumente adoçantes naturais são reconhecidos como GRAS.

Alta intensidade de doçura significa que uma quantidade ínfima é necessária para atingir a doçura habitual desejada. Por exemplo, considerando que um sachê de açúcar de mesa possui 5 gramas, seria necessário 8 mg de sucralose em equivalência. Portanto, formulações destinadas ao uso do consumidor incluem outros ingredientes que adicionam volume. Estes agentes de corpo devem também permitir que o adoçante de varejo resultante tenha poucas calorias por porção. A FDA determina que um alimento ou bebida com menos de cinco calorias por porção pode ter a descrição “sem calorias” no rótulo.

Normalmente estes adoçantes são comercializados na forma de *blends* (adição de polióis, frutose, glicose, maltodextrina, xarope de milho rico em frutose, sacarose, polidextrose amidos modificados ou outros espessantes) ou combinações de dois, ou mais AAls, pois resulta em sinergia de dulçor. Essas combinações também otimizam o perfil temporal de doçura (início mais rápido e menor duração de dulçor), produzir um perfil de doçura mais próximo ao da sacarose, mascara o gosto residual, reduz o custo e muitas vezes melhoram a estabilidade (41).

A sinergia pode ser classificada como quantitativa ou qualitativa. A sinergia quantitativa é definida como ocorrendo quando a doçura de uma mistura de adoçantes é maior que a soma de suas respectivas intensidades de doçura individuais. A sinergia qualitativa é definida como o uso de dois ou mais adoçantes com perfis temporais complementares para obter uma maior aproximação com a da sacarose. Misturas ou combinações de dois, ou mais adoçantes são utilizados frequentemente a fim de atingir o nível desejado de doçura e o perfil temporal em produtos alimentícios e bebidas (41).

A seguir, a Tabela 2 sumariza os AAls aprovados atualmente pelo FDA, bem como seu potencial adoçante em relação ao açúcar de mesa (sacarose) e a ingestão diária aceitável (IDA) conforme as principais autoridades regulamentadores mundiais

(34, 42). A IDA é balizada em 100 vezes menor do que a quantidade mínima que possa causar eventos adversos, tornando o consumo excessivo excepcionalmente difícil (43).

Tabela 2 - Características dos adoçantes de alta intensidade aprovados pela FDA

Adoçante	Aprovação	kcal/g	Potência***	IDA FDA	IDA JECFA
Sacarina	1970	0	200-700	15	0-5
Aspartame	1981	4	200	50	0-40
Acessulfame-K	1988	0	200	15	0-15
Sucralose	1998	0	600	5	0-15
Neotame	2002	0	7000-13000	0,3	0-2
Steviol#	2008*	0	200-400	4**	0-4
Luo Han Guo#	2010*	0	100-250	NE	NE
Advantame	2014	0	20000	32.8	0-5
NHDC#	2020*	0	1900	5	0-5

FDA: *Food and Drug Administration*; JECFA: *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*; IDA: Ingestão Diária Aceitável (mg/kg/d); NE: Não Estabelecido; ***Poder adoçante em relação à sacarose; **Estabelecido pelo JECFA; *Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS); #Derivados de extratos naturais. Fonte: FDA, 2021 e JECFA, 2021.

2.2.1. Sacarina

A Sacarina é o AA mais antigo, descoberta ao acaso em 1879 por Constantine Fahlberg da Universidade Johns Hopkins. É uma substância sintética derivada do petróleo (tolueno e ácido clorosulfônico) (41).

Apesar de ser comercializada desde 1900, obteve a aprovação do FDA apenas em 1970 (44). Em 1977 teve sua segurança questionada após estudos experimentais identificarem potencial carcinogênico (câncer de bexiga em ratos) em altas doses, o que não foi corroborado em humanos (45). O Comitê Científico Europeu para Alimentos concluiu, em 1995, que a sacarina não representa risco de câncer para os humanos (46). A sacarina é aprovada em mais de 100 países, incluindo os Estados Unidos, Canadá e União Europeia. É o terceiro adoçante mundialmente mais utilizado, ficando atrás apenas da sucralose e do aspartame (33).

Há duas configurações distintas de sacarina: em forma de ácido ou ligada aos seus sais (sódio ou cálcio), mas é geralmente comercializada na forma sódica. Em

sua forma ácida é insolúvel em água, mas ligada aos seus sais apresenta alta solubilidade (0,67 g/ml de água à temperatura ambiente) (47).

Devido seu sabor residual forte e metálico, normalmente é comercializada combinando-a com outros AAls (33). Por ser estável ao calor, é utilizada em diversos produtos, incluindo assados, refrigerantes, geleias, gomas de mascar, enlatados, frutas-doces, coberturas para sobremesas e molhos para salada. Também é utilizada em cosméticos e produtos de higiene (pasta de dente, enxaguatório bucal e brilho labial), vitaminas e medicamentos (32).

2.2.2. Aspartame

Foi descoberto acidentalmente pelo químico James Schlatter em 1965, enquanto desenvolvia novos medicamentos para úlcera. É composto por um éster metílico de dois aminoácidos (a fenilalanina e o ácido aspártico) (41). Dentre os AAls, é o único que apresenta teor calórico (4 kcal/g), no entanto, seu elevado poder adoçante (200 vezes a da sacarose) torna este acréscimo ínfimo.

O sabor do aspartame é descrito como limpo e doce como o açúcar, sem o gosto residual amargo, químico ou metálico – muitas vezes associado a alguns outros AAls (41). Seu potencial adoçante pode ser influenciado pelo pH, pela concentração (maior a baixas concentrações) e pela temperatura (maior em temperatura ambiente do que em produtos gelados ou quentes) (32). É mais estável à temperatura ambiente e a um nível de pH de 4,3 apresentando meia-vida de quase 300 dias, enquanto, em pH de 7 sua meia-vida é reduzida para apenas alguns dias (33). É ligeiramente solúvel em água, e sua solubilidade aumenta em pHs extremos bem como com o aumento da temperatura (32). Entretanto, não é adequado para uso em alimentos submetidos à cocção pois o aquecimento causa sua decomposição em dicetopiperazina e consequente perda do sabor doce (33).

O FDA aprovou o aspartame em 1981 para uso sob certas condições como um adoçante de mesa, em goma de mascar, cereais matinais frios e bases secas para determinados alimentos (café instantâneo, chá, gelatinas, pudins, recheios, laticínios e coberturas). Em 1983 foi aprovado para uso em bebidas carbonatadas e em 1996 a aprovação foi estendida para o uso geral (34).

Por conter fenilalanina em sua composição, deve ser evitado por indivíduos com fenilcetonúria – doença genética rara decorrente da deficiência da fenilalanina hidroxilase, enzima que catalisa a conversão de fenilalanina em tirosina, que se não tratada resulta em deficiência intelectual irreversível erupção cutânea eczematosa, autismo, convulsões e deficiências motoras (48). Apesar da quantidade de fenilalanina em alimentos e bebidas contendo aspartame não ser declarada nos rótulos dos ingredientes (49), esta advertência deve constar (34).

2.2.3. Acessulfame-K

O acessulfame de potássio (Ace-K), foi descoberto acidentalmente em 1967 pelo químico Karl Clauss (32), da empresa farmacêutica alemã Hoechst AG (Nutrinova atualmente).

Foi aprovado em 1988 pelo FDA para o uso em categorias específicas de alimentos e bebidas, mas apenas em 2003 foi aprovado como adoçante de uso geral e intensificador de sabor em alimentos (exceto em carnes e aves) sob certas condições de uso (34).

Por ser estável ao calor, mantém o sabor doce mesmo quando submetidos a altas temperaturas durante a cocção. É hidrossolúvel, estável em meio aquoso e estável a uma ampla faixa de pH. Mesmo após armazenamento prolongado em temperatura ambiente, não apresenta alteração em sua concentração ou na intensidade de sabor. Devido sua excelente estabilidade pode ser utilizado em uma ampla gama de alimentos e bebidas, inclusive bebidas que sofrem processo de pasteurização, produtos para higiene, medicamentos e ração para animais (41).

Frequentemente é utilizado com outro adoçante (comumente sucralose ou aspartame) na intenção de melhorar a palatabilidade e o retrogosto amargo, de modo que, os efeitos sinérgicos resultam numa combinação que é mais doce do que a de seus componentes isolados (32).

2.2.4. Sucralose

A sucralose foi descoberta acidentalmente em 1976 quando um programa de pesquisa, conduzido pelo Queen Elizabeth College (QEC) da Universidade de Londres em parceria com uma empresa açucareira britânica (Tate & Lyle PLC), estavam procurando maneiras de usar a sacarose (açúcar de mesa comum) como um intermediário químico. É elaborada a partir da sacarose por um processo que substitui seletivamente 3 grupos de hidroxila por 3 átomos de cloro (32, 41).

Em 1998 o FDA aprovou a sucralose para o uso em 15 categorias alimentares e no ano seguinte foi aprovado como adoçante de uso geral (34).

É um adoçante notavelmente diferente da sacarose em sua intensidade de doçura e estabilidade, embora tenha uma qualidade de sabor comparável, não apresentando sabor residual. Apresenta excelente solubilidade em água, etanol e metanol e é estável a diversas faixas de pH e temperatura. Características organolépticas, boa estabilidade e propriedades físico-químicas fazem dela um adoçante muito versátil, adequado para uma ampla variedade de produtos alimentícios (41).

A sucralose pertence a uma classe de compostos conhecidos como organoclorados (ou cloro carbonos), e alguns desses, particularmente os lipossolúveis, são tóxicos para plantas e animais (incluindo humanos). Entretanto, a sucralose não é tóxica em pequenas quantidades, pois é extremamente insolúvel em gordura, não se decompõe e nem elimina o cloro (50).

O consumo de sucralose (pura) não afeta o controle glicêmico ou sensibilidade à insulina em indivíduos saudáveis quando administrada isoladamente, porém, o seu uso combinado com agentes de volume de origem glicídica demonstrou impacto negativo no metabolismo da glicose (51).

2.2.5. Neotame

AAI sintético, derivado do aspartame a partir de uma simples N-alquilação. Inventado pelos cientistas franceses Claude Nofre e Jean-Marie Tinti num programa de pesquisa de longo prazo que objetivava desenvolver uma versão com características de desempenho otimizadas (41).

Dada a sua alta potência de doçura é um dos AAls mais econômicos do mercado. Proporciona característica sensorial semelhante ao da sacarose, com predomínio de sabor doce muito limpo, e sabores residuais mínimos. Devido seu perfil temporal da doçura, é utilizado também como intensificador de sabor – conferindo uma funcionalidade única como aditivo alimentar. Apresenta elevada estabilidade e solubilidade (água e álcoois) em uma ampla faixa de temperatura (41).

É comercializado na sua forma pura ou misturado com outros adoçantes (ex.: diminui o amargor residual da sacarina). Pode ser encontrado em produtos de panificação, refrigerantes, goma de mascar, glacê, sobremesas congeladas, geleias, gelatinas, pudins, frutas processadas, coberturas e xaropes (32). Atualmente, a *NutraSweet Company* detém os direitos de uma ampla gama de patentes relacionadas ao neotame (41).

Foi aprovado pelo FDA em 2002 como adoçante de uso geral e intensificador de sabor em alimentos (exceto em carnes e aves) sob certas condições de uso (34).

Diferente do aspartame, não produz fenilalanina, o que o torna adequado ao consumo por fenilcetonúricos (47).

Outro AA similar é o alitame, que está com aprovação pendente perante o FDA.

2.2.6. Stevia

É um AAI de origem natural amplamente utilizado e leva o nome comercial de Stevia®. A planta *Stevia Rebaudiana* (SR) é um arbusto perene da família *Asteraceae*, nativa da América do Sul, especialmente Brasil e Paraguai (52), já é utilizada há séculos por povos indígenas para adoçar os alimentos. Somente o ato de mascar a folhas já induz a uma percepção de sabor doce 10 vezes superior ao açúcar de mesa (33).

É composta principalmente por esteviol, esteviosídeo e rebaudiosídeo A, e em menor concentração: dulcosídeo A, rubusosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo B, C, D, E e F. Estes glicosídeos de esteviol são os responsáveis pelo seu sabor doce. São obtidos através da extração das folhas seguido de concentração adicional, purificação e secagem mediante pulverização (33). É estável ao calor e ao pH e não é fermentável (53, 54). Em soluções aquosas, com PH entre 2-8, ocorrem reações que levam à perda de rebaudiosídeo A (41).

Apesar de ter doçura mais persistente que a sacarose, apresenta sabor residual amargo e notas de alcaçuz (33), especialmente se utilizado em altas doses ou de forma isolada (sem *blend*). Como o esteviosídeo exibe muito mais amargor do que o rebaudiosídeo A, atualmente há no mercado versões com altos níveis de rebaudiosídeo A (41).

Por apresentar um complexo de terpenos, taninos, esteróis, vitaminas, carotenos, flavonóides e outros microelementos (55), pesquisadores têm investigado suas propriedades biofuncionais (56, 57). Alguns evidenciaram efeitos antivirais (58), antiinflamatórios (59), antitumorais (60-62), antioxidantes, anti-hiperglicêmicos (63), antiaterosclerótica (52) e atividade imunomoduladora (64).

O FDA reconhece como sendo seguro para o consumo, desde que o grau pureza seja superior a 95%. O uso de folhas de stevia ou seus extratos brutos não são considerados GRAS e sua importação para os Estados Unidos não é permitida para uso como adoçante (34). No Brasil, foi aprovado no final dos anos 90 como agente flavorizante e edulcorante (38).

2.2.7. Luo Han Guo

Siraitia Grosvenorii Swingle (SGS), conhecida como fruta do monge (monk fruit), é uma videira perene da família *Cucurbitaceae*, nativa do sul da China e da Tailândia onde tem sido usado por séculos como adoçante ou como produto medicinal (33). Atualmente, tem se popularizado como um adoçante natural devido às tendências globais com hábitos alimentares saudáveis e preocupação com efeitos adversos da exposição às versões sintéticas.

O extrato da fruta contém níveis variados de mogrosídeos (II-VI), que são os constituintes não nutritivos da fruta, responsáveis pela doçura característica (32, 33). Mogrosídeos são um grupo de glicosídeos triterpênicos do tipo cucurbitano com atividade antioxidante (33). Liu *et al.* (2018) (65) revisaram uma ampla gama de propriedades farmacológicas do extrato da fruta e seus componentes individuais em que identificou efeitos antitumorais, antivirais, anti-hiperglicêmicas, hipolipemiantes e redução de radicais livres.

As estruturas dos principais mogrosídeos (IV e V) foram estabelecidas por Takemoto *et al.* (1983), após extensos estudos químicos e espectroscópicos (66). O

princípio doce mais abundante é o do mogrosídeo V, que pode ocorrer em níveis de concentração de 0,8-1,3% p/p (67). O mogrosídeo V é um composto polar, pois contém cinco resíduos de glicose, permitindo sua extração em água ou numa solução aquosa com etanol a 50%. As soluções aquosas contendo mogrosídeo V são estáveis quando fervidas (41).

Dependendo do grau de concentração, os mogrosídeos IV e V aparentam potencial dulçor de 233-392 e 250-425 vezes em relação à sacarose. A doçura dos mogrosídeos são definidas por um perfil de início lento, típico de adoçantes naturais de alta potência, apresenta sabor residual de alcaçuz com uma sensação de refrescância – o que pode limitar seu uso (44). O sabor residual amargo pode ocorrer quando a extração é decorrente de frutos não maduros (41).

O FDA reconhece como sendo seguro para o consumo (34), e estabelece concentração mínima de 95% de mogrosídeo V (36).

2.2.8. Advantame

O advantame foi criado a partir de um longo programa de pesquisa no intuito de desenvolver novos adoçantes de alta potência com características organolépticas desejáveis. O projeto envolveu química computacional para identificar, numa série de triagens, moléculas potenciais baseadas nos seguintes critérios: potência doce, perfil de sabor detalhado, propriedades físico-químicas, viabilidade de produção industrial e estimativa da dinâmica metabólica no corpo humano por ensaios *in vitro* (41).

É formado por uma amina secundária do aspartame acrescida de filodulcina ou vanilina (um componente da baunilha) (32). Interessantemente, o advantame possui semelhança estrutural química a dos adoçantes naturais (41).

Apresenta perfil de sabor muito semelhante ao do aspartame, porém ligeiramente mais doce e sem gosto residual (41).

A solubilidade do advantame em água, etanol e acetato de etila aumenta conforme a temperatura, apresentando variação de 0,076 g/L a 15°C em água e 32,277 g/L em etanol a 60°C. Considerando a notável potência de dulçor do advantame sua solubilidade nesses solventes é mais que suficiente para a funcionalidade necessária.

Sua estabilidade depende do pH, da umidade e da temperatura. Sob mesmas condições, exibe o mesmo perfil de estabilidade que o aspartame e seguem teoricamente o mesmo mecanismo de degradação. No entanto, em condições de pH e/ou temperatura relativamente mais elevados a formação de dicetopiperazina (que ocorre no aspartame) é bloqueada devido ao impedimento estérico pelo volumoso grupo funcional vanil, permitindo uso em alimentos submetidos à cocção. Além disso, uma vez que a ligação dipeptídica do advantame não é reconhecida como tal pelos microrganismos, espera-se excelente estabilidade em produtos fermentados (ex.: iogurtes) (41).

É aprovado pelo FDA como adoçante de uso geral e intensificador de sabor em alimentos (exceto em carnes e aves) sob certas condições de uso (34).

2.2.9. Neoesperidina dihidrocalcona

A neoesperidina dihidrocalcona (neoesperidina DC ou NHDC) é um glicosídeo flavona, considerada um AAI seminatural (68). Apesar de não estar presente na natureza na sua forma intacta, seus flavonóides estruturalmente relacionados e suas dihidrocalconas correspondentes ocorrem naturalmente em muitas plantas (ex.: frutas cítricas). A dihidrocalcona é obtida a partir da hidrogenação da flavona (neoesperidina chalcona), que é isolada e extraída da casca de frutas cítricas imaturas (69).

A NHDC foi descoberta por Horowitz e Gentili em 1963 enquanto estudava as relações entre estrutura e amargor em glicosídeos fenólicos do gênero *Citrus*. Surpreendentemente, o produto resultante da hidrogenação da amarga flavanona neoesperidina produziu uma substância intensamente doce, a neoesperidina DC (41). De fato, a NHDC é particularmente eficaz em mascarar os sabores amargos de outros compostos encontrados nos cítricos, incluindo a limonina e a naringina.

Atualmente a NHDC vem recebendo interesse renovado devido à sua recente aprovação nos EUA tanto como adoçante, como intensificador de sabor. Apesar de ter sido utilizada em produtos alimentícios desde 1989, recebeu aprovação do FDA apenas no final de 2020 mediante uma carta de não objeção ao status GRAS da NHDC, permitindo seu uso em diversas categorias alimentícias em níveis máximos de 10-1000 ppm (35).

Assim como outros glicosídeos (ex.: glicosídeos de esteviol, glicirrizina), a NHDC tem perfil de doçura de início lento e tardio, mas com duração prolongada, e apresenta um leve sabor de alcaçuz. Suas notáveis propriedades sinérgicas e modificadoras de sabor fazem com que seja geralmente utilizada em misturas com outros AAls para imitar a intensidade de sabor e doçura da sacarose (41, 69) ou para bloquear sabores amargos de outros AAls. Além disso, como a NHDC otimiza propriedades organolépticas dos demais AAls, faz com que seja necessária uma quantidade menor, oferecendo um excelente custo-benefício para a indústria alimentícia. Seu uso também se estende na indústria farmacêutica pelo potencial de mascarar sabores amargos e residuais (41).

A solubilidade da NHDC em água destilada à temperatura ambiente é baixa (0,4-0,5 g/L), sendo totalmente solúvel tanto em água quente (80° C) quanto em álcali aquoso, e apresenta maior solubilidade em uma mistura de álcool-água do que em água ou etanol sozinhos. Apresenta boa estabilidade a altas temperaturas e a uma ampla faixa de pH (41).

2.3. METABOLISMO DOS ADOÇANTES DE ALTA INTENSIDADE

Esta seção fornece uma visão geral dos principais processos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos AAls aprovados pela FDA.

A sacarina não é metabolizada (Figura 1), embora possa atravessar a placenta e ser transferida através do leite materno. Entre as espécies animais a taxa de absorção é inversamente proporcional ao pH gástrico – maior em humanos do que em ratos (70). Após a ingestão, cerca de 85-95% é absorvida e se liga às proteínas plasmáticas para a circulação sanguínea, em seguida é excretada na urina, enquanto os 5-15% remanescentes passam pelo TGI e são integralmente eliminados nas fezes. Porém, estudos sugerem que essa fração da sacarina, que não é imediatamente absorvida, consegue interferir e modificar a composição da microbiota intestinal (MI) (70).

Após a ingestão, o aspartame é decomposto no intestino delgado por esterases e peptidases em: fenilalanina (50%), ácido aspártico (40%) e metanol (10%) (71). Estes compostos hidrolisados são totalmente absorvidos pela circulação sistêmica e metabolizados seguindo suas vias metabólicas habituais. O metanol é metabolizado

no fígado enquanto o ácido aspártico e a fenilalanina entram no *pool* dos aminoácidos livres. Assim sendo, os componentes são absorvidos pelos tecidos periféricos, utilizados para a síntese e metabolismo das proteínas e excretados (Figura 1). Por ser rapidamente digerido, o aspartame não acumula no organismo, tampouco é capaz de afetar a MI uma vez que não chega ao cólon (72).

Da mesma forma que a sacarina, o acessulfame-K não é metabolizado (70). É absorvido rapidamente e sua molécula é excretada de forma íntegra por via urinária, principalmente (41) (Figura 1).

A sucralose não sofre metabolismo significativo – é biologicamente inerte uma vez que absorvida é simplesmente excretada de forma intacta (Figura 1) (70). A maioria da sucralose ingerida (73-89%) é excretada diretamente nas fezes, enquanto, os 11-27% remanescentes são absorvidos no TGI. Essa parcela é absorvida pela circulação sistêmica sendo eliminada na urina com 20-30% da sucralose metabolizada (47, 50). A fração metabolizada perfaz 2,2-8,1% do total ingerido, não produz energia e não apresenta riscos significativos de segurança (70).

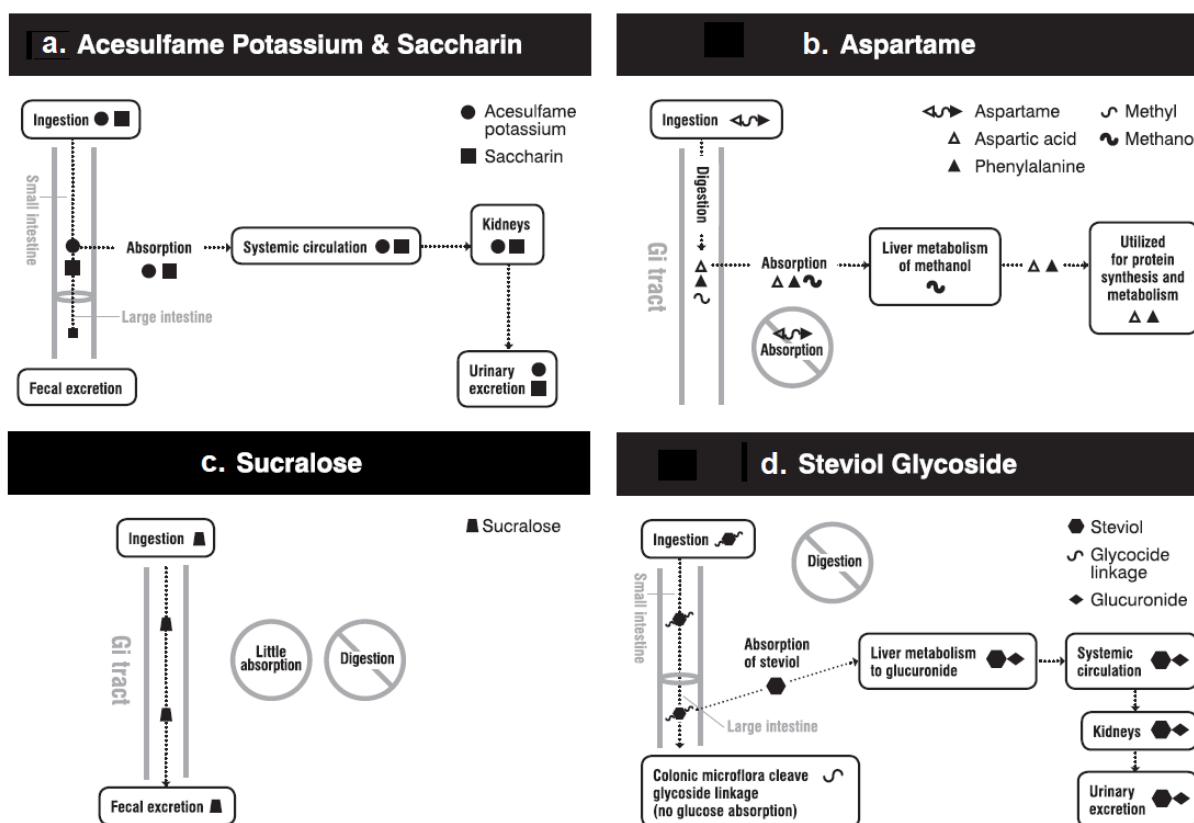
Metade do neotame ingerido não é absorvido, é eliminado na sua forma íntegra por via fecal. A outra metade, é rapidamente absorvida e excretada na urina. A principal via metabólica é a hidrólise do éster metílico por esterases plasmáticas, isso produz neotame desesterificado (principal metabólito) e uma quantidade insignificante de metanol (41).

Os glicosídeos de esteviol são carboidratos não metabolizáveis pelo organismo humano, logo, não gera valor calórico nem resposta glicêmica. Após a ingestão, os glicosídeos de esteviol não são digeridos no TGI superior, mas sim metabolizados por bactérias da família *Bacteroidaceae* no cólon resultando na produção de esteviol (73), sendo subsequentemente processado no fígado e convertido em glucoronídeo de esteviol. Após a digestão os glicosídeos de esteviol são decompostos em esteviol no intestino, excretado por via urinária na forma de glucoronídeo de esteviol (41, 54) (Figura 1).

Um estudo experimental de farmacocinética, Murata *et al.* (2010) (74) analisaram os principais constituintes do extrato de Luo Han Guo, e identificaram que os mogrosídeos sofrem mínima absorção sistêmica. Como os outros glicosídeos, o mogrosídeo tem pouco ou nenhum impacto no índice glicêmico (33). Após a ingestão, o mogrosídeo V (pureza de 72% p/p) é degradado por enzimas digestivas e por

bactérias intestinais, e parcialmente (61%) excretado nas fezes na forma de mogrol (aglicona) e seus glicosídeos (74). Corroborando os achados de Murata (2010), Xu *et al.* (2015) (75) verificaram que, após a ingestão sequenciada do mogrosídeo V (pureza >98% p/p), a maioria dos seus metabólitos são excretados nas fezes enquanto o próprio mogrosídeo V é excretado principalmente na urina. Porém, os autores encontraram a presença sete distintos metabólitos bioativos do mogrosídeo V em diversos órgãos analisados, no plasma sanguíneo e na urina – indicando algum grau de absorção e alguma biodisponibilidade sistêmica. Como os valores quantitativos para metabólitos foram relatados nas áreas de pico ou em valores relativos, não em valores absolutos, estes resultados devem ser analisados com parcimônia.

Figura 1 - Esquema comparativo das distintas rotas envolvidas na absorção, digestão, distribuição, metabolismo e excreção dos principais adoçantes de alta intensidade



Principais vias de absorção, digestão, metabolismo e excreção do acessulfame de potássio (Ace-K), sacarina, aspartame, glicosídeos de esteviol e sucralose. A sacarina e o Ace-K são os únicos absorvidos e eliminados de forma intacta (a); o aspartame é completamente digerido por enzimas digestivas e apenas seus compostos são absorvidos (b); a maior parte da sucralose não é absorvida, é eliminada de forma intacta nas fezes (c); apenas o metabólito esteviol dos glicosídeos de esteviol é absorvido (d). Descrições mais aprofundadas desses processos e quaisquer outras vias secundárias que possam existir estão descritas nas seções acima. Fonte: Magnuson *et al.*, 2016 (70).

Após a ingestão, o advantame é rapidamente hidrolisado no TGI e eliminado majoritariamente na forma de metabólitos. Aproximadamente 87-93% é excretado nas fezes, enquanto os 7-13% remanescentes são absorvidos no lúmen intestinal e excretado por via urinária. Como o advantame é pouco absorvido e é metabolizado rapidamente, apenas pequenas quantidades dele e seus metabólitos podem ser detectados no sangue logo após a ingestão (32, 41, 76).

Devido à semelhança estrutural, a absorção, distribuição, metabolismo e excreção da NHDC é semelhante à de outros flavonoides. A absorção da NHDC e de seus glicosídeos flavonoides é considerada baixa devido à sua volumosa porção glicosídica hidrofílica. No intestino delgado, os glicosídeos flavonoides são hidrolisados pela lactase-florizina hidrolase. No entanto, eles são na maioria não digeridos até chegar ao intestino grosso onde ocorre a hidrólise e a fermentação mediadas pelo microbioma (35, 77), produzindo os mesmos ou similares produtos de sua decomposição, bem como seus análogos de ocorrência natural (69). Devido à rápida excreção de NHDC não é esperado que o composto permaneça em tecidos e órgão por longos períodos (35).

2.4. POTENCIAIS EFEITOS METABÓLICOS ADVERSOS:

Os AAls têm sido comercializados com forte apelo de serem substitutos saudáveis do açúcar (sacarose) devido seu potencial de manter o sabor doce, mas sem contribuir com acréscimo calórico ou efeitos glicêmicos (78). No entanto, dados correlacionais sugerem uma associação entre o consumo de AAls, ganho de peso e DM2. Outros estudos indicam aumento do apetite, alteração da MI, aumento da adiposidade, insulinoresistência e alteração no metabolismo da glicose. Recentes revisões da literatura oferecem opiniões conflitantes sobre este tópico (31, 68, 79-86), inclusive em populações pediátricas (87).

Uma série de estudos observacionais (Tabela 3), de coorte prospectiva, relacionaram o consumo de produtos *diets*, geralmente na forma de bebidas adoçadas artificialmente, com ganho de peso, aumento do IMC, desenvolvimento de sobrepeso ou obesidade, aumento da circunferência abdominal, síndrome metabólica, DM2, diabetes gestacional e doença cardiovascular.

Immamura *et al.* (2015) (88) em uma meta-análise de 17 estudos de coorte, analisaram o risco para DM2 com o consumo de bebidas adoçadas (com açúcar ou AAls) e verificaram que o consumo de bebidas adoçadas artificialmente aumentou em 25% [(IC 95% 18-33); P 70%] o risco de DM2, mas foi atenuado para 8% [(IC 95% 2-15); P 64%] ao ajustar para obesidade. O estudo concluiu não haver benefício na substituição de bebidas adoçadas com açúcar por versões *diets*.

Embora o delineamento de estudos prospectivos estabeleça uma sequência temporal, pelo menos duas hipóteses, que não são mutuamente exclusivas, podem explicar a associação paradoxal entre o consumo de AAls e os resultados metabólicos adversos: (1) é possível que a causalidade reversa ou confusão residual possa explicar tais achados, especialmente porque o consumo de produtos *diets* é maior entre diabéticos, obesos e/ou indivíduos preocupados com o gerenciamento do peso corporal, e esse viés pode permanecer mesmo após ajustar os fatores de confusão; e/ou (2) AAls afetam processos biológicos envolvidos na regulação do BE na homeostase da glicose. No entanto, possíveis mecanismos concernentes a essa relação causal foram respaldados por achados em ensaios clínicos randomizados (ECRs) (Tabela 4) e estudos experimentais (Tabela 5).

Higgs *et al.* (2019) (89) em um recente ECR comparou, por 12 semanas, o efeito de 4 AAls distintos (sacarina, sucralose, aspartame e rebaudioside A) e sacarose no peso corporal, comportamento alimentar e tolerância à glicose em adultos com sobrepeso ou obesidade. Foi verificado que o consumo de sacarose e sacarina aumentam significativamente o peso corporal em relação ao aspartame, rebaudioside A e sucralose. Enquanto a mudança de peso no grupo de utilizou sucralose foi direcionalmente negativo e inferior quando em comparação com sacarose, sacarina, aspartame e rebaudioside A. Essas descobertas podem refletir diferentes efeitos metabólicos, inerentes a cada AAI. Além disso, possíveis efeitos favoráveis de um, podem estar sendo compensados por outros. Interessantemente, o maior ganho de peso promovido pela sacarina não foi acompanhado de uma maior ingestão calórica, ou menor gasto energético – diferente do encontrado com os demais compostos utilizados, o que sugere vias metabólicas alternativas, relacionadas a otimização no armazenamento energético.

Reid *et al.* (2007 e 2010) analisaram, em dois estudos (90, 91), o impacto de bebidas adoçadas com sacarose ou aspartame ao longo de quatro semanas de

intervenção e encontraram resultados divergentes. No primeiro (90), que incluiu mulheres eutróficas, verificaram que o aspartame esteve marginalmente associado a uma maior perda de peso. Já no segundo estudo (91), que incluiu mulheres com excesso de peso, não se verificou associação com mudança de peso.

Um controverso estudo experimental (92), financiado pela *Sugar Association*, avaliou por 12 semanas e efeito de quatro doses progressivas (1,1 a 11 mg/kg/d *versus* controle) de sucralose (Splenda®) no TGI. Os autores identificaram ganho de peso, alterações histopatológicas intestinais, redução significativa nas bactérias intestinais benéficas, acompanhado de aumento do pH fecal [que normalmente ocorre quando há uma diminuição na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por bactérias colônicas, conseqüente do metabolismo fermentativo de carboidratos e proteínas que não foram digeridos] e expressão aprimorada de citocromos (que potencialmente limitam a biodisponibilidade de nutrientes e medicamentos). Essas diferenças ocorreram mesmo em sub-doses. No entanto, como a versão comercial Splenda® é um *blend* composto por apenas 1,1% de sucralose (os 98,9% remanescentes são agentes de volume, maltodextrina e glicose), agentes confundidores devem ser considerados, uma vez que o grupo controle foi composto apenas por água. Após, um comitê de especialistas de renomadas instituições (93) questionou o rigor científico deste estudo, reportando diversas limitações e falhas metodológicas, impossibilitando uma interpretação válida dos resultados.

Suez *et al.* (2014) (16), em um robusto estudo, evidenciaram que a ingestão de sacarina por 11 semanas implicou no desenvolvimento de intolerância à glicose, bem como mudanças composicionais e funcionais na MI de camundongos. Adicionalmente, os autores demonstraram a via causal entre sacarina, intolerância à glicose e alteração na microbiota através do transplante fecal entre os camundongos expostos à sacarina e os *germ-free*. Com metodologia similar, Palmñas *et al.* (2014) (94) também identificaram alteração na composição da MI e elevação na glicose de jejum nos ratos tratados com baixa dose de aspartame por 8 semanas. Recentemente estes resultados foram reproduzidos pelo mesmo grupo em um ECR (95).

Os efeitos deletérios dos AAls no metabolismo da glicose foram também abordados por Dalenberg *et al.* (2020) (51), que em seu ECR demonstrou o efeito adverso da suplementação de curto prazo com sucralose no controle glicêmico, mas

somente quando acoplado a um carboidrato. Os autores sugeriram haver desregulação no controle intestino-cérebro no metabolismo da glicose.

Outras alterações metabólicas induzidas por AAls foram encontradas em um recente estudo experimental, conduzido por Farid *et al.* (2020) (96). Eles avaliaram, por 16 semanas, versão natural e sintética de AAls (stevia e sucralose), sacarose *versus* um grupo controle. O estudo foi estratificado por sexo devido às alterações metabólicas e a possível interferência do ciclo estral feminino. Não houve diferença no ganho de peso e o consumo de ração variou conforme o sexo. Porém, ambos adoçantes promoveram grave dano hepático e renal, além de significativa redução nos níveis de hemoglobina, HCT% (hematócrito), hemácias e leucócitos, e aumento de LPS e citocinas pró-inflamatórias.

Recentes meta-análises encontraram resultados conflitantes quanto ao uso de AAls para o manejo do peso corporal. Enquanto algumas indicam associação com menor ganho de peso e menor ingestão calórica (97), outra meta-análise de ECRs não encontrou evidência dos benefícios pretendidos com o uso de AAI no que diz respeito ao manejo do peso corporal. Inclusive, na sua análise com estudos de coorte foi encontrado que a ingestão rotineira destes adoçantes pode estar associada ao aumento do IMC e do risco cardiometabólico (12).

Em 2020, Lavianda-Molina *et al.* (7), noutra meta-análise de ECRs que avaliou o efeito dos AAls no IMC e peso corporal, concluiu efeito favorável, onde a substituição do açúcar por AAls pode levar à perda de peso em indivíduos com sobrepeso ou obesidade sob uma dieta restrita, mas não num contexto contrário.

Por outro lado, Azad *et al.* (2017) (12) incluiu em sua meta-análise tanto estudos observacionais (30 estudos) como ECRs (7 estudos) com 6 meses de duração mínima. Nos estudos de coorte incluídos, o consumo de AAls foi associado a um aumento no IMC [*mean correlation* 0,05 (IC 95% 0,03-0,06); P 0%] e no peso corporal [*mean correlation* 0,06 (IC 95% 0,05-0,07); P 46%], além de maior risco para DM2 [RR 1,14 (IC 95% 1,05-1,25); P 52%]. Ao analisar ECRs, não foi encontrado efeito favorável no uso de AAls para perda de peso [SMD -0,17 (IC 95% 0,54-0,21); P 81%] ou para diminuição no IMC [MD -0,37 (IC 95% -1,10-0,36); P 9%].

Romo-Romo *et al.* (2016) (98) incluíram em sua revisão sistemática estudos observacionais, ensaios clínicos e meta-análises e, avaliaram a associação entre o consumo de AAls e o desenvolvimento de doenças metabólicas, incluindo DM2,

obesidade e SM. Os autores observaram que alguns estudos sugerem uma associação entre o consumo de AAls e o desenvolvimento de doenças metabólicas, no entanto, concluíram que o nível de evidência dos estudos observacionais não pode estabelecer causalidade. Adicionalmente, concluíram que os resultados obtidos em ensaios clínicos são contraditórios devido à heterogeneidade na população incluída, tipo de AAl estudado, uso de placebo, tempo de exposição e desfechos avaliados.

Desfechos divergentes encontrados entre estudos de coorte e ECRs podem ser atribuídos ao efeito temporal, pois ECRs são geralmente mais curtos em duração. Outro viés a ser considerado dentre ECRs é o fator comparativo – 4 estudos de Azad (12) utilizaram água, e dois utilizaram placebo. Ao compararmos AAls com controles calóricos (ex.: sacarose), a neutralidade ou menor peso corporal pode ser por incremento do efeito da sacarose por si mesmo.

Além disso, a variabilidade nas respostas encontradas nos ECRs pode ser atribuída ao tipo de população estudada (indivíduos com sobrepeso/obesidade, idade), à condição alimentar (dieta controlada entre grupos) ao tipo de adoçante utilizado, se utilizado isoladamente ou se forma de *blend* ou ainda o fator comparativo (água, sacarose ou outros tipos de AAls).

Uma recente revisão sistemática avaliou conflitos de interesses financeiros em publicações sobre AAls e alterações no peso corporal (99). Foi verificado que a maioria das publicações com desfechos favoráveis à utilização de AAls eram ECRs e receberam contribuição da indústria alimentícia. Por outro lado, os estudos observacionais, em sua maioria, demonstram não ser favoráveis e não houve patrocínio da indústria alimentícia, e sim de órgãos regulamentadores. Os autores concluíram que os estudos que receberam suporte da indústria alimentícia sofreram influências em seus desfechos.

O aumento epidêmico da obesidade e paralelo aumento no consumo destes substitutos do açúcar (73) e as divergências encontradas acerca do tema fornecem uma razão plausível para elucidarmos os mecanismos subjacentes e seus potenciais efeitos sobre o metabolismo do hospedeiro. Nas seções a seguir serão discutidos os possíveis mecanismos dos efeitos metabólicos adversos relacionados ao uso de AAls.

Tabela 3 - Estudos observacionais de coorte prospectiva que avaliaram associação entre o consumo de AAIs e efeitos metabólicos adversos

Autor, ano	Coorte	N Sexo	Idade basal (a)	Follow-up (a)	AAI	Principais parâmetros	Fator comparativo entre AAIs	Principais desfechos (estatística [IC 95%])
Lutsey <i>et al.</i> , 2008 (100)	ARIC	9514 ♂ ♀	45 - 64	9	BAA (refrigerante <i>diet</i>)	QFA (ingestão kcal, padrão alimentar accidental), SM	tercis extremos	↑ SM: HR=1,34 [1,24-1,44], $p<0,001$
Fowler <i>et al.</i> , 2008 (10)	SAHS	3682 ♂ ♀	25 - 64	8	BAA	SB/OB, ΔIMC	categorias extremas dose/sem: >22, 11-21, 3-10, <3 e 0	↑ SB/OB (OR=1,93 [1,21-3,10], $p=0,007$) ↑ OB (OR=2,03 [1,36-3,03], $p=0,005$) ↑ ΔIMC: positiva relação dose-resposta
Nettleton <i>et al.</i> , 2009 (101)	MESA	5011 ♂ ♀	45 - 84	5	BAA (refrigerante <i>diet</i>)	QFA basal, GJ, incidência de DM2 e SM (e seus componentes)	categorias extremas: ≥1 dose/d vs raro/nunca	↑ DM2: HR=1,67 [1,27-2,20], $p<0,001$ ↑ SM: HR=1,36 [1,11-1,66], $p<0,001$ ↑ CC: HR=1,59 [1,23-2,07] ↑ GJ: HR=1,28 [1,08-1,52]
Duffey <i>et al.</i> , 2012 (102)	CARDIA	4161 ♂ ♀	18 - 30	20	BAA	história alimentar, medidas antropométricas SM (e seus componentes) no 0, 2º, 5º, 7º, 10º, 15º e 20ª	algum vs nenhum consumo	↑ SM: RR=1,23 [1,01-1,50]
Field <i>et al.</i> , 2014 (103)	GUTS II	3438 ♂ 4121 ♀	13 ± 2	3	BAA (refrigerante <i>diet</i>)	QFA, IMC	cada porção/d consumida	↑ ~0,4un IMC: ♂ (β 0,21 [0,07, 0,35]) ♀ (β 0,56 [0,32, 0,80])
O'Connor <i>et al.</i> , 2015 (104)	EPIC Norfolk	24653 ♂ ♀	59 ± 9	11	BAA	DM2, história alimentar, questionários de saúde e estilo de vida	tercis extremos	↑ DM2: HR 1,67 [1,33-2,11], $p<0,001$, mas NS ao ajustar para CC e IMC: HR 1,17 [0,93-1,48], $p= 0.12$
Smith <i>et al.</i> , 2015 (105)	HPFS NHS I NHS II	21472 ♂ 48449 ♀ 48071 ♀	47,4 ± 6,2 48,9 ± 6,3 37,7 ± 4,1	24 24 16	BAA (refrigerante <i>diet</i>)	QFA, ΔPC	cada porção/d consumida	↑ ΔPC HPFS: β 0,26 [0,18, 0,34], $p<0,0001$ ↑ ΔPC NHS I: β 0,33 [0,28, 0,38], $p<0,0001$ ↑ ΔPC NHS II: β 0,32 [0,28, 0,37], $p<0,0001$

Tabela 3 - Continuação

Autor, ano	Coorte	N Sexo	Idade basal (a)	Follow- up (a)	AAI	Principais parâmetros	Fator comparativo entre AAIs	Principais desfechos (estatística [IC 95%])
Fowler <i>et al.</i> , 2015 (11)	SALSA	384 ♂ ♀	≤65	9	BAA (refrigerante <i>diet</i>)	ingestão de refrigerantes <i>diets</i> , CC, peso e altura aferidos no início e no fim de cada um dos 4 períodos avaliativos	≥1 dose/d: S/N S/ocasional/N	↑ ΔCC: 2,11 vs 0,77cm (p<0,001) efeito dose-resposta: 0,77 vs 1,76 vs 3,04cm (p=0,002)
Huang <i>et al.</i> , 2017 (106)	WHI	64850 ♀	50 - 79	8	BAA (refrigerante <i>diet</i> e suco de fruta)	QFA, DM2, IMC em mulheres pós- menopausa	categorias extremas: ≥2/d vs <3/m	↑ DM2: entre ♀ obesas: HR=1,26 [1,09-1,46], p=0,0002 no geral: HR=1,21 [1,08-1,36], p=0,0001
Gearon <i>et al.</i> , 2018 (107)	MCCS	7894 ♂ ♀	25,6 ± 3,6	13	BAA (refrigerante <i>diet</i>)	IMC, CC, comportamento dietético, escolaridade, atividade física de lazer	≥1/m vs <1/m	associado a ↑ ΔIMC: ♂ (β 0.28 [0.15, 0.43]) ♀ (β 0.52 [0.38, 0.67])
Malik <i>et al.</i> , 2019 (108)	HPFS NHS	37716 ♂ 80647 ♀	30 - 55 40 - 75	28 - 34	BAA	mortalidade total, causas específicas, por câncer ou DCV, QFA	categorias extremas	≥2/d: ↑ mortalidade: total (HR=1,07 [1,02-1,12], p<0,01) por DCV (HR=1,13 [1,02-1,25], p<0,02)
Hirahatake <i>et al.</i> , 2019 (109)	CARDIA	4719 ♂ ♀	18 - 30	30	BAA	IMC, peso, DM2, história alimentar (0, 7º e 20º ano)	categorias extremas: ≥2/d vs 0	↑ risco DM2 (HR 1,71 [1,22-2,39], p=0,003), mas atenuadas ao ajustar por alterações de peso (HR 1,26 [0.90-1.78] p=0,3)
Hinkle <i>et al.</i> , 2019 (110)	DNBC DWH	607 ♀	31,5 ± 4,5	9-16	BAA	QFA (gestação e 9-16a após), IMC, DM2 e marcadores de risco cardiometabólico em mulheres com DMG prévio	categorias extremas: ≥1/d vs <1/m	↑ IMCG e ↑ IMC-pós (p=<0.001) ingestão kcal na gestação (p=0,53) e pós iguais (p=0,48) ↑ HbA1c (RR 6.5%, p=0,007)

Tabela 3 - Continuação

Autor, ano	Coorte	N Sexo	Idade basal (a)	Follow- up (a)	AAI	Principais parâmetros	Fator comparativo entre AAIs	Principais desfechos (estatística [IC 95%])
Debras <i>et al.</i> , 2022 (111)	NutriNet-Santé	103338 ♂ ♀	42,2 ± 14,4	12	produtos gerais (global e por molécula: aspartame, Ace-K e sucralose)	DCV (geral, doença cardíaca coronária e doença cerebrovascular)	consumidores: não, baixo ou alto categorias extremas	↑ DCV (HR=1,09 [1,01-1,18], <i>p</i> =0,03) ↑ DCeV (HR=1,18 [1,06-1,31], <i>p</i> =0,002) aspartame: ↑ DCeV (HR=1,17 [1,03-1,33], <i>p</i> =0,02) Ace-K: ↑ DCV (HR=1,40 [1,06-1,84], <i>p</i> =0,02) sucralose: ↑ DCV (HR=1,31 [1,00-1,71], <i>p</i> <0,05)

AAI: adoçante de alta intensidade; Ace-K: acessulfame de potássio; ARIC: *Atherosclerosis Risk in Communities*; BAA: bebidas adoçadas artificialmente; CARDIA: *Coronary Artery Risk Development in Young Adults*; CC: circunferência da cintura; DCeV: doença cerebrovascular; DCV: doença cardiovascular; DM2: diabetes mellitus tipo 2; DMG: diabetes mellitus gestacional; DNBC: *Danish National Birth Cohort*; DWH: *Diabetes & Women's Health*; ENRICA: *Study on Nutrition and Cardiovascular Risk in Spain*; EPIC Norfolk: *EPIC-Norfolk Study*; GJ: glicemia de jejum; GUTS II: *Growing Up Today Study II*; HbA1c: hemoglobina glicada; HPFS: *Health Professionals Follow-Up Study*; HR: *hazard ratio*; IMC: índice de massa corporal (kg/m²); IMCG: índice de massa corporal gestacional (kg/m²); MCCS: *Melbourne Collaborative Cohort Study*; MESA: *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*; NHS: *Nurses' Health Study*; NS: não significativo; OB: obesidade; PC: peso corporal; PP: perda de peso; QFA: questionário de frequência alimentar; RR: risco relativo; SALSA: *San Antonio Longitudinal Study of Aging*; SAHS: San Antonio Heart Study; SB: sobrepeso; SM: síndrome metabólica; WHI: *Women's Health Initiative*; a: anos; m: mês; sem: semana; d: dia; S/N: sim ou não; vs: *versus*; (↑/↓): aumento ou diminuição.

Tabela 4 - Estudos clínicos que avaliaram o consumo de AAls e potenciais efeitos metabólicos adversos

Autor, ano	Design	Amostra	Idade (a)	Intervenção	Follow-up	Principais parâmetros	Fator comparativo	Principais desfechos
Rogers <i>et al.</i> , 1988 (112)	ECR	12 (8 ♀ e 4 ♂) saudáveis	19 - 25	Sobrecargas: 200ml Sacarina: 0,145g Aspartame: 0,162g Ace-k: 0,24g Glicose: 50g Água 5 sessões com intervalos semanais	3h	Desacoplamento calórico-sensorial: avaliação hedônica do apetite com escalas visuais analógicas (2-60min após) e ingestão kcal posterior (3h após)	Água e Glicose	AAIs: em relação à água, promovem alteração do apetite (fome residual e desejo de comer), principalmente o aspartame (efeito do sabor doce) Ingestão kcal posterior compensatória: Glicose < Água, AAls = Água
Reid <i>et al.</i> , 2007 (90)	ECR	113 ♀ eutróficas	20 - 55	Aspartame ou sacarose (refrigerante)	5 sem (1+4)	recordatório alimentar + antropometria	em relação ao basal entre grupos	Em relação ao basal: Sacarose: PC =, ↑ Kcal ($p > 0,001$) Aspartame: ↑ PP, ↓ Kcal ($p > 0,05$) Entre grupos: NS, compensação calórica com sacarose
Reid <i>et al.</i> , 2010 (91)	ECR	53 ♀ SB/OB	20 - 55	Aspartame ou sacarose (refrigerante)	5 sem (1+4)	recordatório alimentar + antropometria	entre grupos, pré e pós	Bebidas adoçadas com aspartame não promoveram significativa PP em relação a sacarose, nem diminuição da ingestão calórica
Maersk <i>et al.</i> , 2012	ECR crossover	24 ♂ ♀ OB	20 - 50	Refrigerante regular (sacarose) Refrigerante diet (aspartame ^c) Leite semidesnatado Água 4d de testes (500ml/d) + 2 sem de washout	4d	Avaliação hedônica do apetite (saciedade, fome, plenitude e consumo prospectivo), glicemia, insulina, grelina GLP-1 e GIP ingestão kcal	entre tratamentos (>/=<)	Apetite score: (aspartame = água) ≠ (leite ≠ sacarose) Glicemia e insulina: (aspartame = água) < (leite = sacarose) GLP-1 e GIP: (aspartame = água) < (sacarose < leite) Grelina: aspartame = (leite = sacarose < água) Ingestão kcal total (aspartame = água) < (leite = sacarose)
Frankenfeld <i>et al.</i> , 2015 (113)	transversal	31 indivíduos saudáveis	≥ 18	Ace-K ^c : 1,7 - 33,2 mg/d Aspartame ^c : 5,3 - 112 mg/d	4d	recordatório alimentar (4 dias) + análise fecal (5º dia)	consumidores vs não-consumidores	Diversidade bacteriana ≠ Aspartame ($p < 0,001$) Acessulfame-K ($p = 0,03$) Genes previstos e abundância bacteriana: NS

Tabela 4 - Continuação

Autor, ano	Design	Amostra	Idade (a)	Intervenção	Follow-up	Principais parâmetros	Fator comparativo	Principais desfechos
Higgins <i>et al.</i> , 2018 (114)	ECR	100 ♂ ♀ saudáveis com IMC normal	18 -60	Aspartame: refrigerante <i>diet</i> e cápsulas dose aspartame + glicose: (a) 0+20, (b) 5+20 ou (c) 15+40 mg/kg/d	12 sem	PC, CC, composição corporal, apetite, GJ, HbA1c, insulina, leptina, GLP-1, GIP	entre tratamentos	NS
Madjd <i>et al.</i> , 2015 (115)	ECR	62 ♀ SB/OB	18 - 50	substituição de BAAs por água durante um programa para PP com dieta hipocalórica (água: livre; BAAs: 250ml, 1x/d, <5/sem)	24 sem	PC, IMC, CC, perfil lipídico, metabolismo da glicose, IA	substituição de BAAs por água	↑ PP ($p=0,015$) ↓ IMC ($p=0,002$) ↓ GPP(2h) ($p<0,001$) ↓ Insulina ($p<0,001$) ↓ HOMA-IR ($p<0,001$) ↓ ingestão kcal ($p=0,015$) ↓ ingestão CHO ($p=0,001$)
Madjd <i>et al.</i> , 2017 (116)	ECR	81 ♀ OB DM2	18 - 20	substituição de BAAs por água em um contexto de dieta hipocalórica	24 sem	PC, IMC, CC, perfil lipídico, metabolismo da glicose, IA	substituição de BAAs por água	↑ PP ($p=0,006$) ↓ IMC ($p=0,006$) ↓ GJ ($p=0,005$) ↓ GPP(2h) ($p=0,03$) ↓ Insulina ($p=0,01$) ↓ HOMA-IR ($p=0,003$) ↓ ingestão kcal ($p=0,005$) ↓ ingestão CHO ($p<0,001$)
Tey <i>et al.</i> , 2017 (117)	ECR crossover	30 ♂ saudáveis com IMC normal	20 - 50	sobrecarga com mesma intensidade de sabor: Aspartame: 0,44g Monk fruit: 0,63g Stevia: 0,33g Sacarose: 0,65g 1 triagem + 4 testes com hiato de 5d	~24h cada teste	av hedônica, sensorial, apetite, ingestão calórica, AUC ₀₋₁₈₀ : insulina e glicemia	sacarose	todos AAls: após sobrecarga (0-1h): ↑ desejo de comer, ↑ fome, ↑ consumo prospectivo, ↓ plenitude ↑ ingestão kcal 1h após ($p=0,01$) compensação kcal no dia ($p=0,83$) = insulina ($p=0,96$) = glicemia ($p=0,32$)
Casperson <i>et al.</i> , 2017 (118)	ECR crossover	21 ♂ e ♀ saudáveis	24 ± 6	bebidas adoçadas com açúcar ou AAI (sucralose) após: refeição padrão doce ou salgada	2 testes (4h) com intervalo de 7d	Parâmetros hedônicos, fome, saciedade, preferência e consumo calórico	entre tratamentos	AAls aumento a preferência por alimentos doces

Tabela 4 - Continuação

Autor, ano	Design	Amostra	Idade (a)	Intervenção	Follow-up	Principais parâmetros	Fator comparativo	Principais desfechos
Madjd <i>et al.</i> , 2018 (119)	ECR	71 ♀ SB/OB	18 - 50	substituição de BAAs por água durante um programa de manutenção de peso após PP (água: livre; BAAs: 250ml, 1x/d, <5/sem)	53 sem	PC, IMC, CC, perfil lipídico, metabolismo da glicose, IA	substituição de BAAs por água	<p>↑ PP ($p=0,001$)</p> <p>↓ IMC ($p=0,003$)</p> <p>↓ GPJ ($p=0,02$)</p> <p>↓ GPP(2h) ($p<0,001$)</p> <p>↓ Insulina ($p<0,002$)</p> <p>↓ HOMA-IR ($p<0,01$)</p> <p>↓ ingestão kcal ($p=0,001$)</p> <p>↓ ingestão CHO ($p<0,001$)</p>
Crézé <i>et al.</i> , 2018 (120)	ECR	18 ♂ saudáveis	-	sobrecargas: Água Sacarose AAI (<i>blend</i> : ciclamato, asseculfame K e aspartame)	5h	<p>marcadores neurofisiológicos e fisiológicos de saciedade (IRMf)</p> <p>ECG: em jejum (basal) e 45min pós sobrecarga</p> <p>plasma: pré-60-0min e pós0-210min</p> <p>IA espontânea 4h pós sobrecarga (kcal)</p>	parâmetros basais (↑/↓) e entre tratamentos (>/<)	<p>AAI ↑ VLPFC: AAI > água e sacarose</p> <p>Insula: AAI < água e sacarose</p> <p>DLPFC: AAI > água e = sacarose</p> <p>MTG: AAI > sacarose e = água</p> <p>glicose e insulina: AAI e água < Sacarose</p> <p>grelina, IA espontânea e taxas de fome: AAI e água > Sacarose</p> <p>AAI: ↑ ingestão kcal compensatória, desacoplamento calórico-gustativo</p>
Higgins <i>et al.</i> , 2019 (89)	ECR	154 ♂ ♀ SB/OB	18 - 60	<p>Aspartame: 0,58g/L</p> <p>Sacarina: 0,73g/L</p> <p>Sucralose: 0,16g/L</p> <p>RebA (steviol): 0,66g/L</p> <p>Sacarose: 80g/L</p> <p>(soluções: ~19ml/kg/d, < ADI, mesma intensidade de dulçor)</p> <p>5d testes basais + 12 sem de intervenção</p>	12 sem	antropometria, composição corporal (DEXA), ingestão kcal, gasto energético, apetite e tolerância à glicose	parâmetros basais (↑/↓) e entre tratamentos (>/<)	<p>ΔPC_{0-12}: ↑ sacarina (+1,18kg) e ↑ sacarose (+1,85kg), $p=0,02$</p> <p>ΔMG: sacarose > demais, sucralose < sacarina e aspartame</p> <p>Ingestão kcal: ↑ sacarose, ↓ sucralose, sacarina > sucralose</p> <p>FA: sacarose > AAI e sacarina > sucralose ($p=0,045$)</p> <p>TOTG: NS entre grupos, mas todos ↑ em relação à semana basal ($p=0,02$)</p>

Tabela 4 - Continuação

Autor, ano	Design	Amostra	Idade (a)	Intervenção	Follow-up	Principais parâmetros	Fator comparativo	Principais desfechos
Dalenberg et al., 2020 (51)	ECR duplo-cego	45 ♂ ♀ saudáveis	20 - 45	Sobrecargas com 335ml com mesma intensidade de dulçor: (1) Sucralose: 0,06g (0 kcal, estímulo não acoplado) (2) Sacarose: 30,38g (120 kcal, estímulo acoplado) (3) Controle: 0,06g de sucralose + 31,83g de maltodextrina (carboidrato não-doce, 120 kcal, estímulo acoplado)	2 sem	Desacoplamento calórico-sensorial: OGTTs (ou coleta única de sangue), TOTG, testes sensoriais e neuroimagem (IRMf) foram realizados antes e depois das sobrecargas	entre grupos, pré e pós	Sucralose na presença de um carboidrato: prejudica rapidamente o metabolismo da glicose e resulta em decréscimos de longo prazo no cérebro, mas não na sensibilidade perceptiva ao sabor doce Sugere uma desregulação do controle intestino-cérebro no metabolismo da glicose
Yunker et al, 2021 (121)	ECR crossover	74 ♂ ♀ IMC: 19,18 - 40,27	18 - 35	Sobrecargas (300ml): Sucralose (1,5, 2 ou 3 mM); Sacarose (75g) ou Água Reatividade neural por IRM após dicas visuais de alimentos (0 e 20min após sobrecarga) Coleta de sangue seriada (0-120 min) Refeição <i>ad-lib</i> após 125 min	2 - 3h cada dia de teste	(a) sexo, IMC, PO ₂ , respostas alimentares e endócrinas (glicemia, insulina, GLP-1, grelina, PYY e leptina) (b) respostas neurais, endócrinas e alimentares (c) apetite	(a) Sucralose vs Sacarose (b) Sucralose ou Sacarose vs Água (c) Sucralose vs Sacarose vs Água	↑ consumo kcal subsequente em ♀ e OB: Sucralose > Sacarose IRMf: ♀ e OB mais sensíveis à responsividade neural díspar induzida pela Sucralose vs Sacarose (áreas pré-frontais relacionadas à recompensa) Respostas endócrinas: (Sucralose = Água) ≠ Sacarose

Tabela 4 - Continuação

Autor, ano	Design	Amostra	Idade (a)	Intervenção	Follow-up	Principais parâmetros	Fator comparativo	Principais desfechos
Suez <i>et al.</i> , 2022 (95)	ECR	120 saudáveis (65% ♀)	18 - 70	Controle Glicose (veículo) Sacarina Sucralose Aspartame Stévia	28d	Antropometria, TOTG, consumo e atividade, testes sanguíneos, metabólica (plasma, oral e fecal) Transplante do microbiana fecal de humanos tratados com AAls em camundongos <i>ger-free</i>	em relação aos parâmetros basais e entre tratamentos	Sacarina e Sucralose: prejudica a resposta glicêmica AAls alteram o microbioma (oral e fecal) e metaboloma (plasmático) Relação causal e individualizada entre microbioma e resposta glicêmica: transplante fecal de microbiomas humanos alterados por AAls promove intolerância à glicose em camundongos receptores, não consumidores de AAls

AAI: adoçante de alta intensidade; BAA: bebidas adoçadas artificialmente; ^c: versão comercial; ^{pa}: para análise (grau de pureza >95%); SB: sobrepeso; OB: obesidade; PC: peso corporal; CC: circunferência da cintura; PP: perda de peso; IMC: índice de massa corporal (kg/m²); ECR: ensaio clínico randomizado; CHO: carboidrato; IA: ingestão alimentar; TOTG: teste oral de tolerância à glicose; HbA1c: hemoglobina glicada; GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon 1; GIP: peptídeo inibidor gástrico; GJ: glicose de jejum; HbA1c: hemoglobina glicada; FA: frequência alimentar; MG: massa gorda; NS: não significativo; IRMf: imagens de ressonância magnética funcional; DEXA: *dual-energy X-ray absorptiometry*; ECG: eletroencefalografia; VLPFC: córtex pré-frontal ventrolateral; DLPFC: córtex pré-frontal dorsolateral; TOTG: teste oral de tolerância à glicose; PYY: peptídeo YY; vs: *versus*; (↑/↓): aumento ou diminuição; (>/<): comparações entre grupos.

Tabela 5 - Estudos experimentais que avaliaram o consumo de AAIs e potenciais efeitos metabólicos adversos

Autor, ano	Amostra	Intervenção	Follow-up	Principais parâmetros	Fator comparativo	Principais desfechos
Swithers <i>et al.</i> , 2012 (122)	38 ratos ♂	Glicose (20%) Sacarina (0,3%) veículo: iogurte 30ml/d + HFD (teste)	14d ou 24d (com HFD)	PC, composição corporal, glicemia, insulina, ingestão alimentar, GLP-1	entre grupos	Sacarina alterou a liberação de GLP-1, afetando a homeostase da glicose e o BE
Feijó <i>et al.</i> , 2013 (28)	30 ratos (10/grupo)	Controle: sacarose (20%) Sacarina ^c (0,3%) Aspartame ^c (0,4%) veículo: iogurte 20ml/d	12 sem	GPC, consumo calórico	Controle adoçado com sacarose	↑ GPC: Sacarina ↑ 28% ($p=0,003$) e Aspartame ↑ 20% ($p=0,004$) consumo calórico total: NS (compensação calórica)
Suez <i>et al.</i> , 2014 (16)	4-20/grupo camundongos (6 <i>germ-free</i>)	Sacarina ^c : 0,5% e 5mg/kg Aspartame ^c : 0,4% Sucralose ^c : 0,5%	11 sem	TOTG culturas in vitro de fezes	controles: Glicose: 10% Sacarose: 10%	Sacarina: medeia a intolerância à glicose por meio de alterações na MI (transplante fecal) ↓ firmicutes/bacteroidetes Aspartame: nenhuma mudança na MI
Mitsutomi, <i>et al.</i> , 2014 (123)	camundongos ♂ obesos (5/grupo)	Controle (água) Sacarose (33%) AAI ^c (99% erythritol + 1% aspartame)	4 sem (HFD) + 4 sem (intervenção)	GPC, consumo alimentar, glicose, insulina, TG, UCPs, gasto energético, (TAB, TAM)	comparações múltiplas entre grupos	AAI vs Controle: ↑ adiposidade, ↑ hiperinsulinemia, ↑ leptina, ↑ TG, ↓ UCP1 (no TAM) e ↓ consumo de O ₂ na fase escura ($p<0,05$) AAI vs sacarose: ↓ hiperglicemia PC, consumo alimentar: NS
Foletto <i>et al.</i> , 2016 (30)	16 ratos (8/grupo)	Controle (iogurte) Sacarina ^c (0,3%) veículo: iogurte 20ml/d	14 sem	GPC, consumo calórico, PYY, leptina, glicose, insulina e HOMA, adiposidade	Controle	↑ GPC ($p=0,027$) consumo calórico total, adiposidade, PYY, leptina, glicose, insulina e HOMA: NS
Pinto <i>et al.</i> , 2017 (27)	16 ratos (10-12/grupo)	Controle: sacarose (20%) Sacarina ^c (0,3%) veículo: iogurte 20ml/d	17 sem	GPC, consumo calórico, GE (calorimetria indireta): basal, 5 sem e 12 sem	Controle adoçado com sacarose	↑ GPC ($p=0,038$) e ↑ Δ PC ($p=0,03$) consumo calórico total: NS (compensação calórica) GE _{12 sem} : Sacarina < Sacarose ($p=0,009$)

Tabela 5 - Continuação

Autor, ano	Amostra	Intervenção	Follow-up	Principais parâmetros	Fator comparativo	Principais desfechos
Bissonnette et al., 2017 (124)	40 ratos Wistar ♂ (10/grupo)	Controle Sacarose (15%) Sacarina (0,2%) Stevia (0,1%)	6 sem	Fase 1: preferência de concentrações Fase 2: preferência por versões doces ou não Fase 3: GPC, consumo alimentar (kcal e g) Fase 4: alternância de dietas	AAIs vs Sacarose ou Controle	Fase 3 → consumo calórico: Sacarose < (AAIs = Controle) GPC: (AAIs = Controle) > Sacarose Fase 4 → Sacarina: ↑ consumo calórico na transição para Controle. Exposição prévia à sacarina, causa incapacidade em autorregular calorias
Barrios-Correa et al., (2018) (125)	72 camundongos (9 ♂ + 9 ♀ por grupo)	<i>ad-lib</i> : Controle ^c (água) Stevia ^c (2,5%) Sucralose ^c (1,2%) Sacarose ^c (10%)	6 sem	PC, adiposidade, consumo calórico, sexo, parâmetros cerebrais relacionados ao controle do apetite e BE (pJAK2 e pSTAT3)	Controle	Stevia: ↓ PC, ↓ adiposidade, ↓ consumo calórico e ↓ pJAK2/pSTAT3 em ♂ Sucralose: ↑ PC e ↑ pJAK2 em ♀ Geral: AAIs alteram vias cerebrais de sinalização do apetite e BE
Zhao et al., 2018 (126)	ratos (24 ♂ + 24 ♀) 4 grupos de 12	Controle: água Sacarina (0,005 M/L)	10 sem	GPC, ingestão alimentar (g ou kcal), grelina sérica, hipotálamo (AgRP, NPY e POMC mRNA) e língua (TIR3/2 e GHS-R mRNA)	Controle	GPC: ♂ ≠ ♀ (Sacarina > Controle em ♂) ingestão alimentar: Sacarina > Controle em ♂ GHS-R e TIR3 mRNA: Sacarina > Controle em ♂ Grelina: Sacarina < Controle em ♂ e ♀
Azeez et al., 2019 (127)	60 ratos ♂	Controle: água Sacarina: 2,5, 5, e 10 mg/kg	120d	PC amostras de sangue (proteína total albumina glicose perfil lipídico, ALT, AST, LDH, creatinina e ácido úrico), fígado e cérebro	Controle	em todas as doses: Sacarina: piora função renal e hepática, glicemia, ↑ estresse oxidativo hepático
Nettleton et al., 2020	15/grupo ratas grávidas + 150 prole + 10/grupo camundongos <i>germ-free</i>	HFD + Controle (sacarose) Stevia (2-3 mgkg//d) Aspartame: (5-7 mgkg//d)	18 sem (prole)	adiposidade, PC, TOTG, MI em ratas obesas e seus descendentes, genes do sistema mesolímbico transplante fecal em camundongos <i>germ-free</i>	Controle	ambos AAIs: ↑ adiposidade na prole ao desmame, altera MI em ratas e prole, altera sistema de recompensa mesolímbico que pode ↑ consumo alimentar. Aspartame: ↑ PC a longo-prazo, prejudica tolerância à glicose em ♂ da prole em 8 sem <i>germ-free</i> transplantados: prole com ↑ PC, ↑ adiposidade e ↓ tolerância à glicose (ambos AAIs)

Tabela 5 - Continuação

Autor, ano	Amostra	Intervenção	Follow-up	Principais parâmetros	Fator comparativo	Principais desfechos
Aoyama <i>et al.</i> , 2020 (128)	14 ratos Wistar ♂ (7/grupo)	Controle: iogurte puro (veículo) Sacarina (+ iogurte) 5d pré e pós testes com sacarose	6d + 3 sem + 6d	teste de reatividade à sacarose após abstinência (pressão de alavanca), GPC e consumo de ração	entre grupos entre testes pré e pós de reatividade à sacarose teste final de consumo	ambos ↑ desejo por sacarose após intervenção ($p < 0,001$) Sacarina não atenuou desejo por Sacarose ($p = 0,49$) Sacarina > Controle: GPC ($p = 0,01$) e consumo de ração entre grupos ($p = 0,03$)
Farid <i>et al.</i> , 2020 (96)	80 camundongos (50% ♂ ♀)	Água: controle/veículo Sacarose ^c : 40,5 mg/ml Sucralose ^c : 5,2 mg/ml Stevia ^c : 4,2 mg/ml Frequência: soluções ofertadas 5h/d	8 e 16 sem	PC, consumo alimentar, histopatologia hepática e renal, parâmetros bioquímicos, enzimáticos e imunológicos	comparações múltiplas (>/=<) versus Controle (↑/↓)	PC: NS preferência por AAls consumo de ração: ♂ Água > AAls > Sacarose; ♀ Água > (AAls = Sacarose) Stevia e Sucralose: ↓ hemoglobina, ↓ %HCT, ↓ hemácias e ↓ leucócitos 16 sem: ↑ enzimas hepáticas e renais Histopatologia: grave dano hepático e renal ↑ LPS, ↑ imunoglobulinas (IgG, IgE e IgA), ↑ citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e -8) e ↓ citocina anti-inflamatória (IL-10) Sacarose: ↑ ALT, ↑ AST e ↑ colesterol em ♂ ↑ IgA e ↓ IL-10

AAI: adoçante de alta intensidade; AgRP: *agouti-related protein*; ALT: alanina transaminas; AST: aspartato transaminase; BE: balanço energético; DEXA: *dual-energy X-ray absorptiometry*; GE: gasto energético; GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon 1; GPC: ganho de peso corporal; GHS-R: secretagogo do hormônio do crescimento; HCT: hematócrito; HFD: *high fat diet*; HOMA: *homeostasis model assessment*; Ig: imunoglobulina; IL: interleucina; LDH: lactato desidrogenase; LPS: lipopolissacarídeo; MI: microbiota intestinal; NPY: neuropeptídeo Y; NS: não significativo; PC: peso corporal; pJAK2 e pSTAT3: vias de sinalização; POMC: p ró-opiomelanocortina; PYY: peptídeo YY; TG: triglicerídeos; T1R2: *taste receptor, type 1, member 2*; T1R3: *taste receptor, type 1, member 3*; TAM: tecido adiposo marrom; TAB: tecido adiposo branco; TOTG: teste oral de tolerância à glicose; UCP1: *uncoupling protein 1*; S/N: sim ou não; sem: semana; d: dia; g: gramas; ^c: versão comercial; ^{pa}: para análise (grau de pureza >95%); vs: *versus*; (↑/↓): aumento ou diminuição; (>/=<): comparações entre grupos.

2.5. MECANISMOS ASSOCIATIVOS ENVOLVIDOS

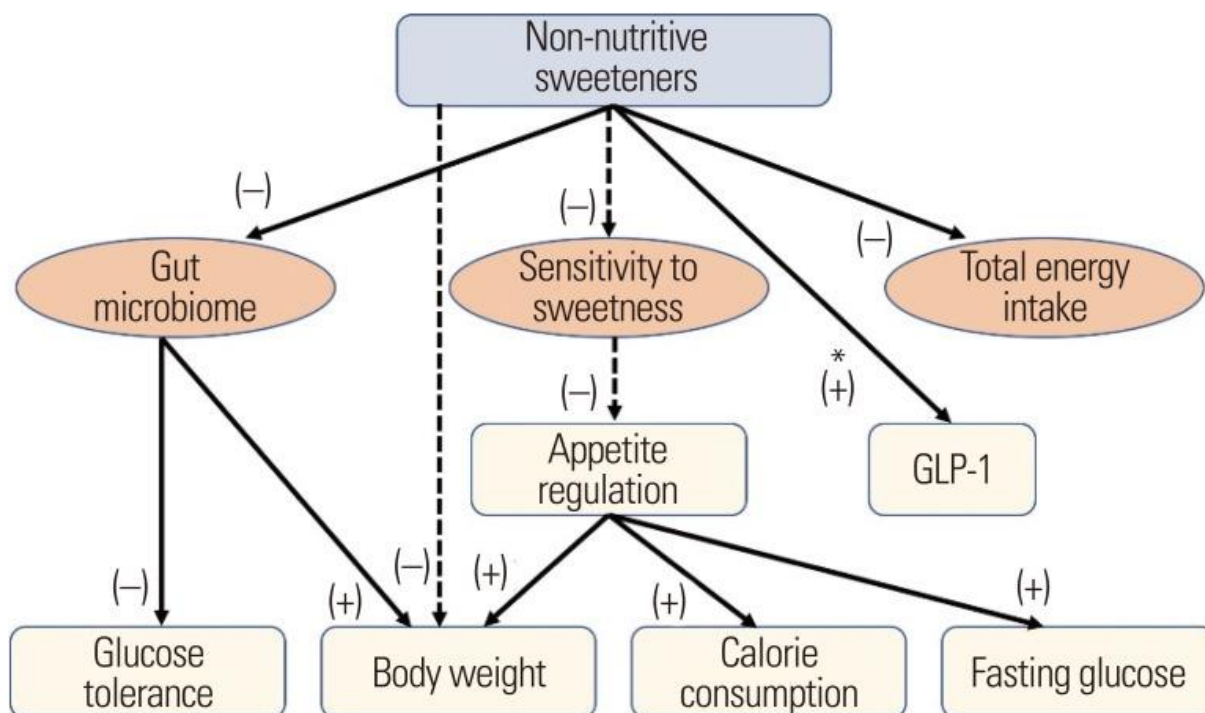
Diversos mecanismos fisiológicos e comportamentais têm sido propostos para elucidar a associação entre o consumo de AAls e eventos metabólicos adversos. Apesar dos primeiros estudos datarem praticamente quatro décadas (112, 129), a literatura atual ainda não expõe um consenso sobre quais mecanismos estariam envolvidos, sendo relatado inclusive, que estes seriam sinérgicos.

Sabe-se que os AAls não são compostos fisiologicamente inertes apenas pelo simples fato de não conter carboidratos e de não contribuir com acréscimo calórico. Seu consumo, como parte da ingestão alimentar, pode modular funções do BE e do metabolismo através de diversos mecanismos centrais e periféricos (85).

Estudos sugerem que AAls podem promover ganho de peso devido alterações metabólicas e neuroendócrinas (79, 130), que convergem para aumento da ingestão calórica (131, 132), aumento da preferência por alimentos doces ou devido desequilíbrio na microbiota intestinal (16, 85). Inclusive, o ganho de peso pode ser influenciado pelo tipo de AAI, pela quantidade utilizada, pela dinâmica do apetite, pelo BE (133), pela adiposidade e pelo sexo (121, 134).

Em resumo, três mecanismos potenciais (Figura 2), que não são mutuamente exclusivos, podem estar envolvidos na regulação do BE e no metabolismo da glicose: (1) AAls interferem na microbiota intestinal e induzindo a intolerância à glicose; (2) AAls interagem com receptores gustativos, os quais são expressos em diversos órgãos, que atuam na absorção de glicose e na secreção de insulina; e (3) AAls interferem nas respostas aprendidas à doçura, que afetam o metabolismo da glicose e a homeostase energética.

Figura 2 - Adoçantes de alta intensidade e mecanismos envolvidos



AAIs e mecanismos associados de acordo com evidências de ECRs. * efeito observado apenas com administração oral. Abreviações: GLP-1 peptídeo semelhante ao glucagon 1; (-) diminui; (+) aumenta; (- - -) alguma evidência; (—) forte evidência. Fonte: Walbolt *et al.*, 2020 (135).

Além disso, como os AAIs diferem entre si em termos de estrutura química, propriedades sensoriais, padrões de digestão, absorção e metabolismo (70), há de se considerar o potencial para desencadear diferentes respostas metabólicas, fisiológicas, sensoriais e comportamentais (136).

2.5.1. Ativação dos Receptores para o Sabor Doce

Independentemente de qualquer atividade metabólica que possa existir, todos AAIs são detectados por determinados receptores, sensíveis ao sabor. A detecção sensorial dos AAIs envolve os receptores T1Rs (*taste receptors, type 1*) e T2Rs (*taste receptors, type 2*) (83), ambos pertencentes ao tipo II de células receptoras de sabor (TCRs, do inglês) que expressam a família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) em sua superfície e respondem a estímulos de sabor doce, umami, amargo e kokumi – descrito mais recentemente (137). Os GPCRs são o maior e mais diverso

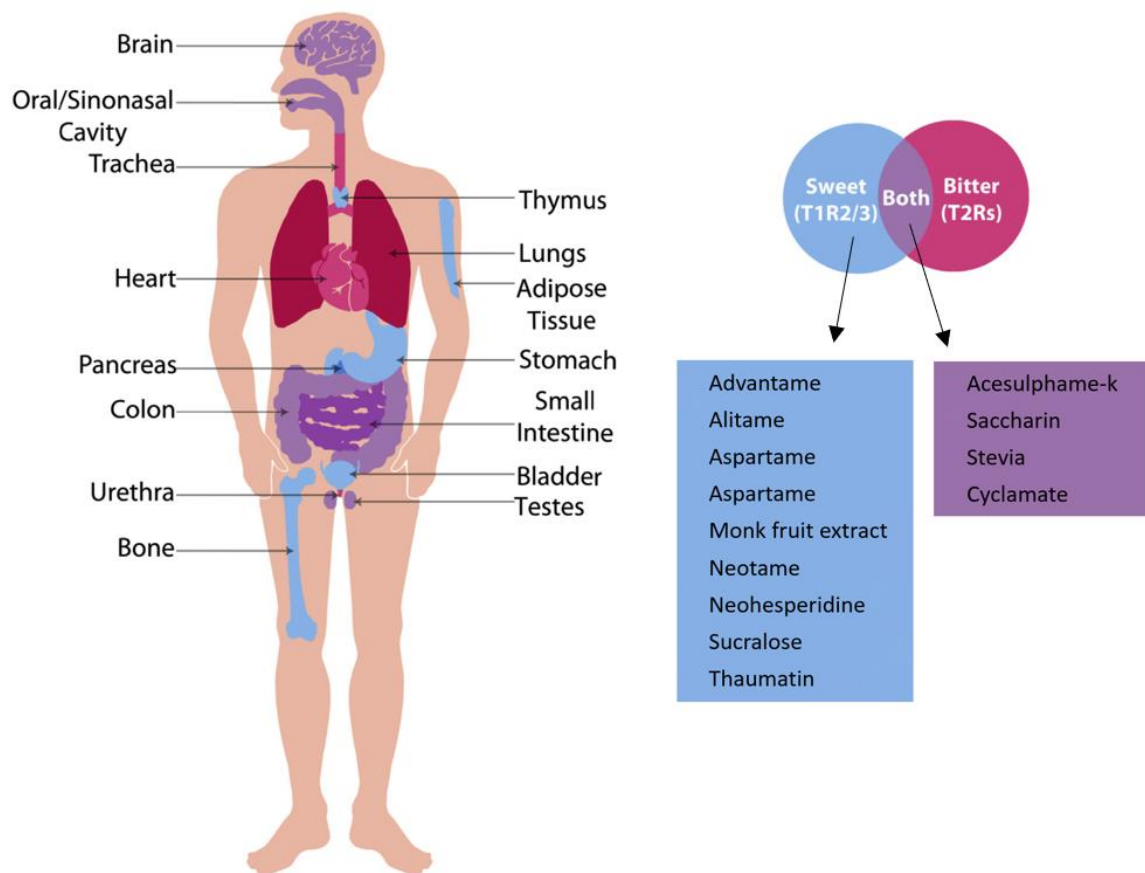
grupo receptores de membrana em eucariotos. Eles são ativados por uma grande variedade de ligantes na forma de energia luminosa que transmitem informações do ambiente externo para a célula a fim de mediar respostas funcionais correspondentes, como secreção, neurotransmissão, metabolismo, diferenciação celular, inflamação e respostas imunológicas (137).

Em humanos, os T1Rs abrangem três isoformas (T1R1, T1R2 e T1R3), enquanto os T2Rs consistem em 25 subtipos funcionalmente distintos (138). Substâncias doces são mediadas através de um heterodímero formado por duas unidades proteicas, o T1R2 (*taste receptor, type 1, member 2*) e o T1R3 (*taste receptor, type 1, member 3*). O heterodímero T1R1 e T1R3 detecta o sabor umami e a família T2Rs detecta sabores amargos (83), enquanto o sabor kokumi é mediado por outro GPCR, o receptor sensor de cálcio (CaSR, do inglês) (137). Os sabores salgados e azedos não são sinalizados por GPCRs, mas sim via ativação de canais iônicos específicos (139). Adicionalmente, o T1R3 pode formar um homodímero T1R2/T1R3 que também pode detectar monossacarídeos e dissacarídeos em altas concentrações, sugerindo alguma sobreposição neste sistema (140).

Receptores de sabor foram descritos inicialmente como receptores sensoriais localizados na língua, onde é expresso o paladar por meio das papilas gustativas (139). No entanto, GPCRs extra-orais foram recentemente identificados em diversos órgãos e tecidos (Figura 3), onde suas funções ainda não são amplamente conhecidas (141, 142).

Todos os AAls são detectados pelos receptores de sabor doce T1R2/T1R3, mas alguns podem interagir também, mesmo que em menor grau, com os receptores de sabor amargo (T2Rs) devido perfil de sabor residual (Figura 3) (83). Essa ativação é de modo dependente da concentração. Além dos AAls, uma ampla variedade de substâncias doces, incluindo açúcares de ocorrência natural (glicose, frutose, sacarose e maltose), D-aminoácidos (triptofano, fenilalanina e serina), proteínas (monelina, brazzeína e taumatina) e metabólitos vegetais (esteviosídeo) também se ligam aos receptores T1R2/T1R3 (140).

Figura 3 - Receptores de sabor ativados pelos adoçantes de alta intensidade e respectivos locais de expressão



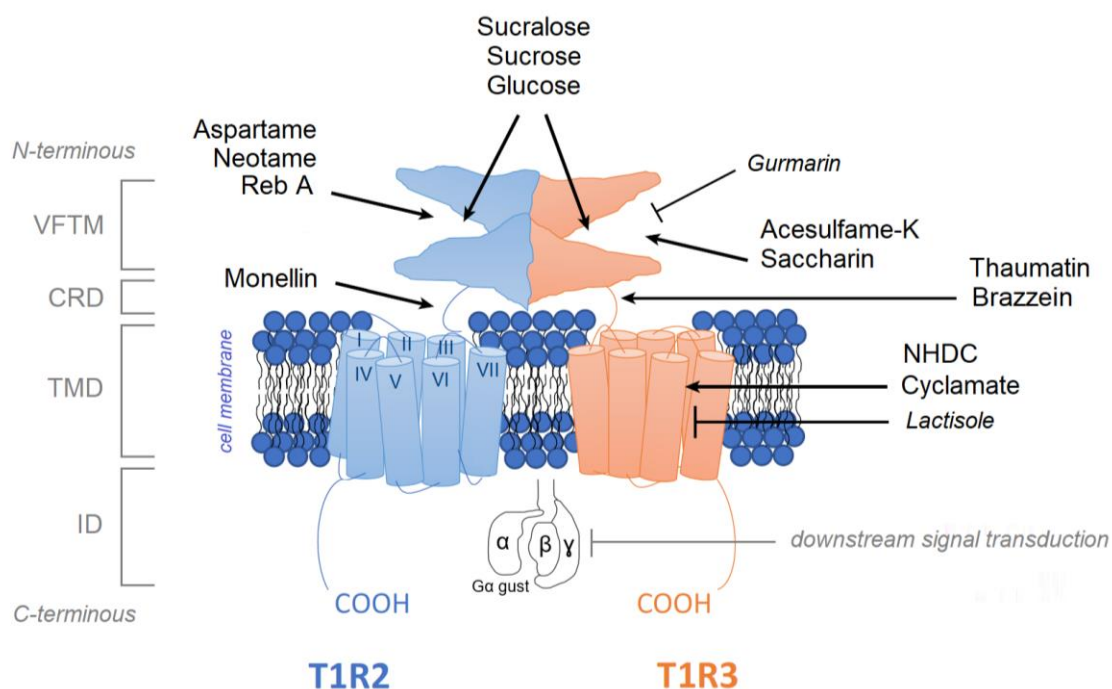
Expressão oral e extra-oral de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) envolvidos no sabor doce, amargo ou ambos. Adoçantes de alta intensidade (AAIs) ativam o heterodímero T1R2/T1R3 (*taste receptor, type 1, member 2/3*) de sabor doce, entretanto, alguns ativam concomitantemente, e em menor grau, receptores de sabor amargo T2Rs (*taste receptor, type 2*). Fonte: adaptado de Turner *et al.*, 2020 (83) e Freund *et al.*, 2018 (141).

Os receptores para o sabor doce, T1R2/T1R3, foram identificados em 2001 por três grupos de pesquisa independentes (143-145). O heterodímero T1R2/T1R3 pertence à classe C dos GPCR, que inclui o glutamato metabotrópico (mGluR), o receptor sensor de cálcio (CaSR) e o ácido gama-aminobutírico B (GABA_B) – cujos são homodímeros. Os receptores de classe C seguem a topologia canônica dos GPCRs, constituída por um grande domínio amino-terminal extracelular, um domínio transmembranar de sete hélices (TMD7) conectado por alças intra e extracelulares alternadas e um domínio citoplasmático carboxi-terminal. Diferente do demais GPCRs, os da classe C são caracterizados pelo domínio transmembranar *flytrap* de vênus (VFTM) no N-terminal e um curto domínio de ligação rico em cisteína (CRD)

que atua como um ligante para o TMD7 (Figura 4) (146) (exceto no caso do receptor GABA_B).

Diferentes estruturas químicas dos AAs e de outras substâncias doces ocasionam ligação em diversos e específicos sítios de quimiorrecepção do T1R2/T1R3. O sítio de ligação dos AAs geralmente ocorre no domínio VFTM. O aspartame, o neotame e a stevia predominantemente se ligam à subunidade T1R2, enquanto o acesulfame-K e sacarina se ligam à subunidade T1R3. A sucralose, assim como a sacarose e a glicose, compartilha do mesmo sítio de ligação em ambas as subunidades (86). O ciclamato e a NHDC, diferente dos demais, se ligam ao domínio TMD do T1R3, enquanto proteínas doces se ligam ao CRD (Figura 4).

Figura 4 - Representação diagramática da estrutura do heterodímero T1R2/T1R3 e múltiplos sítios de ligação para diferentes substâncias doces



O receptor de sabor doce é um heterodímero composto por dois protômeros não covalentes, o T1R2 (*taste receptor, type 1, member 2*) e o T1R3 (*taste receptor, type 1, member 3*), pertencentes à família C dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs), que são caracterizados por um grande domínio extracelular. Este domínio consiste no módulo *flytrap* de vênus (VFTM) no N-terminal e um domínio rico em cisteína (CRD), que interliga o VFTM a um domínio transmembrana heptaélice (TMD7) e um domínio intracelular (ID) carboxi-terminal (COOH). Sítios de ativação dinâmica de compostos de sabor doce estruturalmente diversos no receptor de sabor doce são indicados com setas. A gurmarina (ou ácido gimnêmico) e lactisol (e seu derivado estrutural 2,4-DP) são moduladores alostéricos negativos (MANs) do sabor doce que se liga a diferentes epítomos da subunidade T1R3. Abreviações: NHDC: neoesperidina dihidrocalcona; COOH: ácido carboxílico. Fonte: adaptado de Rother *et al.*, 2018 (86), Servant *et al.*, 2020 (147), Yang *et al.*, 2021 (146).

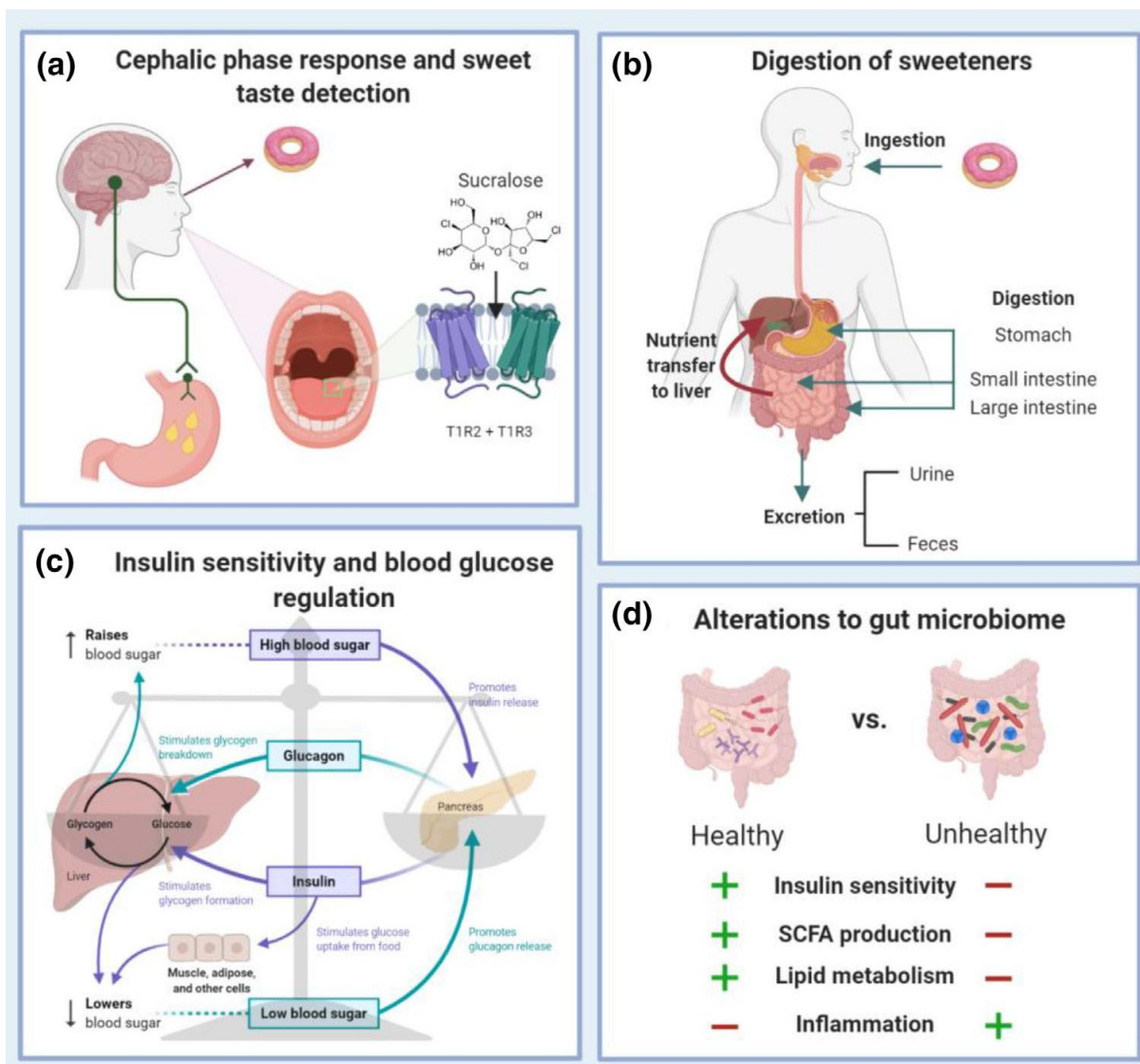
A ligação dos adoçantes ao receptor T1R2/T1R3 induz ao fechamento dos dois lobos do VFTM e em seguida ocasionam rearranjos conformacionais acoplados do CRD, TMD e ID (domínio intracelular, do inglês) que simultaneamente altera o receptor para o estado ativo. A mudança na conformação do T1R2/T1R3 desencadeia uma cascata intracelular de sinalização a jusante, e a sinalização intracelular induzida pela estimulação desses dímeros receptores é mediada pela proteína G (α -gustducin, G β 3 e γ 13), (Figura 4). Deste modo, a ativação do receptor mediada pelo ligante é o primeiro passo para a percepção do sabor doce. Essa interação não é apenas essencial para a compreensão estrutural e funcional do receptor T1R2/T1R3, mas também significativa para o design racional baseado na estrutura ou modificação ocasionada por diversos adoçantes (146).

As múltiplas funções quimiossensoriais dos T1R2/T1R3 envolve diversos órgãos e tecidos que ainda não estão amplamente elucidadas (141). Até o momento, sabe-se que eles estão envolvidos na detecção de nutrientes, modulação do apetite, homeostase da glicose, motilidade intestinal (83), armazenamento de energia, bem como o desencadeamento de respostas metabólicas e comportamentais a fim de manter a homeostase do BE (148).

Estudos clínicos e experimentais verificaram que os todos os AAls (mesmos os não metabolizáveis e absorvíveis, como a sacarina) se ligam aos receptores para o sabor doce e aumentam a absorção intestinal de glicose (21, 23-25, 149), via GLUT2 (26) e por aumento da expressão do transportador de glicose sódio-dependente 1 (SGLT1) (150-152). Já, os receptores T1R2/T1R3 presentes no pâncreas, regulam a secreção de insulina (18, 153-155). No intestino, controlam a liberação de hormônios peptídicos como peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1), peptídeo YY (PYY), colecistocinina (CCK), neuropeptídeo Y (128, 133–139). Recentemente, foi demonstrado que os AAls, como sucralose, aspartame e sacarina exercem uma série de efeitos negativos na integridade do epitélio intestinal através do receptor de sabor doce T1R3 – o qual é um modulador na integridade epitelial (156). A administração de sucralose, independente do estímulo sensorial oral, aumenta o consumo alimentar através da estimulação direta dos receptores T1R2/T1R3 e também pela estimulação indireta dos mecanismos neuronais relacionados (157). Além disso, a condição nutricional e metabólica individual influencia nos níveis de expressão do T1R3 nas ilhotas pancreáticas (154).

A seguir, abordamos em um modelo esquemático de diversas formas não excludentes de como os AAls interferem no metabolismo via ativação de receptores para o sabor doce (Figura 5), que convergem para o ganho e resistência à insulina.

Figura 5 - Detecção e metabolismo dos adoçantes



(a) A resposta da fase cefálica é desencadeada pelos sentidos (incluindo sabor) em antecipação à alimentação. O sabor doce é detectado já na cavidade oral, ao se ligar ao heterodímero T1R2/T1R3. (b) O processo digestório consiste na ingestão, decomposição mecânica e química dos alimentos, absorção de nutrientes e excreção. (c) Os estímulos doces podem provocar liberação exacerbada de insulina pelo pâncreas, que por sua vez aumenta a captação de glicose (principalmente) nas células adiposas e musculares, e reduz a síntese de glicose hepática, desempenhando um papel fundamental na homeostase da glicose com equilíbrio mantido entre o fígado e o pâncreas via glucagon, desencadeando assim a quebra de glicogênio quando a glicemia está baixa. (d) Os AAls podem alterar a microbiota intestinal (MI) e incitar diversas respostas, como: alterações metabólicas que afetam a sensibilidade à insulina, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), metabolismo lipídico e inflamação. Uma MI saudável apresenta um equilíbrio entre bactérias benéficas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Escherichia coli*), enquanto que do contrário, demonstra um desequilíbrio com aumento de inflamação e de bactérias patogênicas (*Campylobacter* e *Clostridium difficile*). Fonte: Mora e Dando, 2021 (158).

2.5.2. Percepção do Sensorial e Comportamento Alimentar

As características sensoriais são um determinante na decisão da ingestão alimentar, permitem reconhecer e distinguir componentes dietéticos relacionados às propriedades funcionais dos alimentos, responsáveis por predizer o valor nutritivo e prevenir a ingestão de substâncias tóxicas. Sabores ácidos e amargos alertam contra a ingestão de substâncias químicas, potencialmente nocivas e/ou venenosas, substâncias salgadas garantem o equilíbrio nutricional de eletrólitos, o umami permite a identificação de aminoácidos, e o sabor doce sinaliza a presença de carboidratos, uma importante fonte energética. Além das propriedades químicas e nutricionais dos alimentos, o sabor tem a importância qualitativa em evocar sensações gustativas prazerosas (139), sendo um determinante no controle alimentar.

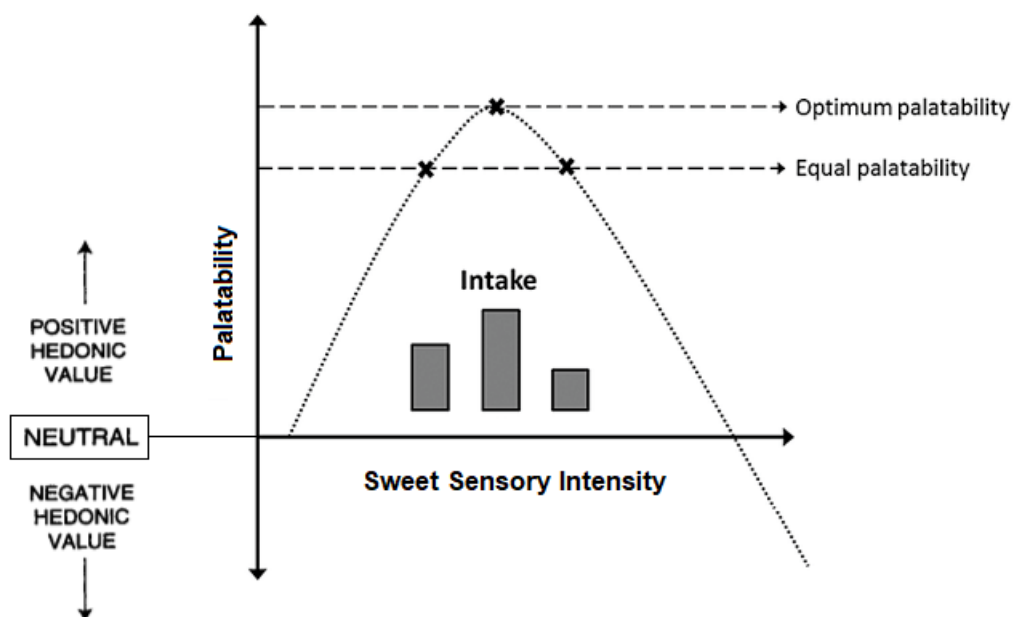
Do ponto de vista evolutivo, o sabor doce pode ter contribuído para a sobrevivência, porém o consumo excessivo de alimentos doces está atualmente relacionado ao aumento da ingestão energética e conseqüente ganho de peso.

Sendo assim, os AAls são frequentemente consumidos como substitutos do açúcar, para satisfazer o desejo por doçura. Espera-se que essa substituição implique na redução do peso corporal por meio da menor ingestão calórica. Contudo, AAls não conseguem alterar o comportamento alimentar por meio de circuitos neurais, vias sensoriais e diversos biomarcadores (81).

A seleção e o consumo de alimentos desempenham um papel crucial na regulação do apetite humano (44) e a experiência sensorial é um dos determinantes no controle da ingestão alimentar, frequentemente atribuída à resposta hedônica (159). Muitos estudos têm-se voltado para a dimensão hedônica do apetite devido à prevalência de obesidade e aumento da ingestão alimentar relacionada a hiperestimulação sensorial (142, 160, 161). Foi reportado, no trabalho de Kashima *et al.*, que a supressão da sensação doce oral pode reduzir abruptamente a ingestão de alimentos devido a hipoestimulação (162).

A Curva de Wundt demonstra que a doçura por si mesmo aumenta a palatabilidade de numerosos alimentos e bebidas, e estimula a ingestão alimentar (Figura 6) (159).

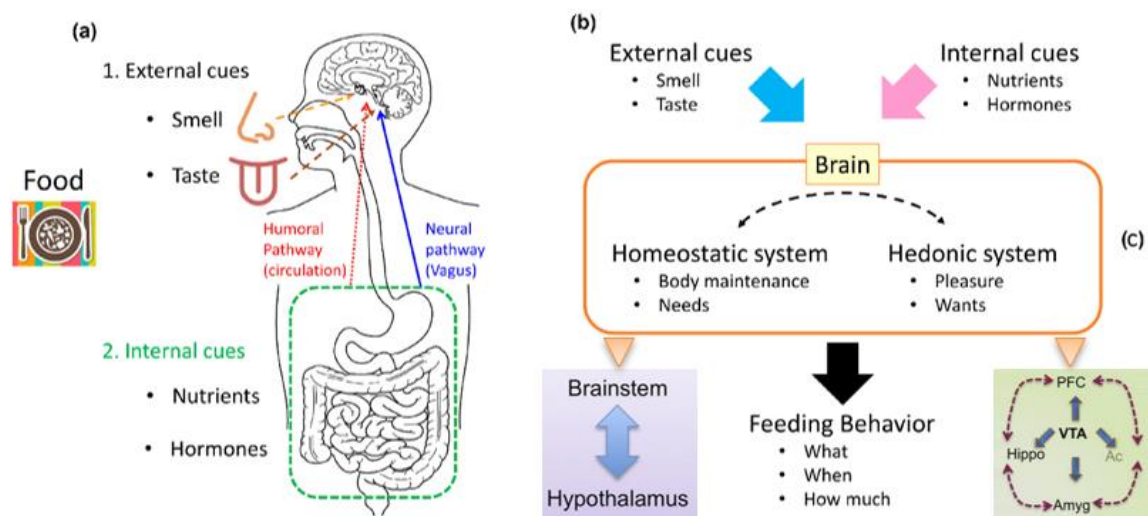
Figura 6 - Relação entre intensidade sensorial doce e palatabilidade na ingestão alimentar e no comportamento hedônico



Conforme a intensidade sensorial aumenta (por exemplo, intensidade do sabor em função da concentração do saborizante), a palatabilidade também aumenta até um ponto-ótimo, após, com o aumento progressivo da intensidade sensorial há um decréscimo da palatabilidade. Esta relação em forma de “u” invertido é conhecida como um Curva de Wundt. Fonte: adaptado de McCrickerd *et al.*, 2016 (159).

O comportamento alimentar é um complexo sistema que envolve a regulação do apetite, o controle da ingestão alimentar e mecanismos de recompensas. Ele incorpora a necessidade homeostática, o prazer hedônico e processos cognitivos superiores, como informações contextuais e aprendidas (experiência e motivação). No sistema nervoso central (SNC) os sistemas homeostático e hedônico processam informações transmitidas por sinais externos (como o cheiro e o sabor dos alimentos) e internos (estado metabólico, necessidades homeostáticas – como nutrientes e hormônios) (Figura 7) (163).

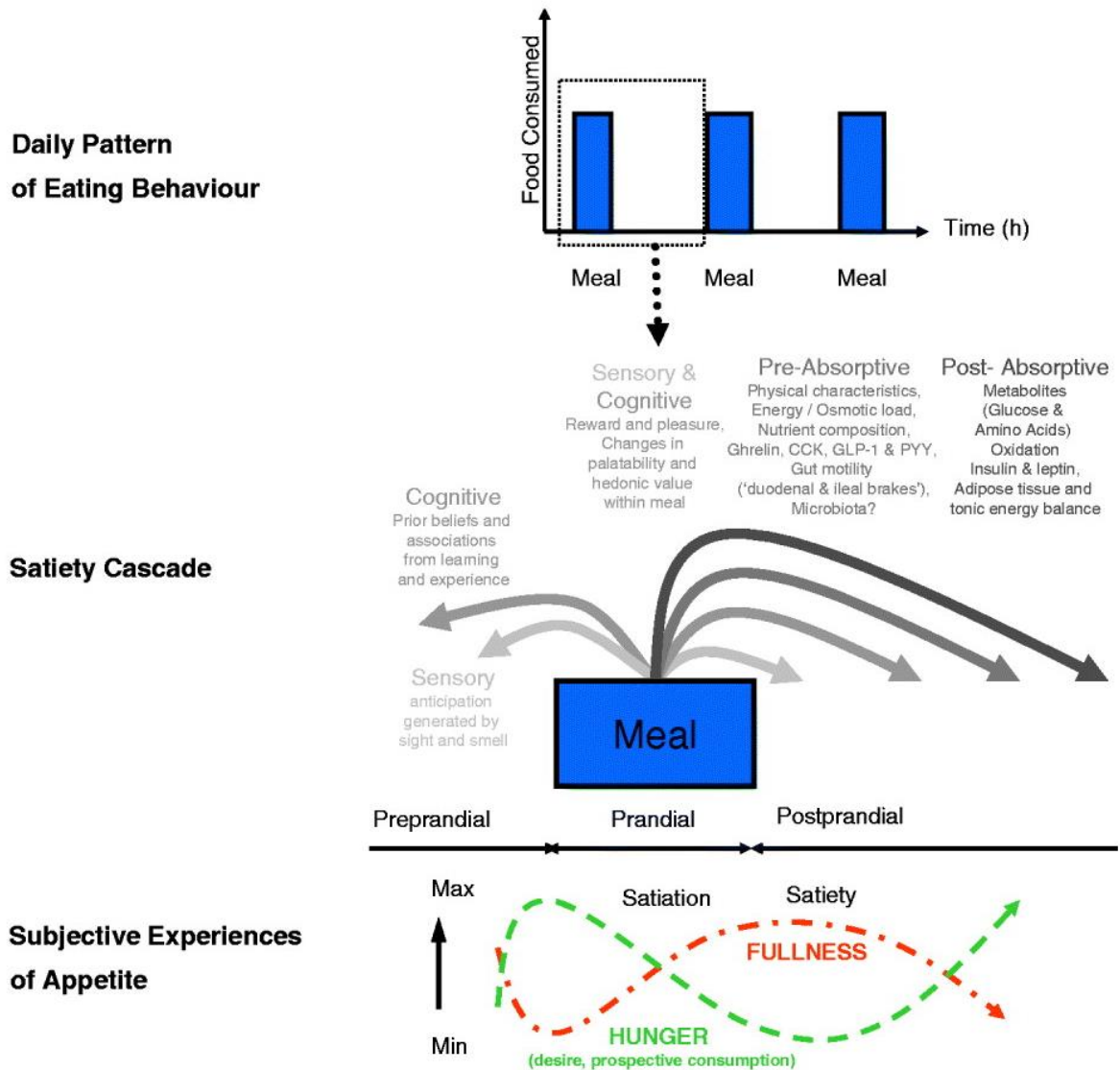
Figura 7 - Conceitos básicos na regulação comportamento alimentar



(a) Os tipos de pistas informativas transmitidas ao sistema nervoso central. (b) No cérebro, dois sistemas integram informações para regular o comportamento alimentar. (c) O sistema hedônico compreende principalmente o sistema mesocortico-límbico que inclui a área tegmental ventral (VTA), núcleo accumbens (Ac), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (Hippo) e amígdala (Amyg). Hormônios de compartimentos periféricos (como os do tecido adiposo, do trato gastrointestinal e adrenais) alcançam essas áreas direta ou indiretamente para ativar as vias que controlam o equilíbrio energético (homeostático) e o prazer (hedônico) associados à alimentação (desejo de comer, palatabilidade, experiências anteriores, motivação). Fonte: adaptado de Sasaki *et al.*, 2017(163).

Outra questão fundamental é identificar a ação da doçura *per se* a partir do conteúdo calórico associado. A descoberta dos receptores para o sabor doce T1R2 e T1R3 sugere que efeitos da doçura e do teor calórico podem ser dissociados fisiologicamente. A cascata de saciedade (Figura 8) indica como ambos fatores (doçura e conteúdo calórico) contribuem para o controle do apetite. Portanto, a fim de estudar a ação específica da doçura sobre o apetite, é importante considerar a distinção entre a estratégia aditiva e substitutiva (164).

Figura 8 - Cascata de saciedade



O impacto dos alimentos é frequentemente estudado usando a cascata da saciedade como estrutura conceitual. Diversos mecanismos que regulam a saciedade podem ser influenciados pelos alimentos. Características sensoriais, estrutura física, composição de macronutrientes e a densidade energética dos alimentos afetam a fisiologia, o metabolismo e processos do sistema nervoso central (SNC), que são importantes para a regulação energética. Sistemas psico-biológicos regulam o apetite a cada refeição, e fatores sensoriais e cognitivos determinam o comportamento alimentar. Fatores pré e pós-absorptivos (nutrientes e hormônios) também regulam o apetite. Por fim, a oxidação e o metabolismo dos nutrientes, assim como o armazenamento de energia, produzem potentes efeitos pós-absorptivos na regulação energética. Fonte: adaptado de Halford e Harrold, 2012 (165).

Casperson *et al.* (2017) (118), num ECR cruzado, comparou os efeitos de bebidas adoçadas com açúcar ou AAIs (sucralose) na regulação do apetite e na ingestão calórica por meio de um paradigma comportamental, no qual foi ofertado posteriormente uma refeição padrão doce ou salgada. A saciedade e o desejo de

comer alimentos com perfil gustativo específico foram avaliados antes e a cada 30 minutos pós-refeição por quatro horas. As classificações hedônicas não diferiram entre refeição padrão, doce ou salgada. O tipo de bebida não influenciou as medidas de saciedade, ou o desejo por comer alimentos com sabor específico. No entanto, indivíduos submetidos à bebida com AAls tiveram maior propensão em escolher a refeição posterior doce.

Estes resultados sugerem que os AAls interferem de algum modo na alteração do comportamento alimentar, concordando com a teoria da dissociação entre estímulo sensorial doce e a incompatível consequência calórica.

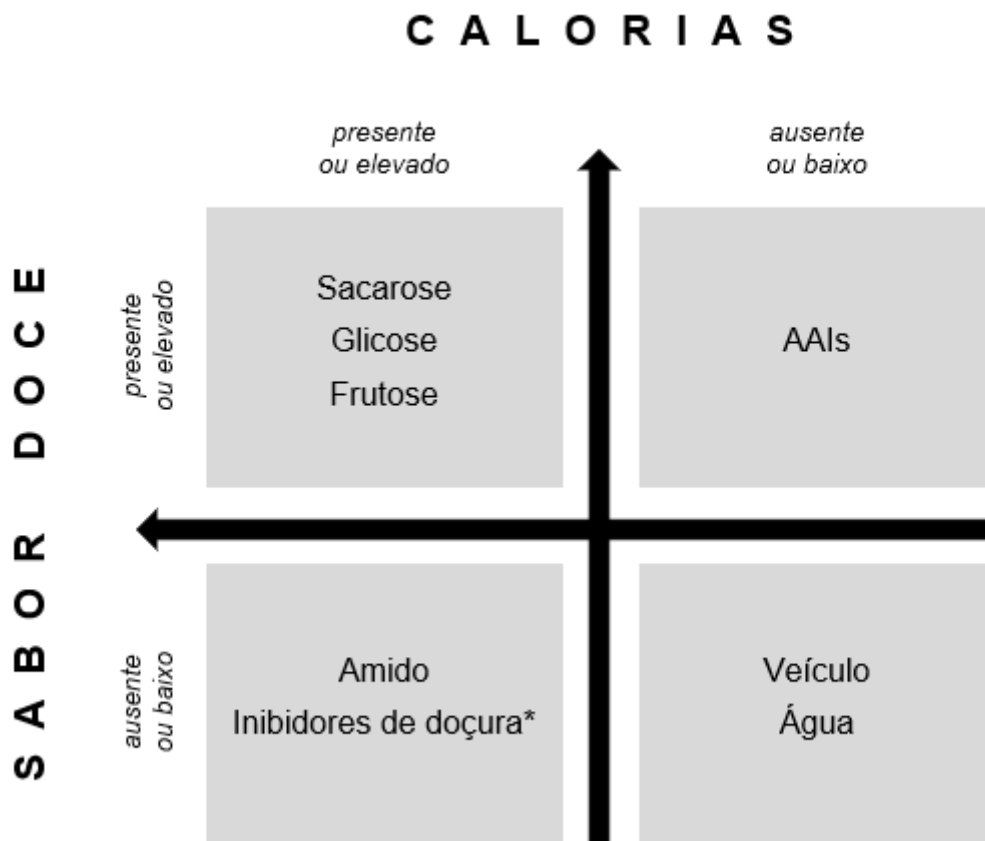
2.5.3. Desacoplamento Calórico-sensorial

O desacoplamento entre o sabor doce e teor energético foi uma das primeiras hipóteses a serem exploradas a fim de elucidar repercussões metabólicas adversas com o uso de AAls. Em 1988, Rogers *et al.* (112), num pioneiro estudo, avaliou o impacto no apetite e na ingestão calórica após o uso de sobrecargas doces, com mesma intensidade de dulçor, contendo (glicose) ou não contendo calorias (sacarina, aspartame e acesulfame-K) e um controle inerte (água). Foi verificado que indivíduos que consumiram AAls apresentaram discrepância entre classificações de apetite e ingestão calórica posterior, apresentando maior classificação de fome residual e desejo de comer, apesar de não haver maior ingestão calórica posterior em relação ao controle inerte (ingestão calórica compensatória).

Mais tarde, a teoria do condicionamento pavloviano foi proposta pelo grupo de Swithers e Davidson em uma série de estudos (166-169) para demonstrar que o consumo de AAls promove degradação da capacidade do organismo em prever consequências calóricas após certos estímulos crossensoriais, predizendo resultados biologicamente significativos, o que poderia desencadear ingestão calórica excessiva e consequente ganho de peso. Contudo, estudos experimentais (27, 28, 30) e ECRs (89) encontraram que o excessivo ganho de peso com o consumo de sacarina não esteve associado a uma maior ingestão calórica. Um deles encontrou redução no BE (27). Uma recentemente uma meta-análise concluiu não haver BE positivo decorrente do aumento do consumo calórico incitado pelo uso de AAls (97).

Em um diagrama conceitual (Figura 9), demonstramos que a doçura e o conteúdo calórico são dissociáveis e podem exercer efeitos díspares no controle do apetite a curto prazo, incluindo a intensidade de fome, saciedade e o tamanho das refeições (Figura 8). Para uma melhor análise acerca do tema, é necessário compreender que os AAls podem ser utilizados de forma aditiva ou substitutiva. Na forma aditiva, os AAls são adicionados sem alterar o valor energético, o que pode ser usado para comparar o efeito da doçura no apetite com intensidade energética equivalente. Já na forma substitutiva, são utilizados em detrimento de um adoçante calórico de modo a manter um nível equivalente de doçura, mas com redução no valor energético. Como objeto de estudo, a forma aditiva é necessária para avaliar os efeitos da doçura, enquanto a forma substitutiva é necessária para demonstrar ajustes à mudança calórica (164).

Figura 9 - Desacoplamento entre o teor calórico e o sabor doce



Modelo esquemático no qual a doçura e o conteúdo calórico variam de modo independentemente. *Substâncias antagonistas dos receptores T1R2 e T1R3 que inibem as respostas induzidas por substâncias doces, por exemplo: lactisole, seu derivado estrutural ácido 2-(2,4-diclorofenoxi) propiônico (2,4-DP), *gymnema sylvestre* (gurmarina e ácido gimnêmico). AAls: adoçantes de alta intensidade. Fonte: adaptado de Hopkins *et al.*, 2016 (164).

Maersk *et al.*, (2012) (170), em um ECR crossover de 4 dias, avaliaram scores de saciedade, hormônios relacionados (grelina, GLP1 e GIP) e ingestão calórica após o uso diário (500ml/d) de bebidas isocalóricas (refrigerante adoçado com sacarose e leite semidesnatado) ou não calóricas (refrigerante adoçado com aspartame e água pura), concluindo que o uso de aspartame não afetou parâmetros relacionados à saciedade, sendo comparável ao uso de água. Além disso, a ingestão de bebidas calóricas não foi proporcionalmente compensada com menor ingestão calórica posterior.

No elegante estudo de Dalenberg *et al.*, (2020) (51) foi testada a hipótese de desacoplamento sensorial na sensibilidade à insulina em 45 indivíduos saudáveis, os quais foram designados a consumir por 10 dias: (1) bebidas adoçadas com sucralose (doce desacoplado de calorias), (2) bebidas adoçadas com sacarose (doce com calorias - açúcar) ou (3) bebidas adoçadas com sucralose e combinadas com maltodextrina (combo). Foi verificado que a sucralose, quando na presença de um carboidrato (maltodextrina) diminui a sensibilidade à insulina, o que está correlacionado à diminuição nas respostas cerebrais ao sabor doce, mas não ao sabor azedo, salgado ou umami. A percepção do paladar permaneceu inalterado e não houve efeito no consumo de carboidrato isolado (açúcar). Os autores concluíram que o consumo de sucralose na presença de um carboidrato prejudica rapidamente o metabolismo da glicose e implica em prejuízos cerebrais a longo prazo, mas não prejudica a sensibilidade perceptiva ao sabor doce – sugerindo uma desregulação do controle intestinal-cérebro do metabolismo da glicose.

A descoberta de Dalemberg não é suportada pelo desacoplamento-sensorial (visto que o efeito deletério não ocorreu com a sucralose quando consumida sozinha), mas sugere que o mecanismo subjacente envolva alterações agudas induzidas por AAls no metabolismo da glicose, associadas a reduções de longo prazo na sensibilidade central ao sabor doce. Assim, é plausível que mecanismos cerebrais possam estar alterados, implicando na regulação central do metabolismo da glicose.

2.5.4. Sistema Neuroendócrino

A discrepância entre os sinais sensoriais, metabólicos e centros reguladores hipotalâmicos pode favorecer o ganho de peso e alterar o metabolismo da glicose.

O hipotalâmico desempenha um papel importante na homeostase energética através dos núcleos neurais laterais (fome) e ventromediais (saciedade) que regulam a ingestão alimentar num processo integrado, sensível a hormônios e nutrientes. Existem dois tipos de neurônios sensores de glicose no núcleo arqueado hipotalâmico (ARC), neurônios excitados por glicose e neurônios inibidos por glicose. A capacidade desses neurônios de responder à glicose é um mecanismo importante no controle hipotalâmico da homeostase energética (171). Contudo, a recente descoberta (172) dos receptores de sabor doce T1R2/T1R3 no hipotálamo indica que os AAls são detectáveis a nível central – sugerindo participação na regulação do BE.

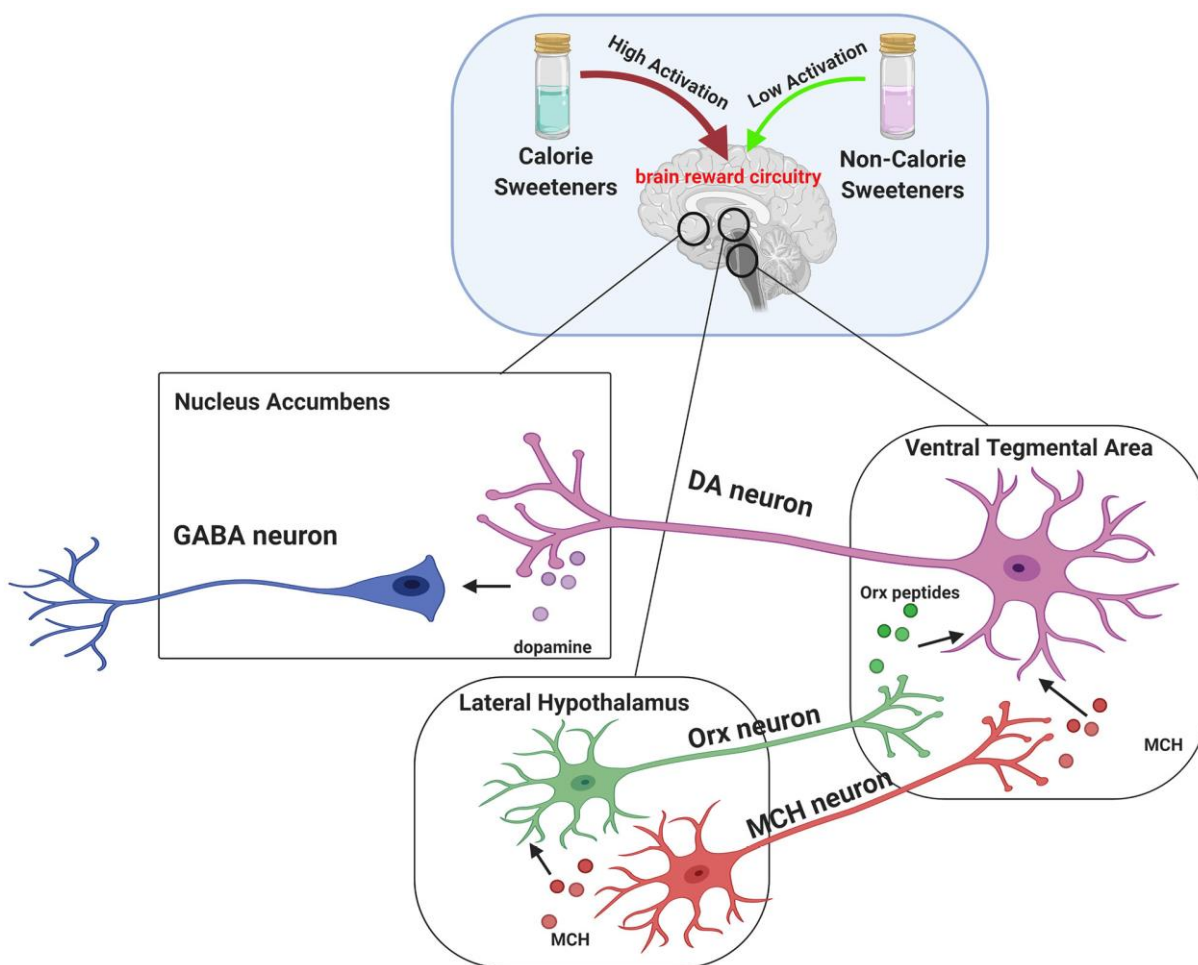
A área hipotalâmica lateral (LHA), a área tegmental ventral (VTA), o núcleo accumbens (NAc) e córtex pré-frontal (PFC) são algumas das áreas do cérebro relacionadas a recompensa alimentar. Nestas áreas, diversos neurotransmissores, incluindo GABA, glutamato e opioides, estão implicados em vários elementos do sistema de recompensa. Particularmente, os processos hedônicos – que incluem gosto, reforço e motivação – são mediados por circuitos dopaminérgicos do LHA para o VTA e de VTA para o NAc, enquanto a acetilcolina está envolvida nos aspectos aversivos da abstinência. De fato, o consumo frequente ou excessivo de açúcar resulta em alterações neuroquímicas que se assemelham aos efeitos dos opioides. Já o consumo de AAls pode driblar o cérebro, estimulando o desejo e o vício por açúcar. (54).

A percepção do sabor doce provoca respostas fisiológicas críticas na regulação do BE por facilitar a absorção de nutrientes no intestino e por regular o consumo de alimentos. Sabe-se que os AAls evocam reações cerebrais distintas quando comparados à adoçantes calóricos. Devido à dissociação calórica, a ativação das vias periféricas e centrais relacionadas à saciedade são mitigadas (173).

A sucralose, em especial, demonstrou capacidade reduzida de ativar áreas do mesencéfalo relacionadas à recompensa, incluindo a LHA, VTA e o NAc. Dada a função determinante do hormônio concentrador de melanina (MCH) na LHA, um estudo pré-clínico mostrou que a sacarose ativa os neurônios MCH, resultando na liberação de dopamina. Em contrapartida, a sucralose induziu a liberação de

dopamina nos camundongos apenas quando na presença de estimulação luminosa, o que levou à ativação de neurônios MCH. Esses resultados sugerem que os AAls requerem estímulos adicionais para obter o mesmo efeito recompensador da sacarose (Figura 10) (174).

Figura 10 - Efeito dos adoçantes de alta intensidade no sistema de recompensa cerebral



A via dopaminérgica está estritamente envolvida em processos hedônicos. Os circuitos dopaminérgicos do mesencéfalo incluem o hipotálamo lateral (LHA), a área tegmental ventral (VTA) e o núcleo accumbens (NAc). A liberação de dopamina é estimulada por peptídeos de orexina (ORX) e hormônio concentrador de melanina (MCH) secretado pelo LHA. Em particular, neurônios ORX e MCH de LHA projetam-se para VTA, onde peptídeos ORX e MCH regulavam a ativação de neurônios de dopamina (DA) e aumentam a liberação de DA em áreas de projeção como o NAc. Foi estabelecido que a resposta da via de recompensa da dopamina induzida pelo consumo de adoçantes calóricos, como a sacarose, é maior quando em comparação à AAls. Curiosamente, um estudo pré-clínico forneceu evidências de que os neurônios MCH são responsáveis pela preferência natural à sacarose sobre a sucralose e que esse efeito pode ser revertido pela estimulação dos neurônios MCH com energia luminosa. Isso sugere que os AAls requerem estímulos adicionais para obter o mesmo efeito recompensador da sacarose. Fonte: Moriconi *et al.*, 2020 (54).

Crézé *et al.* (2018) (120), em ECR, avaliaram marcadores neuroendócrinos e ingestão calórica posterior à sobrecarga de um *blend* de AAls em relação à sacarose ou água. Eles encontraram que o consumo de AAl não levou a modulações pronunciadas das concentrações de glicose, insulina e grelina, nem promoveu aumento no consumo calórico posterior, todavia alterou as respostas cerebrais pós-prandiais, sendo mais pronunciadas na ínsula e nas áreas pré-frontais, especialmente com o aumento da atividade neural na região ventrolateral – que está relacionada à inibição do sistema de recompensa. Essas diferenças encontradas são congruentes com o conceito do desacoplamento calórico-gustativo (112), em que informações discrepantes entre a ativação do receptor do sabor doce e a sinalização de hormônios pós-ingestivos levam a mudanças no padrão de respostas cerebrais. Esse impacto diferencial entre adoçantes calóricos e não calóricos pode ser indicativo de consequências a longo prazo do consumo repetido de AAls no comportamento alimentar e consequente ganho de peso.

O último estudo publicado por Yunker *et al.*, (2021) (121), avaliou se o IMC e o sexo estão associados às distintas respostas metabólicas, neurais e alimentares mediante o consumo de sucralose ou de sacarose. Neste ECR cruzado, foi possível verificar que o consumo agudo de sucralose por mulheres com IMC > 30 mg/kg² foi associado a uma responsividade neural diferencial, nas áreas pré-frontais, onde ocorre o processamento da recompensa. Isso aumenta a possibilidade de que adicionar AAls à dieta pode prejudicar a capacidade de resposta do cérebro aos alimentos com consequências negativas no comportamento alimentar e metabolismo, principalmente nas mulheres obesas. Esse é um estudo pioneiro em demonstrar a suscetibilidade dos efeitos adversos numa população específica, sugerindo a necessidade de considerar fatores biológicos individuais que podem ser alterados pelo uso de AAls.

O estudo de Dalenberg (51) sugere que o consumo diário e a curto prazo de sucralose pode alterar a sensibilidade neural e metabólica à glicose quando consumida na presença de carboidratos. Isso indica que, além dos fatores biológicos individuais (121), as consequências neurocomportamentais e metabólicas da ingestão de AAls também podem depender de como eles são consumidos. Esta relevância se deve ao fato de os adoçantes serem normalmente comercializados na forma de *blends*

(com outros AAls e/ou adoçantes calóricos), ou ainda como adoçante para inúmeros alimentos/bebidas (versões *diets*) que contenham ou sejam fonte de carboidratos.

Essas regiões frontais representam o valor da recompensa e a agradabilidade subjetiva (sabor, cheiro, visão e textura) dos alimentos, com ativações mais proeminentes em indivíduos com maior prazer com comida. Além disso, o córtex pré-frontal ventromedial está implicado na tomada de decisão sobre o valor de recompensa dos alimentos, tornando esta região um mecanismo-chave no sucesso do controle do peso corporal (175).

2.5.5. Microbiota Intestinal

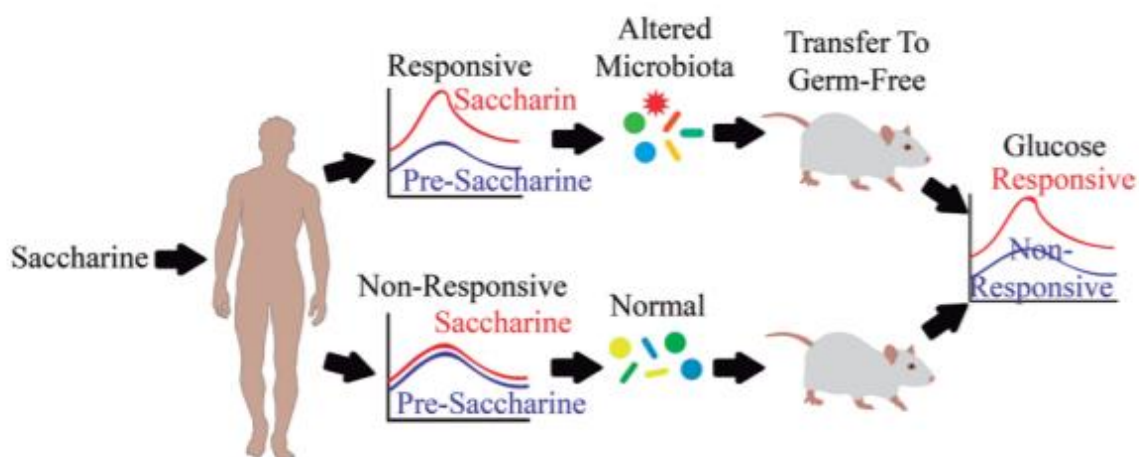
A microbiota intestinal (MI) participa na homeostase do BE, obtendo energia dos alimentos por meio de atividades de fermentação e formação de AGCCs, também aumenta a vascularização das vilosidades otimizando a absorção de nutrientes. Adicionalmente, reduz a AMPK e a β -oxidação no tecido muscular, inibe a lipoproteína lipase (LPL) – que leva ao acúmulo de triglicerídeos no fígado e no tecido adiposo, interfere no surgimento de inflamação de baixo grau e endotoxemia metabólica via diminuição dos lipopolissacarídeos (LPS). Deste modo, a disbiose tem sido sugerida como um fator contributivo para o acúmulo de gordura, ganho de peso e resistência à insulina.

Os efeitos dos AAls na MI são uma área de crescente interesse na comunidade científica devido à sua influência potencial no ganho de peso resistência à insulina e inflamação. Apesar de estudos iniciais referirem inocuidade nesta relação, recentes pesquisas clínicas e experimentais (16, 176) demonstraram alterações específicas na MI, as quais estão relacionadas às alterações nas vias metabólicas ligadas à tolerância à glicose e disbiose em seres humanos, especialmente com a ingestão de sacarina (Figura 11).

Suez *et al.* (2014 e 2022) (16, 95), em seus notáveis estudos demonstraram que a sacarina medeia a intolerância à glicose por meio de alterações na MI. A relação causal foi estabelecida através do transplante fecal de camundongos suplementados com sacarina em animais germ-free (Figura 11) (16). Além disso, eles encontraram uma relação firmicutes/bacteroidetes (F/B) alterada. Esta é uma observação particularmente relevante, pois firmicutes são mais eficazes na extração de energia

dos alimentos do que os bacteroidetes promovendo assim uma maior absorção eficiente de calorias e o subsequente ganho de peso. Apesar da controversa de que a relação F/B seja um preditor de obesidade (177), há evidência acumulada de estudos clínicos de que o excesso de peso, a doença inflamatória intestinal, o DM2 e outras condições metabólicas estão associadas a um desequilíbrio nesta relação.

Figura 11 - Efeitos da sacarina na microbiota intestinal e na tolerância à glicose



Estudos experimentais indicam alterações específicas no microbiota intestinal relacionadas às vias metabólicas que regulam a tolerância à glicose após a ingestão de sacarina. Fonte: Ruiz-Ojeda *et al.*, 2019 (176).

Bian *et al.* (2017) (178) verificaram que o consumo de Ace-K (mais que o dobro da IDA) por 4 semanas aumentou consideravelmente *Bacteroides*, *Anaerostipes* e *Sutterella* em camundongos machos, por outro lado, diminuiu a abundância relativa de *Lactobacillus* e *Clostridium* em fêmeas – indicando efeito sexo-dependente. Entretanto, outros estudos experimentais, que utilizaram doses iguais ou inferiores à IDA, não encontraram diferença no microbioma total, nem firmicutes ou bacteroidetes quando utilizaram Ace-K (179), sacarina ou aspartame (180).

O consumo de aspartame crônico (8 semanas) e em baixas doses (5-7 mg/kg), num modelo experimental de obesidade induzida pela dieta, ocasionou elevação da glicemia e menor tolerância à insulina, independente do favorável parâmetro antropométrico (peso corporal e adiposidade). Houve também alteração no perfil microbiano, com aumento nas bactérias intestinais totais. A análise metabolômica identificou aumento de propionato (um AGCC altamente gluconeogênico), explicando seus efeitos negativos na tolerância à insulina (94). Em contrapartida, Suez *et al.*

(2014) (16), identificaram intolerância à glicose, porém não relacionada às alterações na microbiota dos camundongos tratados com aspartame por 11 semanas.

Recentemente, um ECR (181) que avaliou o efeito da sucralose e do aspartame usando doses realistas encontrou mínima alteração na composição da MI e na produção de AGCCs. Outro estudo não encontrou benefício pretendido na substituição de açúcar (sacarose) por AAls (aspartame, stevia ou monk fruit) no que diz respeito à ingestão calórica, glicemia e insulinemia, pelo menos no curto prazo (182).

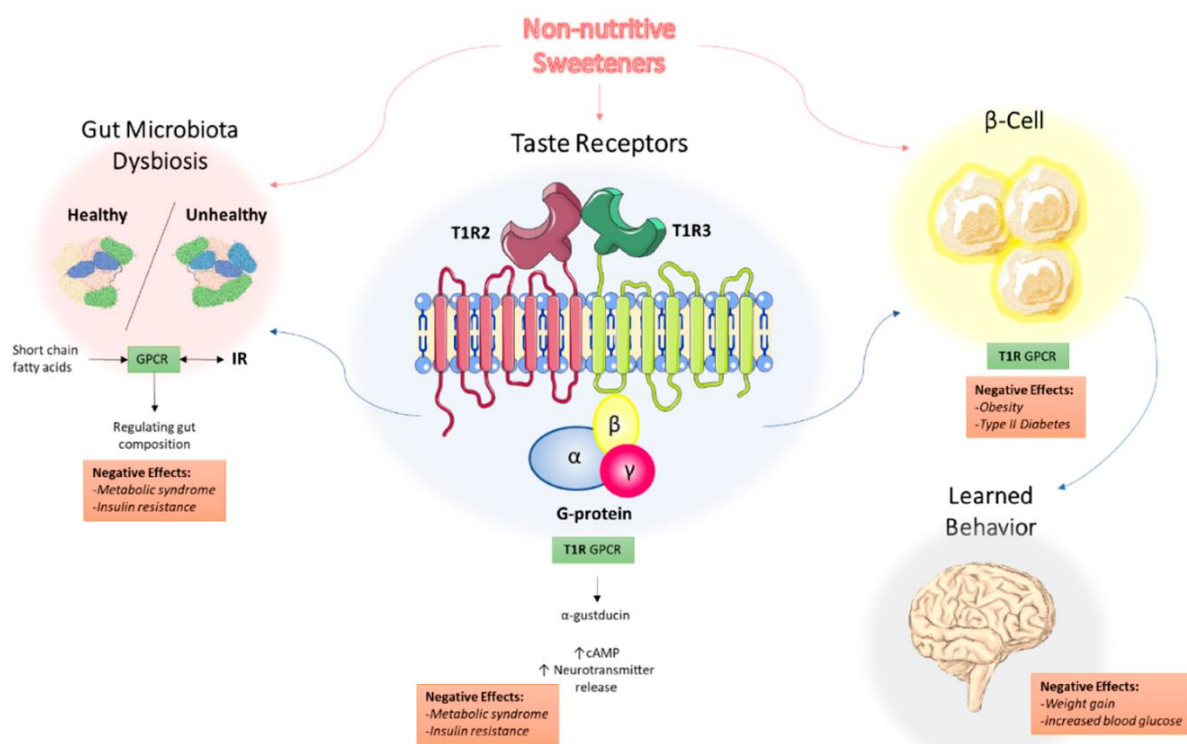
Apesar das divergências entre os estudos, é pouco plausível a hipótese do aspartame interferir na MI humano, uma vez que é rapidamente hidrolisado no intestino delgado e seus decompostos são imediatamente absorvidos, antes de atingirem o cólon. Foi demonstrado que, mesmo com doses elevadas de aspartame (quádruplo da IDA), não foram encontrados vestígios no sangue, devido à sua rápida degradação (70, 183).

2.5.6. Síndrome Metabólica

Síndrome metabólica (SM) refere-se a uma desordem complexa definida por uma série de fatores fisiológicos, bioquímicos, clínicos e metabólicos que aumentam diretamente o risco de doença cardíaca coronária (DCC), outras formas de doenças cardiovasculares ateroscleróticas (DCA) e DM2. Em consenso entre as principais sociedades, seus principais componentes são: circunferência da cintura elevada, triglicérides ≥ 150 mg/dl, HDL-colesterol < 40 mg/dl em homens e < 50 mg/dl em mulheres. Pressão arterial (PA) $\geq 130/85$ mmHg e glicose (jejum) ≥ 100 mg/dl (184). Estudos associam o uso de AAls a fatores de risco aumentados para síndrome metabólica (12, 100-102).

Os potenciais mecanismos dos AAls no desenvolvimento e/ou agravamento da síndrome metabólica e resistência insulínica foram abordados em recentes revisões (185, 186). Basicamente, os AAls interagem com os receptores de sabor doce T1R2/T1R3, modificam a composição da MI, e alteram respostas aprendidas à doçura. Na Figura 12, demonstramos estes 3 mecanismos propostos nesta relação.

Figura 12 - Mecanismos propostos dos efeitos subjacentes dos adoçantes de alta intensidade no desenvolvimento da síndrome metabólica e da resistência à insulina



Os AAI contribuem para o desenvolvimento da SM e RI por meio de três mecanismos relacionados à expressão da GPCR, que é desencadeada mediante ativação dos receptores da família T1R. (1) A ativação dos receptores para o sabor doce T1R2 e T1R3s ocorre através da proteína G α -gustducina que resulta em aumento dos níveis de cAMP intracelular e a liberação de neurotransmissores. (2) Os AAI também interferem na composição microbiana intestinal por meio de AGCCs, provenientes da alimentação, que atuam como ligantes para GPCRs no TGI, alterando a permeabilidade intestinal. (3) Outro mecanismo está relacionado à liberação de hormônios, como a insulina, que eventualmente afetam o comportamento aprendido e a maneira como o organismo reage à doçura. Abreviações: AAI: adoçantes de alta intensidade; SM: síndrome metabólica; RI: resistência à insulina; GPCR: receptores acoplados à proteína G; T1R3: *taste receptors type 1 subunit 3*; T1R2: *taste receptors type 1 subunit 2*; AGCCs: ácidos graxos de cadeia curta; TGI: trato gastrointestinal. Fonte: Liauchonak *et al.*, 2019 (185).

2.5.7. Adiposidade

A hipótese da adiposidade induzida por adoçantes, de modo independente, é pouco explorada na literatura em ensaios *in vivo*, ainda, existe viés de confusão nos estudos que encontraram aumento de peso – não sendo possível relacionar se a adiposidade é decorrente do excesso de peso. Demonstramos em um estudo anterior, onde comparamos sacarina com um controle não adoçado, que não houve diferença na adiposidade, apesar do maior ganho de peso (30). Contudo, foi evidenciado que o

tratamento de células precursoras de camundongos e humanos com AAls, como a sacarina e o acessulfame- K, aumentam a adipogênese (187).

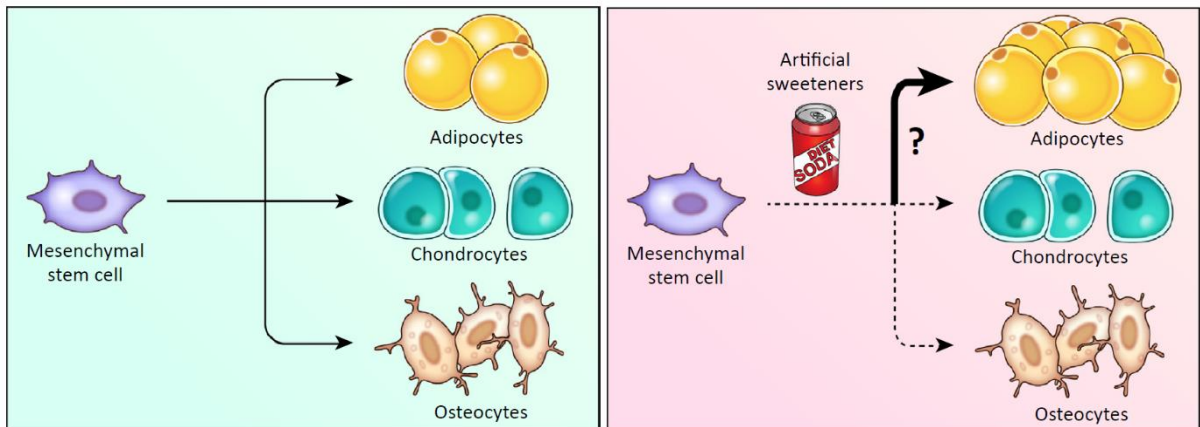
Uma vez que o T1R3 é expresso por adipócitos indiferenciados e maduros, é plausível que haja relação entre os AAls na diferenciação dessas células. De acordo com Simon *et al.* (2014), camundongos *knockout* para T1R2/T1R3 exibem adiposidade reduzida e adipócitos menores quando alimentados com uma dieta ocidental, mostrando que a sinalização do receptor de sabor doce é crucial para a formação de tecido adiposo saudável (188).

Entretanto, esta hipótese foi contraposta por outro estudo do mesmo grupo (187), o qual demonstrou que a sacarina estimulou a adipogênese e suprimiu a lipólise independentemente expressão de T1R2 e/ou T1R3. Mais tarde foi verificado que os adipócitos expressam os receptores de sabor amargo (T2Rs) e que AAls com sabor residual amargo (como a sacarina, o acessulfame-K, o ciclamato e a stévia), ativam o T2R de modo dependente da concentração (83).

Outros estudos com sucralose, um AAI não ligante aos T2Rs, indicam adipogênese. Kundu *et al.* (2020) avaliou *in vitro* que a sucralose promoveu o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a adipogênese em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano. O aumento do acúmulo de ROS foi observado dentro de 72h após a exposição e o aumento da adipogênese também foi observado quando exposto a doses mais elevadas (189).

Por meio de culturas de tecido adiposo subcutâneo humano e células-tronco mesenquimais foi verificado que a sucralose, mesmo que em concentrações fisiológicas (0,2 mmol), estimula o armazenamento de gordura intracelular com hiperregulação de genes-chave na adipogênese e na inflamação. Análises posteriores, com amostras de tecido adiposo abdominal obtidas de oito indivíduos (quatro obesos e quatro eutróficos) usuários de AAls (sucralose com traços de aspartame e/ou acessulfam-K) foi corroborado a hiperexpressão de genes-chave na adipogênese e aumento do transporte de glicose celular nos indivíduos obesos (190). Independe do AAI ou qual tipo de receptor é ativado, conjectura-se que adiposidade ocorre através da diferenciação preferencial em adipócitos (Figura 13).

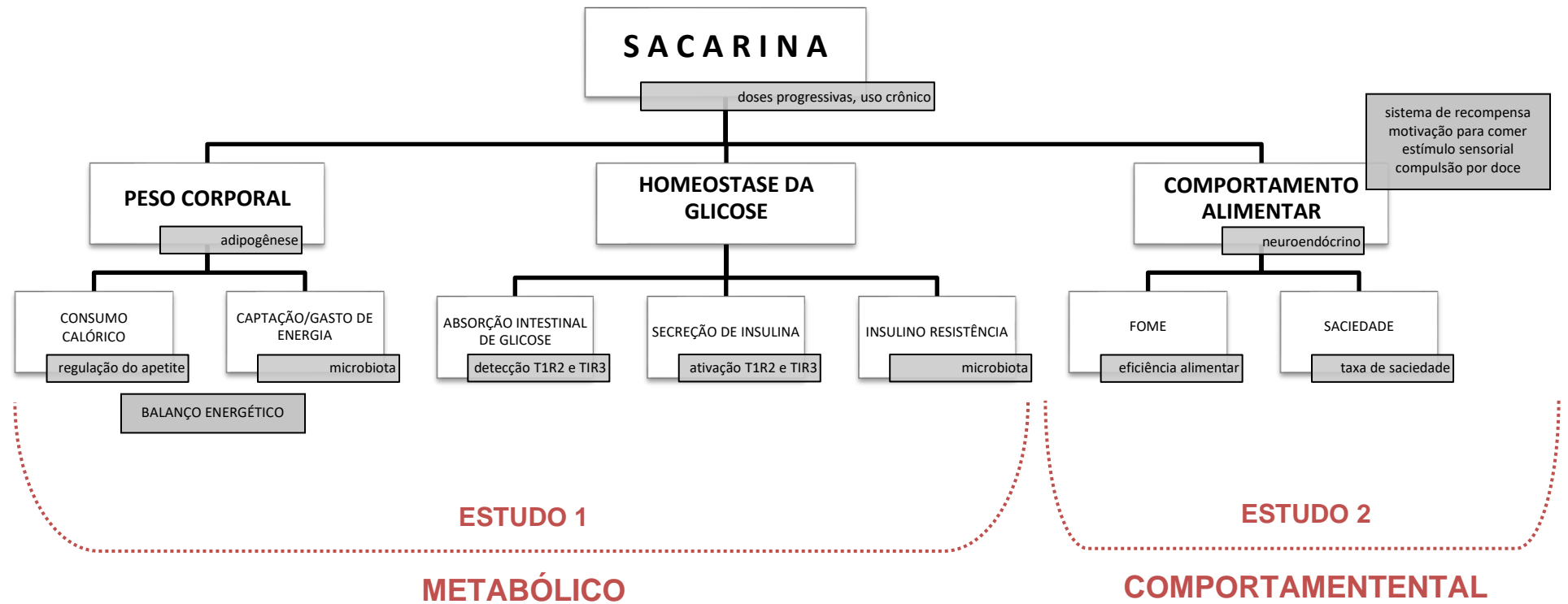
Figura 13 - Adipogênese induzida por adoçantes artificiais



As células-tronco mesenquimais são precursoras de adipócitos, condrócitos e osteócitos. A exposição a adoçantes artificiais induz a diferenciação preferencial em adipócitos. Fonte: adaptado de Rother et al., 2018 (86).

3. MARCO CONCEITUAL

Figura 14 - Marco conceitual esquemático do estudo



4. JUSTIFICATIVA

Diante do consenso de que a alta ingestão de açúcar contribui para a obesidade e suas comorbidades, como o DM2, os AAls surgiram como um substituto promissor pelo fato de satisfazer o desejo sensorial por doce com poucas ou nenhuma caloria adicional.

Apesar de diversos trabalhos terem investigado a eficácia dessa substituição, principalmente no que se refere a manejo do peso corporal, não há consenso científico sobre este potencial benefício (191). Além disso, consequências neuro comportamentais e metabólicas apresentam evidências heterogêneas e limitadas.

Em uma série de estudos experimentais conduzidos por nosso grupo de pesquisa demonstramos que o uso de sacarina promoveu maior ganho de peso não relacionado à maior ingestão calórica (27-30). Até o momento, nenhum estudo avaliou, de modo controlado, o efeito dose-resposta de qualquer AAl nos parâmetros metabólicos e comportamentais pretendidos com este trabalho. Além disso, maioria dos estudos utilizam versões comerciais de adoçantes, compostas por *blends* – o que pode ser um fator de confusão.

Nossa hipótese é que a sacarina pode promover maior de ganho de peso sem aumentar a ingestão calórica, mas sim devido à otimização na absorção de glicose intestinal via ativação dos receptores para o sabor doce e que seu uso crônico pode também induzir a intolerância à glicose e diminuição da sensibilidade da insulina.

Diante do uso disseminado e crescente de AAls, é de grande relevância contribuir para elucidar essa controvérsia. Esclarecer esta relação e mecanismos envolvidos teria ampla repercussão clínica no manejo nutricional do peso corporal, especialmente em indivíduos com sobrepeso ou obesidade, diabéticos ou propensos a desenvolver diabete.

4.1. HIPÓTESES

- O uso prolongado de sacarina poderia promover maior ganho de peso corporal;
- O uso prolongado de sacarina poderia alterar a tolerância à glicose e a sensibilidade da insulina;
- O uso prolongado de sacarina poderia alterar o comportamento alimentar e mecanismos relacionados a fome e saciedade;
- O uso de sacarina poderia alterar o consumo calórico a longo prazo;
- Possíveis efeitos metabólicos e comportamentais seriam dose-dependente.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar, em um modelo experimental controlado, se o uso prolongado e com dose progressiva de sacarina teria impacto na ingestão alimentar, no ganho de peso, na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito dose-resposta do uso prolongado (13 semanas) de sacarina;
- Avaliar o metabolismo da glicose e a sensibilidade da insulina através do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e do teste de tolerância à insulina (TTI), com avaliações no baseline e no final do período de intervenção dietética;
- Aferir e comparar semanalmente a evolução do ganho de peso corporal;
- Avaliar diariamente, por um sistema computacional (BioDAQ®), o consumo calórico e o comportamento alimentar.

Foram desenvolvidos dois estudos a fim de responder esses objetivos. O primeiro (ARTIGO 1) se propõe a avaliar o balanço energético (analisado por meio do ganho de peso corporal e do consumo calórico), bem como o desenvolvimento de DM2 (através do TOTG e do TTI). O segundo (ARTIGO 2) tenciona avaliar o impacto no comportamento alimentar, mediante a mensuração dos componentes da microestrutura alimentar, eficiência alimentar, taxa de saciedade e parâmetros relacionados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després J-P, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation*. 2010;121(11):1356-64.
2. WHO. Obesity and overweight: World Health Organization; 2021 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>].
3. Di Angelantonio E, Bhupathiraju SN, Wormser D, Gao P, Kaptoge S, De Gonzalez AB, et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *The Lancet*. 2016;388(10046):776-86.
4. Gardner C, Wylie-Rosett J, Gidding SS, Steffen LM, Johnson RK, Reader D, et al. Nonnutritive sweeteners: current use and health perspectives: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes care*. 2012;35(8):1798-808.
5. Benton D. Can artificial sweeteners help control body weight and prevent obesity? *Nutrition Research Reviews*. 2005;18(1):63-76.
6. Sylvestry AC, Jin Y, Clark EJ, Welsh JA, Rother KI, Talegawkar SA. Consumption of Low-Calorie Sweeteners among Children and Adults in the United States. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2017;117(3):441-8.e2.
7. Laviada-Molina H, Molina-Segui F, Pérez-Gaxiola G, Cuello-García C, Arjona-Villicaña R, Espinosa-Marrón A, et al. Effects of nonnutritive sweeteners on body weight and BMI in diverse clinical contexts: Systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 2020;21(7).
8. Catenacci VA, Pan Z, Thomas JG, Ogden LG, Roberts SA, Wyatt HR, et al. Low/no calorie sweetened beverage consumption in the National Weight Control Registry. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(10):2244-51.
9. Dunford EK, Miles DR, Ng SW, Popkin B. Types and Amounts of Nonnutritive Sweeteners Purchased by US Households: A Comparison of 2002 and 2018 Nielsen Homescan Purchases. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2020;120(10):1662-71.e10.
10. Fowler SPG, Williams K, Resendez RG, Hunt KJ, Hazuda HP, Stern MP. Fueling the Obesity Epidemic? Artificially Sweetened Beverage Use and Long-term Weight Gain. *Obesity*. 2008;16(8):1894-900.
11. Fowler SPG, Williams K, Hazuda HP. Diet Soda Intake Is Associated with Long-Term Increases in Waist Circumference in a Biethnic Cohort of Older Adults: The San Antonio Longitudinal Study of Aging. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2015;63(4):708-15.
12. Azad MB, Abou-Setta AM, Chauhan BF, Rabbani R, Lys J, Copstein L, et al. Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Canadian Medical Association Journal*. 2017;189(28):E929-E39.
13. Lavery AA, Magee L, Monteiro CA, Saxena S, Millett C. Sugar and artificially sweetened beverage consumption and adiposity changes: National longitudinal study. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*. 2015;12(1).
14. Meng Y, Li S, Khan J, Dai Z, Li C, Hu X, et al. Sugar and Artificially Sweetened Beverages Consumption Linked to Type 2 Diabetes, Cardiovascular Diseases, and All-Cause Mortality: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Nutrients*. 2021;13(8):2636.
15. Levine AS, Kotz CM, Gosnell BA. Sugars: hedonic aspects, neuroregulation, and energy balance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003;78(4):834S-42S.
16. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014;514(7521):181-6.
17. Suez J, Shapiro H, Elinav E. Role of the microbiome in the normal and aberrant glycemic response. *Clinical Nutrition Experimental*. 2016;6:59-73.
18. Kyriazis GA, Soundarapandian MM, Tyrberg B. Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(8):E524-E32.
19. Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev VO, et al. Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic β -Cells Activates the Calcium and Cyclic AMP Signaling Systems and Stimulates Insulin Secretion. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5106.
20. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(38):15069-74.

21. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KSH, Ilegems E, Daly K, et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(38):15075-80.
22. Corkey BE. Banting Lecture 2011. *Diabetes*. 2012;61(1):4.
23. Moran AW, Al-Rammahi MA, Arora DK, Batchelor DJ, Coulter EA, Daly K, et al. Expression of Na⁺/glucose co-transporter 1 (SGLT1) is enhanced by supplementation of the diet of weaning piglets with artificial sweeteners. *British Journal of Nutrition*. 2010;104(5):637-46.
24. Moran AW, Al-Rammahi M, Zhang C, Bravo D, Calsamiglia S, Shirazi-Beechey SP. Sweet taste receptor expression in ruminant intestine and its activation by artificial sweeteners to regulate glucose absorption. *Journal of Dairy Science*. 2014;97(8):4955-72.
25. Stearns AT, Balakrishnan A, Rhoads DB, Tavakkolizadeh A. Rapid upregulation of sodium-glucose transporter SGLT1 in response to intestinal sweet taste stimulation. *Ann Surg*. 2010;251(5):865-71.
26. Mace OJ, Affleck J, Patel N, Kelleth GL. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol*. 2007;582(Pt 1):379-92.
27. Pinto DE, Foletto KC, Nunes RB, Dal Lago P, Bertoluci MC. Long-term intake of saccharin decreases post-absorptive energy expenditure at rest and is associated to greater weight gain relative to sucrose in wistar rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2017;14:18.
28. Feijó FM, Ballard CR, Foletto KC, Batista BAM, Neves AM, Ribeiro MFM, et al. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*. 2013;60(1):203-7.
29. Pinto DE, Foletto KC, Nunes RB, Dal Lago P, Bertoluci MC. Effect of saccharin supplementation on weight gain, caloric intake and basal oxygen consumption in Wistar rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2015;7(S1):A158.
30. Foletto KC, Melo Batista BA, Neves AM, de Matos Feijo F, Ballard CR, Marques Ribeiro MF, et al. Sweet taste of saccharin induces weight gain without increasing caloric intake, not related to insulin-resistance in Wistar rats. *Appetite*. 2016;96:604-10.
31. Pang MD, Goossens GH, Blaak EE. The Impact of Artificial Sweeteners on Body Weight Control and Glucose Homeostasis. *Frontiers in Nutrition*. 2021;7(333).
32. Mérillon J-Meehildvre, Ramawat KGeehildvre. *Sweeteners Pharmacology, Biotechnology, and Applications*. 1st ed. 2018. ed2018.
33. Zeece M. Chapter six - Flavors. In: Zeece M, editor. *Introduction to the Chemistry of Food*: Academic Press; 2020. p. 213-50.
34. FDA. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for Use in Food in the United States | FDA: Food and Drug Administration, US; 2018 [updated 02/08/2018. Available from: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states>.
35. FDA. GRAS Notices nº 902. Notice to US Food and Drug Administration of the Conclusion that the Intended Use of Neohesperidin dihydrochalcone is Generally Recognized as Safe 2020 [Available from: <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=902>.
36. FDA. GRAS Notice nº 784. Determination of generally recognized as safe (GRAS) status of Siraitia grosvenori Swingle (Luo Han Guo) fruit extract as a food ingredient 2018 [
37. ANVISA. Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008. [Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/rdc0018_24_03_2008.html.
38. ANVISA. Portaria SNVS/MS nº 14 de 26 de janeiro de 1988. [Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/snvs/prt0014_26_01_1988.html.
39. ANVISA. Resolução RDC nº 239, de 26 de julho de 2018. [Available from: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380515/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-239-de-26-de-julho-de-2018-34380387.
40. ANVISA. Resolução RDC nº 281, de 29 de abril de 2019. [Available from: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolu%C3%87%C3%83o-rdc-n%C2%BA-281-de-29-de-abril-de-2019-86234909>.
41. Nabors LOB. *Alternative sweeteners*. 2016.
42. WHO. *Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. 2021.
43. Chilakapati J, Mehendale HM. Acceptable Daily Intake (ADI). In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 8-9.

44. Chakraborty R, Das A. Artificial Sweeteners. In: Melton L, Shahidi F, Varelis P, editors. *Encyclopedia of Food Chemistry*. Oxford: Academic Press; 2019. p. 30-4.
45. Liu L, Zhang P, Wang Y, Cui W, Li D. The relationship between the use of artificial sweeteners and cancer: A meta-analysis of case-control studies. *Food Science & Nutrition*. 2021;9(8):4589-97.
46. SCF. Opinion on saccharin and its sodium, potassium and calcium salts: Scientific Committee for Food | European Commission; 1995 [Available from: https://ec.europa.eu/food/system/files/2020-12/sci-com_scf_7_out26_en.pdf].
47. Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. Artificial sweeteners - a review. *Journal of food science and technology*. 2014;51(4):611-21.
48. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet*. 2010;376(9750):1417-27.
49. Newbould E, Pinto A, Evans S, Ford S, O'Driscoll M, Ashmore C, et al. Accidental Consumption of Aspartame in Phenylketonuria: Patient Experiences. *Nutrients*. 2021;13(2):707.
50. FoodComEx. Sucralose (PC001226) 2021 [Available from: https://foodcomex.org/foodcomex_compounds/PC001226].
51. Dalenberg JR, Patel BP, Denis R, Veldhuizen MG, Nakamura Y, Vinke PC, et al. Short-Term Consumption of Sucralose with, but Not without, Carbohydrate Impairs Neural and Metabolic Sensitivity to Sugar in Humans. *Cell Metab*. 2020;31(3):493-502.e7.
52. Ilias N, Hamzah H, Ismail IS, Mohidin TBM, Idris MF, Ajat M. An insight on the future therapeutic application potential of Stevia rebaudiana Bertoni for atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;143:112207.
53. Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M. Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*. 1998;78(4):527-36.
54. Moriconi E, Feraco A, Marzolla V, Infante M, Lombardo M, Fabbri A, et al. Neuroendocrine and Metabolic Effects of Low-Calorie and Non-Calorie Sweeteners. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:444.
55. Siddique AB, Rahman SMM, Hossain MA, Rashid MA. Phytochemical screening and comparative antimicrobial potential of different extracts of Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014;4:275-80.
56. Carrera-Lanestosa A, Moguel-Ordóñez Y, Segura-Campos M. Stevia rebaudiana Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome. *Journal of Medicinal Food*. 2017;20(10):933-43.
57. Ferrazzano G, Cantile T, Alcidi B, Coda M, Ingenito A, Zarrelli A, et al. Is Stevia rebaudiana Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? A Review. *Molecules*. 2015;21(1):38.
58. Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y, et al. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. *Antiviral Res*. 2001;49(1):15-24.
59. Fengyang L, Yunhe F, Bo L, Zhicheng L, Depeng L, Dejie L, et al. Stevioside Suppressed Inflammatory Cytokine Secretion by Downregulation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. *Inflammation*. 2012;35(5):1669-75.
60. Mizushima Y, Akihisa T, Ukiya M, Hamasaki Y, Murakami-Nakai C, Kuriyama I, et al. Structural analysis of isosteviol and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. *Life Sci*. 2005;77(17):2127-40.
61. Gupta E, Kaushik S, Purwar S, Sharma R, Balapure AK, Sundaram S. Anticancer Potential of Steviol in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Pharmacogn Mag*. 2017;13(51):345-50.
62. Chen J, Xia Y, Sui X, Peng Q, Zhang T, Li J, et al. Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively. *Oncotarget*. 2018;9(41):26299-308.
63. Ruiz-Ruiz JC, Moguel-Ordoñez YB, Matus-Basto AJ, Segura-Campos MR. Antidiabetic and antioxidant activity of Stevia rebaudiana extracts (Var. Morita) and their incorporation into a potential functional bread. *Journal of food science and technology*. 2015;52(12):7894-903.
64. Sehar I, Kaul A, Bani S, Pal HC, Saxena AK. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem Biol Interact*. 2008;173(2):115-21.
65. Liu C, Dai L, Liu Y, Dou D, Sun Y, Ma L. Pharmacological activities of mogrosides. *Future Med Chem*. 2018;10(8):845-50.
66. Takemoto T, Arihara S, Nakajima T, Okuhira M. Studies on the Constituents of Fructus Momordicae. III. Structure of Mogrosides. *YAKUGAKU ZASSHI*. 1983;103(11):1167-73.
67. Pawar RS, Krynitsky AJ, Rader JI. Sweeteners from plants—with emphasis on Stevia rebaudiana (Bertoni) and Siraitia grosvenorii (Swingle). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013;405(13):4397-407.

68. Gómez-Fernández AR, Santacruz A, Jacobo-Velázquez DA. The complex relationship between metabolic syndrome and sweeteners. *Journal of Food Science*. 2021;86(5):1511-31.
69. Mortensen A. Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. 2006;50(3):104-16.
70. Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, Poulos SP, Renwick AG. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews*. 2016;74(11):670-89.
71. Humphries P, Pretorius E, Naudé H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2008;62(4):451-62.
72. EFSA. Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. *EFSA Journal*. 2013;11(12).
73. Gardana C, Simonetti P, Canzi E, Zanchi R, Pietta P. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J Agric Food Chem*. 2003;51(22):6618-22.
74. Murata Y, Ogawa T, Suzuki YA, Yoshikawa S, Inui H, Sugiura M, et al. Digestion and absorption of *Siraitia grosvenori* triterpenoids in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(3):673-6.
75. Xu F, Li D-P, Huang Z-C, Lu F-L, Wang L, Huang Y-L, et al. Exploring in vitro, in vivo metabolism of mogroside V and distribution of its metabolites in rats by HPLC-ESI-IT-TOF-MS(n). *J Pharm Biomed Anal*. 2015;115:418-30.
76. EFSA. Scientific Opinion on the safety of advantame for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal*. 2013;11(7).
77. Cassidy A, Minihane A-M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2017;105(1):10-22.
78. Drewnowski A, Rehm C. Consumption of Low-Calorie Sweeteners among U.S. Adults Is Associated with Higher Healthy Eating Index (HEI 2005) Scores and More Physical Activity. *Nutrients*. 2014;6(10):4389-403.
79. Pepino MY. Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiology & Behavior*. 2015;152:450-5.
80. Fernstrom JD. Non-Nutritive Sweeteners and Obesity. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2015;6(1):119-36.
81. Yunker AG, Patel R, Page KA. Effects of Non-nutritive Sweeteners on Sweet Taste Processing and Neuroendocrine Regulation of Eating Behavior. *Current Nutrition Reports*. 2020;9(3):278-89.
82. Yeung AWK, Wong NSM. How Does Our Brain Process Sugars and Non-Nutritive Sweeteners Differently: A Systematic Review on Functional Magnetic Resonance Imaging Studies. *Nutrients*. 2020;12(10):3010.
83. Turner A, Veysey M, Keely S, Scarlett CJ, Lucock M, Beckett EL. Intense Sweeteners, Taste Receptors and the Gut Microbiome: A Metabolic Health Perspective. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(11).
84. Fernandez ML, Santos MESM. Effects of consuming sweeteners on metabolic disorders. *Journal of Nutrition, Food Research and Technology*. 2018;1(2):34-8.
85. Burke MV, Small DM. Physiological mechanisms by which non-nutritive sweeteners may impact body weight and metabolism. *Physiology & Behavior*. 2015;152:381-8.
86. Rother KI, Conway EM, Sylvestry AC. How Non-nutritive Sweeteners Influence Hormones and Health. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(7):455-67.
87. Shum B, Georgia S. The Effects of Non-Nutritive Sweetener Consumption in the Pediatric Populations: What We Know, What We Don't, and What We Need to Learn. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:625415.
88. Imamura F, O'Connor L, Ye Z, Mursu J, Hayashino Y, Bhupathiraju SN, et al. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *BMJ*. 2015:h3576.
89. Higgins KA, Mattes RD. A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with overweight or obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2019;109(5):1288-301.
90. Reid M, Hammersley R, Hill AJ, Skidmore P. Long-term dietary compensation for added sugar: effects of supplementary sucrose drinks over a 4-week period. *British Journal of Nutrition*. 2007;97(1):193-203.
91. Reid M, Hammersley R, Duffy M. Effects of sucrose drinks on macronutrient intake, body weight, and mood state in overweight women over 4 weeks. *Appetite*. 2010;55(1):130-6.
92. Abou-Donia MB, El-Masry EM, Abdel-Rahman AA, McLendon RE, Schiffman SS. Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71(21):1415-29.
93. Brusick D, Borzelleca JF, Gallo M, Williams G, Kille J, Wallace Hayes A, et al. Expert panel report on a study of Splenda in male rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2009;55(1):6-12.

94. Palmnäs MSA, Cowan TE, Bomhof MR, Su J, Reimer RA, Vogel HJ, et al. Low-Dose Aspartame Consumption Differentially Affects Gut Microbiota-Host Metabolic Interactions in the Diet-Induced Obese Rat. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e109841.
95. Suez J, Cohen Y, Valdés-Mas R, Mor U, Dori-Bachash M, Federici S, et al. Personalized microbiome-driven effects of non-nutritive sweeteners on human glucose tolerance. *Cell*. 2022;185(18):3307-28.e19.
96. Farid A, Hesham M, El-Dewak M, Amin A. The hidden hazardous effects of stevia and sucralose consumption in male and female albino mice in comparison to sucrose. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2020;28(10):1290-300.
97. Rogers PJ, Appleton KM. The effects of low-calorie sweeteners on energy intake and body weight: a systematic review and meta-analyses of sustained intervention studies. *International Journal of Obesity*. 2021;45(3):464-78.
98. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Brito-Córdova GX, Gómez Díaz RA, Vilchis Valentín D, Almeda-Valdes P. Effects of the Non-Nutritive Sweeteners on Glucose Metabolism and Appetite Regulating Hormones: Systematic Review of Observational Prospective Studies and Clinical Trials. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161264.
99. Cirilo de Lima RBeS, Gabriela. Avaliação dos conflitos de interesses financeiros em publicações sobre o consumo de edulcorantes de alta intensidade e alterações do peso corporal: uma revisão sistemática. [Dissertação]. In press 2020.
100. Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary Intake and the Development of the Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2008;117(6):754-61.
101. Nettleton JA, Lutsey PL, Wang Y, Lima JA, Michos ED, Jacobs DR. Diet Soda Intake and Risk of Incident Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care*. 2009;32(4):688-94.
102. Duffey KJ, Steffen LM, Van Horn L, Jacobs DR, Popkin BM. Dietary patterns matter: diet beverages and cardiometabolic risks in the longitudinal Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;95(4):909-15.
103. Field AE, Sonneville KR, Falbe J, Flint A, Haines J, Rosner B, et al. Association of sports drinks with weight gain among adolescents and young adults. *Obesity*. 2014;22(10):2238-43.
104. O'Connor L, Imamura F, Lentjes MAH, Khaw K-T, Wareham NJ, Forouhi NG. Prospective associations and population impact of sweet beverage intake and type 2 diabetes, and effects of substitutions with alternative beverages. *Diabetologia*. 2015;58(7):1474-83.
105. Smith JD, Hou T, Hu FB, Rimm EB, Spiegelman D, Willett WC, et al. A Comparison of Different Methods for Evaluating Diet, Physical Activity, and Long-Term Weight Gain in 3 Prospective Cohort Studies. *The Journal of Nutrition*. 2015;145(11):2527-34.
106. Huang M, Qudus A, Stinson L, Shikany JM, Howard BV, Kutob RM, et al. Artificially sweetened beverages, sugar-sweetened beverages, plain water, and incident diabetes mellitus in postmenopausal women: the prospective Women's Health Initiative observational study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2017;106(2):614-22.
107. Gearon E, Peeters A, Ng W, Hodge A, Backholer K. Diet and physical activity as possible mediators of the association between educational attainment and body mass index gain among Australian adults. *International Journal of Public Health*. 2018;63(7):883-93.
108. Malik VS, Li Y, Pan A, De Koning L, Schernhammer E, Willett WC, et al. Long-Term Consumption of Sugar-Sweetened and Artificially Sweetened Beverages and Risk of Mortality in US Adults. *Circulation*. 2019;139(18):2113-25.
109. Hirahatake KM, Jacobs DR, Shikany JM, Jiang L, Wong ND, Steffen LM, et al. Cumulative intake of artificially sweetened and sugar-sweetened beverages and risk of incident type 2 diabetes in young adults: the Coronary Artery Risk Development In Young Adults (CARDIA) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2019;110(3):733-41.
110. Hinkle SN, Rawal S, Bjerregaard AA, Halldorsson TI, Li M, Ley SH, et al. A prospective study of artificially sweetened beverage intake and cardiometabolic health among women at high risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2019;110(1):221-32.
111. Debras C, Chazelas E, Sellem L, Porcher R, Druesne-Pecollo N, Essedik Y, et al. Artificial sweeteners and risk of cardiovascular diseases: results from the prospective NutriNet-Santé cohort. *BMJ*. 2022:e071204.
112. Rogers PJ, Carlyle J-A, Hill AJ, Blundell JE. Uncoupling sweet taste and calories: Comparison of the effects of glucose and three intense sweeteners on hunger and food intake. *Physiology & Behavior*. 1988;43(5):547-52.

113. Frankenfeld CL, Sikaroodi M, Lamb E, Shoemaker S, Gillevet PM. High-intensity sweetener consumption and gut microbiome content and predicted gene function in a cross-sectional study of adults in the United States. *Annals of Epidemiology*. 2015;25(10):736-42.e4.
114. Higgins KA, Considine RV, Mattes RD. Aspartame Consumption for 12 Weeks Does Not Affect Glycemia, Appetite, or Body Weight of Healthy, Lean Adults in a Randomized Controlled Trial. *The Journal of Nutrition*. 2018;148(4):650-7.
115. Madjd A, Taylor MA, Delavari A, Malekzadeh R, Macdonald IA, Farshchi HR. Effects on weight loss in adults of replacing diet beverages with water during a hypoenergetic diet: a randomized, 24-wk clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2015;102(6):1305-12.
116. Madjd A, Taylor MA, Delavari A, Malekzadeh R, Macdonald IA, Farshchi HR. Beneficial effects of replacing diet beverages with water on type 2 diabetic obese women following a hypo-energetic diet: A randomized, 24-week clinical trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2017;19(1):125-32.
117. Tey SL, Salleh NB, Henry J, Forde CG. Effects of aspartame-, monk fruit-, stevia- and sucrose-sweetened beverages on postprandial glucose, insulin and energy intake. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41(3):450-7.
118. Casperson SL, Johnson L, Roemmich JN. The relative reinforcing value of sweet versus savory snack foods after consumption of sugar- or non-nutritive sweetened beverages. *Appetite*. 2017;112:143-9.
119. Madjd A, Taylor MA, Delavari A, Malekzadeh R, Macdonald IA, Farshchi HR. Effects of replacing diet beverages with water on weight loss and weight maintenance: 18-month follow-up, randomized clinical trial. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(4):835-40.
120. Crézé C, Candal L, Cros J, Knebel J-F, Seyssel K, Stefanoni N, et al. The Impact of Caloric and Non-Caloric Sweeteners on Food Intake and Brain Responses to Food: A Randomized Crossover Controlled Trial in Healthy Humans. *Nutrients*. 2018;10(5):615.
121. Yunker AG, Alves JM, Luo S, Angelo B, Defendis A, Pickering TA, et al. Obesity and Sex-Related Associations With Differential Effects of Sucralose vs Sucrose on Appetite and Reward Processing. *JAMA Network Open*. 2021;4(9):e2126313.
122. Swithers SE, Laboy AF, Clark K, Cooper S, Davidson TL. Experience with the high-intensity sweetener saccharin impairs glucose homeostasis and GLP-1 release in rats. *Behavioural Brain Research*. 2012;233(1):1-14.
123. Mitsutomi K, Masaki T, Shimasaki T, Gotoh K, Chiba S, Kakuma T, et al. Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism: clinical and experimental*. 2014;63 1:69-78.
124. Bissonnette DJ, List S, Knoblich P, Hadley M. The Effect of Nonnutritive Sweeteners Added to a Liquid Diet on Volume and Caloric Intake and Weight Gain in Rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25(9):1556-63.
125. Barrios-Correa AA, Estrada JA, Martel C, Olivier M, López-Santiago R, Contreras I. Chronic Intake of Commercial Sweeteners Induces Changes in Feeding Behavior and Signaling Pathways Related to the Control of Appetite in BALB/c Mice. *Biomed Res Int*. 2018;2018:3628121.
126. Zhao X, Yan J, Chen K, Song L, Sun B, Wei X. Effects of saccharin supplementation on body weight, sweet receptor mRNA expression and appetite signals regulation in post-weanling rats. *Peptides*. 2018;107:32-8.
127. Azeez OH, Alkass SY, Persike DS. Long-Term Saccharin Consumption and Increased Risk of Obesity, Diabetes, Hepatic Dysfunction, and Renal Impairment in Rats. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(10).
128. Aoyama K, Nagano A. Effects of Saccharin Consumption on Operant Responding for Sugar Reward and Incubation of Sugar Craving in Rats. *Foods*. 2020;9(12):1823.
129. Tordoff MG. How do non-nutritive sweeteners increase food intake? *Appetite*. 1988;11 Suppl 1:5-11.
130. Shearer J, Swithers SE. Artificial sweeteners and metabolic dysregulation: Lessons learned from agriculture and the laboratory. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2016;17(2):179-86.
131. Fowler SPG. Low-calorie sweetener use and energy balance: Results from experimental studies in animals, and large-scale prospective studies in humans. *Physiology & Behavior*. 2016;164:517-23.
132. Murray S, Tulloch A, Criscitelli K, Avena NM. Recent studies of the effects of sugars on brain systems involved in energy balance and reward: Relevance to low calorie sweeteners. *Physiology & Behavior*. 2016;164:504-8.
133. Rogers PJ. The role of low-calorie sweeteners in the prevention and management of overweight and obesity: evidence v. conjecture. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2018;77(3):230-8.
134. Swithers SE, Sample CH, Davidson TL. Adverse effects of high-intensity sweeteners on energy intake and weight control in male and obesity-prone female rats. *Behav Neurosci*. 2013;127(2):262-74.
135. Walbolt J, Koh Y. Non-nutritive Sweeteners and Their Associations with Obesity and Type 2 Diabetes. *J Obes Metab Syndr*. 2020;29(2):114-23.

136. Brown RJ, De Banate MA, Rother KI. Artificial Sweeteners: A systematic review of metabolic effects in youth. *International Journal of Pediatric Obesity*. 2010;5(4):305-12.
137. Ahmad R, Dalziel JE. G Protein-Coupled Receptors in Taste Physiology and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11(1771).
138. Depoortere I. Taste receptors in the gut tune the release of peptides in response to nutrients. *Peptides*. 2015;66:9-12.
139. Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJP, Zuker CS. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*. 2006;444(7117):288-94.
140. Lee AA, Owyang C. Chapter 16 - Sugars, sweet taste receptors, and brain responses. In: Patel VB, editor. *Molecular Nutrition: Carbohydrates*: Academic Press; 2019. p. 265-83.
141. Freund JR, Lee RJ. Taste receptors in the upper airway. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2018;4(1):67-76.
142. von Molitor E, Riedel K, Krohn M, Hafner M, Rudolf R, Cesetti T. Sweet Taste Is Complex: Signaling Cascades and Circuits Involved in Sweet Sensation. *Front Hum Neurosci*. 2021;15:667709-.
143. Max M, Shanker YG, Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, et al. Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nature Genetics*. 2001;28(1):58-63.
144. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJP, Zuker CS. Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell*. 2001;106(3):381-90.
145. Montmayeur J-P, Liberles SD, Matsunami H, Buck LB. A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nature Neuroscience*. 2001;4(5):492-8.
146. Yang L, Cui M, Liu B. Current Progress in Understanding the Structure and Function of Sweet Taste Receptor. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2021;71(2):234-44.
147. Servant G, Kenakin T, Zhang L, Williams M, Servant N. Chapter Three - The function and allosteric control of the human sweet taste receptor. In: Langmead CJ, editor. *Advances in Pharmacology*. 88: Academic Press; 2020. p. 59-82.
148. Lee A, Owyang C. Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses. *Nutrients*. 2017;9(7):653.
149. Laffitte A, Neiers F, Briand L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2014;17(4):379-85.
150. Meyer-Gerspach AC, Wölnerhanssen B, Beglinger C. Gut sweet taste receptors and their role in metabolism. *Front Horm Res*. 2014;42:123-33.
151. Kokrashvili Z, Mosinger B, Margolskee RF. Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(3):822s-5s.
152. Dyer J, Salmon KS, Zibrik L, Shirazi-Beechey SP. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 1):302-5.
153. Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Medina A, Nagasawa M. Sweet Taste-Sensing Receptors Expressed in Pancreatic β -Cells: Sweet Molecules Act as Biased Agonists. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2014;29(1):12-9.
154. Medina A, Nakagawa Y, Ma J, Li L, Hamano K, Akimoto T, et al. Expression of the glucose-sensing receptor T1R3 in pancreatic islet: changes in the expression levels in various nutritional and metabolic states. *Endocr J*. 2014;61(8):797-805.
155. Nakagawa Y, Nagasawa M, Mogami H, Lohse M, Ninomiya Y, Kojima I. Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocr J*. 2013;60(10):1191-206.
156. Shil A, Olusanya O, Ghufloor Z, Forson B, Marks J, Chichger H. Artificial Sweeteners Disrupt Tight Junctions and Barrier Function in the Intestinal Epithelium through Activation of the Sweet Taste Receptor, T1R3. *Nutrients*. 2020;12(6).
157. Wang Q-P, Yong, Zhang L, Yana, Lisa, Cotterell J, et al. Sucralose Promotes Food Intake through NPY and a Neuronal Fasting Response. *Cell Metabolism*. 2016;24(1):75-90.
158. Mora MR, Dando R. The sensory properties and metabolic impact of natural and synthetic sweeteners. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021;20(2):1554-83.
159. McCrickerd K, Forde CG. Sensory influences on food intake control: moving beyond palatability. *Obesity Reviews*. 2016;17(1):18-29.
160. Mattes RD, Popkin BM. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(1):1-14.
161. Van Opstal AM, Kaal I, Van Den Berg-Huysmans AA, Hoeksma M, Blonk C, Pijl H, et al. Dietary sugars and non-caloric sweeteners elicit different homeostatic and hedonic responses in the brain. *Nutrition*. 2019;60:80-6.

162. Kashima N, Kimura K, Nishitani N, Yamaoka Endo M, Fukuba Y, Kashima H. Suppression of Oral Sweet Sensations during Consumption of Sweet Food in Humans: Effects on Gastric Emptying Rate, Glycemic Response, Appetite, Food Satisfaction and Desire for Basic Tastes. *Nutrients*. 2020;12(5):1249.
163. Sasaki T. Neural and Molecular Mechanisms Involved in Controlling the Quality of Feeding Behavior: Diet Selection and Feeding Patterns. *Nutrients*. 2017;9(10):1151.
164. Hopkins M, Blundell J, Halford JC, King N, Finlayson G. The Regulation of Food Intake in Humans. 2016.
165. Halford JCG, Harrold JA. Satiety-enhancing products for appetite control: science and regulation of functional foods for weight management. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2012;71(2):350-62.
166. Davidson TL, Sample CH, Swithers SE. An application of Pavlovian principles to the problems of obesity and cognitive decline. *Neurobiol Learn Mem*. 2014;108:172-84.
167. Davidson TL, Swithers SE. A Pavlovian approach to the problem of obesity. *International Journal of Obesity*. 2004;28(7):933-5.
168. Swithers SE, Davidson TL. A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behav Neurosci*. 2008;122(1):161-73.
169. Swithers SE, Martin AA, Davidson TL. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiol Behav*. 2010;100(1):55-62.
170. Maersk M, Belza A, Holst JJ, Fenger-Grøn M, Pedersen SB, Astrup A, et al. Satiety scores and satiety hormone response after sucrose-sweetened soft drink compared with isocaloric semi-skimmed milk and with non-caloric soft drink: a controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2012;66(4):523-9.
171. Luquet SH, Vaudry H, Granata R. Editorial: Neuroendocrine Control of Feeding Behavior. *Frontiers in endocrinology*. 2019;10:399-.
172. Kohno D, Koike M, Ninomiya Y, Kojima I, Kitamura T, Yada T. Sweet Taste Receptor Serves to Activate Glucose- and Leptin-Responsive Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus and Participates in Glucose Responsiveness. *Frontiers in Neuroscience*. 2016;10(502).
173. Swithers SE. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2013;24:431-41.
174. Domingos AI, Sordillo A, Dietrich MO, Liu Z-W, Tellez LA, Vaynshteyn J, et al. Hypothalamic melanin concentrating hormone neurons communicate the nutrient value of sugar. *Elife* [Internet]. 2013 2013/12//; 2:[e01462 p.]. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/24381247>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24381247/pdf/?tool=EBI>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24381247/?tool=EBI>
<https://doi.org/10.7554/eLife.01462>
<https://europepmc.org/articles/PMC3875383>
<https://europepmc.org/articles/PMC3875383?pdf=render>.
175. Rolls ET. The orbitofrontal cortex, food reward, body weight and obesity. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*. 2021.
176. Ruiz-Ojeda FJ, Plaza-Díaz J, Sáez-Lara MJ, Gil A. Effects of Sweeteners on the Gut Microbiota: A Review of Experimental Studies and Clinical Trials. *Advances in Nutrition*. 2019;10(suppl_1):S31-S48.
177. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*. 2020;12(5):1474.
178. Bian X, Chi L, Gao B, Tu P, Ru H, Lu K. The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLOS ONE*. 2017;12(6):e0178426.
179. Uebanso T, Ohnishi A, Kitayama R, Yoshimoto A, Nakahashi M, Shimohata T, et al. Effects of Low-Dose Non-Caloric Sweetener Consumption on Gut Microbiota in Mice. *Nutrients*. 2017;9(6):560.
180. Falcon T, Foletto KC, Siebert M, Pinto DE, Andrades M, Bertoluci MC. Metabarcoding reveals that a non-nutritive sweetener and sucrose yield similar gut microbiota patterns in Wistar rats. *Genet Mol Biol*. 2020;43(1):e20190028.
181. Ahmad SY, Friel J, Mackay D. The Effects of Non-Nutritive Artificial Sweeteners, Aspartame and Sucralose, on the Gut Microbiome in Healthy Adults: Secondary Outcomes of a Randomized Double-Blinded Crossover Clinical Trial. *Nutrients*. 2020;12(11).
182. Tey SL, Salleh NB, Henry CJ, Forde CG. Effects of non-nutritive (artificial vs natural) sweeteners on 24-h glucose profiles. *Eur J Clin Nutr*. 2017;71(9):1129-32.
183. Magnuson BA, Burdock GA, Doull J, Kroes RM, Marsh GM, Pariza MW, et al. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Crit Rev Toxicol*. 2007;37(8):629-727.

184. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
185. Liauchonak I, Qorri B, Dawoud F, Riat Y, Szewczuk M. Non-Nutritive Sweeteners and Their Implications on the Development of Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2019;11(3):644.
186. Schiano C, Grimaldi V, Scognamiglio M, Costa D, Soricelli A, Nicoletti GF, et al. Soft drinks and sweeteners intake: Possible contribution to the development of metabolic syndrome and cardiovascular diseases. Beneficial or detrimental action of alternative sweeteners? *Food Research International*. 2021;142:110220.
187. Simon BR, Parlee SD, Learman BS, Mori H, Scheller EL, Cawthorn WP, et al. Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors. *J Biol Chem*. 2013;288(45):32475-89.
188. Simon BR, Learman BS, Parlee SD, Scheller EL, Mori H, Cawthorn WP, et al. Sweet taste receptor deficient mice have decreased adiposity and increased bone mass. *PLoS One*. 2014;9(1):e86454.
189. Kundu N, Domingues CC, Patel J, Aljishi M, Ahmadi N, Fakhri M, et al. Sucralose promotes accumulation of reactive oxygen species (ROS) and adipogenesis in mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):250.
190. Kundu N, Domingues CC, Abel BS, Ahmadi N, Patel JJ, Sylvestsky A, et al., editors. Low Calorie Sweeteners Alter Glucose Uptake and Promote Adipogenesis in Human Fat Biopsy-Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) in-Vitro and in Subjects' Subcutaneous Fat 2017.
191. Gardner C. Non-nutritive sweeteners: evidence for benefit vs. risk. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(1):80-4.

8. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Verificamos que a sacarina promove ganho de peso, de modo não dependente da dose, e não relacionado ao consumo calórico total.

Diferente de outros estudos, que também utilizaram um carboidrato associado, nosso modelo experimental não foi capaz reproduzir a longo prazo insulinoresistência ou intolerância à glicose. Conjecturamos que o modelo animal utilizado possa ter contribuído para essa divergência.

Na análise dos parâmetros relacionados à microestrutura alimentar e na dinâmica comportamental, verificamos que a sacarina não é inócua, apesar de não ter contribuído para um consumo alimentar superior ao controle. Especialmente na dose máxima de sacarina, os micro-parâmetros (bouts) foram mais afetados nas primeiras semanas de intervenção. Entretanto, não afetou o tamanho, a frequência ou a duração das refeições.

Curiosamente, ambos os grupos apresentaram uma taxa maior e ascendente no que diz respeito ao intervalo entre as refeições – denotando um parâmetro de saciedade, quando avaliado isoladamente. Todavia, na análise da dinâmica comportamental, a taxa de saciedade não diferiu entre os grupos.

Até o momento, este é o primeiro estudo a abordar a relação dose-resposta com uso de sacarina de elevado teor de pureza nos parâmetros relacionados ao comportamento alimentar, ganho de peso corporal, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. Utilizamos glicose associada à intervenção, e disponível continuamente a fim de evidenciar possíveis efeitos metabólicos adversos da sacarina. Com base em uma série de estudos prévios nesta linha de pesquisa, equiparamos o teor de sódio da dieta de intervenção a fim de reduzir possíveis vieses relacionados ao desfecho de interesse principal – a evolução do ganho de peso.

Presumimos que a magnitude no ganho de peso não tenha sido correspondente à dose devido o teor de glicose administrada em conjunto ter sido igual entre os grupos.

Por fim, estes resultados fornecem evidência de que a sacarina não é inerte ao metabolismo, pelo menos neste modelo experimental. Possíveis mecanismos, não abordados neste estudo, podem justificar o maior ganho de peso.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudos futuros podem determinar se doses progressivas de sacarina, associadas a uma dose proporcional de glicose (efeito sinérgico), podem impactar diferencialmente o peso corporal e a glicemia em indivíduos saudáveis e em populações específicas. Além disso, estudos bem desenhados e controlados são necessários para elucidar possíveis mecanismos subjacentes envolvidos e a reprodutibilidade desses achados em humanos.

10. ANEXOS

ANEXO I – Parecer de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 2019/0404

Título: Efeito do uso prolongado e progressivo de sacarina no metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina de ratos Wistar

Pesquisador Responsável: MARCELLO CASACCIA BERTOLUCI

Equipe de Pesquisa:

DENISE ENTRUDO PINTO

DAISY CRISPIM MOREIRA

KELLY CARRARO FOLETTO

Data de Aprovação: 29/07/2019

Data de Término: 30/08/2020

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
RATO HETEROGÊNICO	M/45 Dia(s)	42	23/07/2019	Projeto

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

ANEXO II – Comprovante de submissão do ARTIGO I

Appetite Journal, Elsevier. ISSN: 0195-6663 (print); 1095-8304 (web).



The screenshot shows the 'Submissions Being Processed for Author' page in the Appetite journal submission system. The page includes a navigation bar with 'Home', 'Main Menu', 'Submit a Manuscript', 'About', and 'Help'. Below the navigation bar, there is a table with the following columns: 'Action Links', 'Manuscript Number', 'Title', 'Initial Date Submitted', 'Status Date', and 'Current Status'. The table contains one entry with the manuscript number 'APPETITE-D-22-01196' and the title 'Saccharin added to glucose induced more weight gain than glucose alone in Wistar rats, through a non-dose-dependent effect, and not related to insulin resistance'. The submission date is 'Oct 26, 2022' and the status is 'Submitted to Journal'.

Action Links	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
	APPETITE-D-22-01196	Saccharin added to glucose induced more weight gain than glucose alone in Wistar rats, through a non-dose-dependent effect, and not related to insulin resistance	Oct 26, 2022	Oct 26, 2022	Submitted to Journal

Appetite

Saccharin added to glucose induced more weight gain than glucose alone in Wistar rats, through a non-dose-dependent effect, and not related to insulin resistance
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Section/Category:	Nutrition
Keywords:	saccharin; non-nutritive sweeteners, weight gain; overweight; energy intake; glucose metabolism; insulin resistance
Corresponding Author:	Marcello Casaccia Bertoluci, MD, PhD Federal University of Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS BRAZIL
First Author:	Kelly Carraro Foletto, RD, PhD
Order of Authors:	Kelly Carraro Foletto, RD, PhD Marcello Casaccia Bertoluci, MD, PhD

The ARRIVE guidelines – Animal research: reporting of *in vivo* experiments.



The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design 1	For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). 	(a) Yes, the control group was included. Section 2.2. Dietary intervention: Table 1 and 2.1. Design and Animals (b) Section 2.1.3. Animal housing
Sample size 2	<ol style="list-style-type: none"> Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done. 	(a) Section 2.1. Design and Animals (n = 42 rats) and Table 1 (n = 13-15/group) (b) Section 2.1.1. Sample size
Inclusion and exclusion criteria 3	<ol style="list-style-type: none"> Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i>. If no criteria were set, state this explicitly. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group. 	(a) Section 2.1.3. Animal housing (last phrase) (b) Section 3. Results (c) In all figure captions
Randomisation 4	<ol style="list-style-type: none"> State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly. 	(a) Section 2.1.2. Randomization (b) Section 2.1.2. Randomization
Blinding 5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	Section 2.2. Dietary intervention (last paragraph)
Outcome measures 6	<ol style="list-style-type: none"> Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was 	(a) In sections: 2.3. Measurements of food and water intake, 2.4. Weight gain measurement and 2.5. Metabolic tests

		used to determine the sample size.	(b) Section 2.1.1. Sample size
Statistical methods	7	<p>a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used.</p> <p>b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.</p>	<p>(a) Section 2.7. Statistical analysis</p> <p>(b) Section 2.7. Statistical analysis</p>
Experimental animals	8	<p>a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight.</p> <p>b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.</p>	<p>(a) Section 2.1. Design and Animals</p> <p>(b) Section 2.1. Design and Animals</p>
Experimental procedures	9	<p>For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:</p> <p>a. What was done, how it was done and what was used.</p> <p>b. When and how often.</p> <p>c. Where (including detail of any acclimatisation periods).</p> <p>d. Why (provide rationale for procedures).</p>	<p>(a) Throughout the Methods section</p> <p>(b) Throughout the Methods section</p> <p>(c) Section 2.1.3. Animal housing and "Protocol and ethical aspects" (UEA)</p> <p>(d) Section 1. Introduction</p>
Results	10	<p>For each experiment conducted, including independent replications, report:</p> <p>a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range).</p> <p>b. If applicable, the effect size with a confidence interval.</p>	<p>(a) Section 3. Results and "Figure captions"</p> <p>(b) Not applicable</p>

The Recommended Set

These items complement the Essential 10 and add important context to the study. Reporting the items in both sets represents best practice.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Abstract	11 Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.	Abstract section
Background	12 <p>a. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach.</p> <p>b. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.</p>	<p>(a) Section 1. Introduction</p> <p>(b) Sequential to a series of previous works developed by our research group with the same experimental model. Section 1. Introduction</p>
Objectives	13 Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.	Section 1. Introduction
Ethical statement	14 Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.	Section "Protocol and ethical aspects"

Housing and husbandry	15	Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.	Section 2.1.3. Animal housing
Animal care and monitoring	16	<ul style="list-style-type: none"> a. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering and distress. b. Report any expected or unexpected adverse events. c. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this. 	<ul style="list-style-type: none"> (a) Trained researchers, adaptation/ habituation, daily assessment, environmental enrichment, transparent boxes (Section 2.1.3. Animal housing). Humane endpoint (Section "Protocol and ethical aspects") (b) Section "Protocol and ethical aspects": last paragraph (c) Section "Protocol and ethical aspects"
Interpretation/ scientific implications	17	<ul style="list-style-type: none"> a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results. 	<ul style="list-style-type: none"> (a) Section 4. Discussion (b) Section 4. Discussion
Generalisability/ translation	18	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).	Section 5. Conclusion
Protocol registration	19	Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.	Protocol approved in 2019 under n. 2019-0404. Described in section "Protocol and ethical aspects"
Data access	20	Provide a statement describing if and where study data are available.	Section "Data and code availability"
Declaration of interests	21	<ul style="list-style-type: none"> a. Declare any potential conflicts of interest, including financial and non-financial. If none exist, this should be stated. b. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis and reporting of the study. 	<ul style="list-style-type: none"> (a) Section "Competing interests" (b) Section "Funding sources"

ANEXO IV – ARRIVE *guideline*, ARTIGO II

The ARRIVE guidelines – Animal research: reporting of *in vivo* experiments.



The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design	1 For each experiment, provide brief details of study design including: c. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. d. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).	(a) Yes, control group included. Section 2.3. Dietary manipulation, and Table 1 (b) Section 2.2. Animals
Sample size	2 c. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. d. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done	(a) Section 2.2. Animals (n = 42 rats) and Table 1 (n = 13-15/group) (b) Section 2.1.2. Sample size
Inclusion and exclusion criteria	3 d. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i> . If no criteria were set, state this explicitly. e. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. f. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group.	(a) Section 2.2.1. Exclusion criterion (b) Section 3. Results (c) In all "Figure captions" and Table 1
Randomisation	4 a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	(a) Section 2.2. Animals (b) Sections 2.2. Animals and 2.3.1. Blinding
Blinding	5 Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	Section 2.3.1. Blinding
Outcome measures	6 c. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). d. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.	(a) Section 2.4.1. Parameters in feeding microstructure (b) Section 2.2.2. Sample size
Statistical methods	7 c. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. d. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.	(a) Section 2.6. Statistical analysis (b) Section 2.6. Statistical analysis

Experimental animals	8	c. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. d. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	(a) Section 2.2. Animals (b) Section 2.2. Animals
Experimental procedures	9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: a. What was done, how it was done and what was used. b. When and how often. c. Where (including detail of any acclimatisation periods). d. Why (provide rationale for procedures).	(a) Throughout the Materials and methods section (b) Throughout the Materials and methods section (c) Section 2.2. Animals (d) Section 1. Introduction
Results	10	For each experiment conducted, including independent replications, report: c. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). d. If applicable, the effect size with a confidence interval.	(a) Section 2.6. Statistical analysis, 3. Results, and "Figure captions" (b) Not applicable

The Recommended Set

These items complement the Essential 10 and add important context to the study. Reporting the items in both sets represents best practice.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Abstract	11 Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.	Abstract section
Background	12 c. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach. d. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.	(a) Section 1. Introduction (b) Sequential to previous work (2.1. Study design) and section 1. Introduction
Objectives	13 Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.	Section 1. Introduction and Abstract
Ethical statement	14 Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.	Sections "Ethical aspects" and 2.1. Study design
Housing and husbandry	15 Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.	Section 2.2. Animals
Animal care and monitoring	16 d. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering and distress. e. Report any expected or unexpected adverse events. f. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this.	(a) Trained researchers, adaptation/ habituation, daily assessment, environmental enrichment, transparent boxes (sections "Ethical aspects", 2.2. Animals, and 2.2.1. Exclusion criterion) (b) Section "Ethical aspects" (c) Section "Ethical aspects"

Interpretation/ scientific implications	17	<p>c. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature.</p> <p>d. Comment on the study limitations including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results.</p>	<p>(a) Section 4. Discussion</p> <p>(b) Section 4. Discussion</p>
Generalisability/ translation	18	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).	Section 5. Conclusion
Protocol registration	19	Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.	Protocol approved in 2019 under n. 2019-0404. Described in sections 2.1. Study design and “Ethical aspects”
Data access	20	Provide a statement describing if and where study data are available.	Section “Data and code availability”
Declaration of interests	21	<p>c. Declare any potential conflicts of interest, including financial and non-financial. If none exist, this should be stated.</p> <p>d. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis and reporting of the study.</p>	<p>(a) Section “Competing interests”</p> <p>(b) Section “Funding sources”</p>