

NIVELES DE INGESTA DIARIA DE EDULCORANTES NO NUTRITIVOS EN ESCOLARES DE LA REGIÓN DE VALPARAÍSO

DAILY CONSUMPTION LEVELS OF NON-NUTRITIVE SWEETENERS IN SCHOOL AGE CHILDREN FROM THE VALPARAISO REGION

Samuel Durán A., María Quijada M., Loreto Silva V., Nazarena Almonacid M., María Berlanga Z, María Rodríguez N.

Carrera de Nutrición y Dietética
Universidad Autónoma de Chile, Universidad Santo Tomás, Sede Viña del Mar. Viña del Mar, Chile.

ABSTRACT

Introduction: Artificial sweeteners are substances that do not provide energy and are added to foods to provide a sweet taste. Sweeteners are used to replace sugar either in part or entirely. Objective: To determine the consumption of artificial sweeteners in school children 6 to 14 years of age in the Valparaiso Region of Chile and to compare consumption according to nutritional status. Methods: 281 students of both sexes underwent anthropometric assessment (weight and height) and completed a food survey on the consumption of sweeteners. Results: 100% of students consume foods or products containing artificial sweeteners, although no student consumed more than the maximum allowed. When comparing by nutritional status, obese children, compared to those with normal weight had a higher consumption of sucralose, aspartame, saccharin and acesulfame potassium ($p < 0.05$). Conclusion: The intake of sweeteners is massive, but consumption does not exceed permitted levels in this study sample. Keys words: artificial sweeteners, saccharin, aspartame, nutritional status, students.

Este trabajo fue recibido el 1 de Marzo de 2011 y aceptado para ser publicado el 29 de Agosto de 2011.

EDULCORANTES ARTIFICIALES

Desde tiempos ancestrales la humanidad ha tenido una marcada preferencia hacia los alimentos dulces (1). A fines del siglo XVII una nueva idea se apoderó de la comunidad médica. Se decía que el azúcar era responsable de provocar muchas enfermedades y ante esta situación surgió la necesidad de buscar un aditivo que pudiera sustituir el azúcar, proporcionando las mismas cualidades y sensaciones que producía el azúcar. Es así como nacen los edulcorantes, aditivos alimentarios que son capaces de simular la presencia del azúcar al agregar a los alimentos (1).

Los edulcorantes artificiales han ganado espacio como herramientas de la dieta (2) ya que proporcionan el sabor dulce del azúcar, pero sin el aporte calórico de esta, por lo tanto pueden ayudar a bajar de peso y a la adhesión de una dieta baja en calorías. Los edulcorantes utilizados en la industria alimentaria están divididos en 2 grandes grupos: Edulcorantes naturales o nutritivos y edulcorantes artificiales o no nutritivos (1).

El primer edulcorante artificial utilizado fue la sacarina la cual fue descubierta por Constantino Fahlberg en 1879, en Estados Unidos. Se utilizó principalmente a nivel industrial y como parte de la alimentación de los diabéticos. Entre los edulcorantes no nutritivos de mayor consumo podemos nombrar a:

Sacarina de sodio: es el edulcorante más antiguo. Esta es una sulfamida, cuyo átomo de hidrogeno es algo ácido y forma sales fácilmente. La sacarina es aproximadamente 300 veces más dulce que el azúcar y no aporta calorías (3).

Ciclamato de sodio: en 1937 fue descubierto en Estados Unidos. Es la sal sódica y cálcica del ácido ciclámico presenta una elevada solubilidad en agua. Es 30 a 50 veces más dulce que el azúcar. Es el edulcorante menos intenso por lo que para aumentar su poder endulzante se mezcla con sacarina sódica y así se logra un producto más dulce (3).

Aspartamo: es descubierto en el año 1965. Es un edulcorante artificial compuesto por un metil ester de un

dipéptido formado por el ácido L – aspártico y L – fenilalanina. Es 180 y 200 veces más dulce que el azúcar y aporta 4 calorías por gramo (3).

Sucralosa: edulcorante artificial descubierto en 1976, compuesto de 1,6 dicloro – 1,6 dideoxy - β- D-fructofuranosil – 4 - cloro – 4 deoxy - αD – galactopiranosido, obtenido por la halogenación selectiva de la molécula de sacarosa. Es 600 veces más dulce que el azúcar, no contiene aporte energético (3).

Estevia: Stevia rebudiada es una planta selvática subtropical del alto Paraná, nativa del noroeste de la provincia de Misiones, en Paraguay, donde era utilizada por los nativos como medicina curativa. La planta de stevia produce en las hojas un edulcorante natural, cuyo poder es 300 veces mayor que la sacarosa. No contiene calorías y además, las hojas pueden utilizarse en su estado natural, gracias a su gran poder edulcorante, y sólo son necesarias pequeñas cantidades del producto (4-6).

En Chile el uso de edulcorantes artificiales está regulado por el Reglamento Sanitario de los Alimentos, específicamente en el artículo 1467. Adicionalmente, en el caso de empleo del aspartamo, se deberá indicar en forma destacada en la rotulación: “Fenilcetonúricos; contiene fenilalanina” (7).

EDULCORANTES ARTIFICIALES Y RIESGOS PARA LA SALUD

El papel de los edulcorantes en el riesgo de cáncer ha sido ampliamente debatido en las últimas décadas. Más de 50 estudios han sido publicados sobre la ingesta de sacarina en ratas de laboratorio (8,9). Aproximadamente en 20 grupos de estudio, se analizó el efecto de la sacarina en una generación de ratas que habían estado expuestos a altas dosis de sacarina por lo menos durante 1,5 años. Por lo general, las dosis administradas incluye una alta concentración de 5% de las diversas formas de la sacarina en la dieta. A excepción de un estudio, ninguno de los 20 grupos encontró significativamente más neoplasias en los animales alimentados con sacarina al ser comparados con los controles. El estudio positivo reportó una mayor incidencia de cánceres de vejiga (10).

Una asociación positiva con el consumo de edulcorantes artificiales fue encontrada más recientemente en un estudio de casos y controles en los Estados Unidos, donde un examen de 1860 casos de cáncer de vejiga y 3934 controles de base poblacional demostraron que el uso excesivo de edulcorantes artificiales se asoció con un grado superior de tumores (11).

Durante la última década, los edulcorantes artificiales y el posible riesgo de producir cáncer no se ha discutido como en años anteriores, aunque algunas de

las investigaciones sobre la sacarina y el ciclamato han sido recientemente completadas y publicadas (12).

Después que el ciclamato y el aspartamo habían entrado en el mercado de alimentos, enfermedades como el cáncer de vejiga no se podía vincular sólo al consumo de sacarina, porque la mayoría de los consumidores acostumbraban a ingerir diferentes edulcorantes artificiales (13). Con respecto al aspartamo, un estudio de cohorte en Estados Unidos no encontró ninguna asociación entre el aspartamo que contienen las bebidas dietéticas y el riesgo de algún tipo de cáncer (14). Asimismo un estudio realizado en Italia con 1010 casos de diferentes tipos de cáncer confirmado y 2107 controles, demostró que no existe una asociación entre el consumo de edulcorantes bajos en calorías (incluyendo el aspartamo) y el riesgo de cáncer (15).

Otros estudios refieren que los edulcorantes artificiales como el aspartamo y la sacarina son ampliamente utilizados y demuestran que los consumidores desconocen los efectos que ellos tienen sobre su apetito, sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal, es decir, que los alimentos y bebidas con edulcorantes no nutritivos podrían aumentar la ingesta de alimentos (16). Las aprobaciones de los edulcorantes de nueva generación (acesulfame-K, sucralosa, neotame y alitame) son demasiado recientes para establecer cualquier posible riesgo de cancer (17). El objetivo del estudio fue determinar los niveles de ingesta de edulcorantes no nutritivos consumidos en escolares y comparar su consumo según estado nutricional.

SUJETOS Y MÉTODOS

La muestra estudiada corresponde a 281 estudiantes de 6 a 14 años de edad de ambos sexos, que pertenecen a escuelas de la Región de Valparaíso (Valparaíso, Viña del Mar, Villa Alemana) de colegios municipalizados y particulares subvencionados. El tamaño de la muestral se calculó a partir del estudio de Arcella (15) con un intervalo de confianza del 95%, una potencia de un 90% y una precisión calculada como (media observada- valor recomendado).

Los criterios de inclusión fueron ser estudiante regular de 6 a 14 años y los de exclusión fueron ser estudiantes que presentaban enfermedades metabólicas, diabetes tipo 1, o que no habían completado los formularios.

PROCEDIMIENTOS

Encuestas

Se realizó un muestreo de los alimentos que contienen edulcorantes artificiales en el mercado chileno, a

través de visitas a supermercados de la región, con un total de 122 productos. Cada producto fue fotografiado y se incorporó a una presentación en power point, donde cada producto iba numerado. Se utilizó una encuesta de frecuencia de consumo de alimentos adaptada (solo aparecen alimentos que contienen edulcorantes) y validada para evaluar la ingesta de edulcorantes.

Las encuestas fueron aplicadas en las salas de clases mostrando la presentación en power point a los apoderados de los estudiantes de 6 a 9 años o a los alumnos de 10 a 14 años. Cada encuesta fue analizada utilizando el programa Excel. Para el análisis de las encuestas, se consideró el tipo y contenido de el o los edulcorantes de cada producto, el cual fue establecido a través del rotulado donde aparece la declaración de los aditivos por 100 g o 100 ml.

Antropometría

El peso y la talla se midieron utilizando una balanza electrónica de precisión (GAMMA ®) con una sensibilidad de 0,1 kg y un cartabón de pared (metodología de Frankfurt) con una sensibilidad de 0,5 cm. La evaluación nutricional se realizó por IMC/edad según la norma técnica de evaluación nutricional del niño de 6 a 18 años, año 2003 (18).

El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Santo Tomás sede Viña del Mar.

Estadística

Los datos fueron procesados en una planilla Excel y en el programa estadístico SPSS 15.0. Para evaluar la normalidad de las variables continuas (edad, peso, talla, ingesta) se utilizó la prueba de bondad de Shapiro Wilk's. Para las variables normales se utilizó la prueba

estadística Test t de Student y para las no normales Mann-Whitney U. Para las correlaciones de distribución normal se utilizó el test de Pearson y para las correlaciones de distribución no normal se utilizó Spearman. En todos los casos se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

La muestra estudiada incluyó a 281 estudiantes de ambos sexos, la edad, peso y talla promedio fue de $12,2 \pm 6,3$ años, $49,4 \pm 11,2$ kilos y $1,40 \pm 0,1$ metros, respectivamente. De acuerdo al IMC/edad el 45,2% presentó estado nutricional normal, 40,8% riesgo de obesidad, 13,2% obesidad y 0,8% bajo peso.

Al comparar por sexo hubo diferencias con un mayor peso y talla en los estudiantes varones $p < 0,05$ y al comparar por estado nutricional entre estudiantes eutróficos y obesos (tabla 1) hubo diferencias significativa en el mayor peso e IMC de los estudiantes obesos $p < 0,05$. La tabla 2 muestra la ingesta promedio de los edulcorantes no calóricos en mg/kg promedio y el nivel de ingesta admitida. La ingesta promedio de los edulcorantes sucralosa ($102,9 \pm 117,4$ mg), aspartamo ($144,4 \pm 160$ mg), Ciclamato ($4,5 \pm 20,8$ mg), sacarina ($0,2 \pm 1,4$ mg), acesulfamo de potasio ($72,7 \pm 79,4$ mg) y estevia no superan la IDA (ingesta diaria admisible). Ningún estudiante de la muestra superó los niveles de IDA de los edulcorantes.

La mayor ingesta de sucralosa registrada alcanzó al 82,6% del nivel máximo de IDA (12,4 mg v/s 15 mg), aspartamo alcanzó al 66% del nivel máximo de IDA (26,4 mg v/s 40 mg), ciclamato alcanzó 74,2% del nivel máximo de IDA (5,2 mg v/s 7 mg), sacarina alcanzó 6% del nivel máximo (0,3 mg v/s 5 mg), acesulfamo de potasio alcanzó 92,6% del nivel máximo (13,9 mg

TABLA 1

Comparación antropométrica según estado nutricional.

Variables	Niños		normales valor p	Niñas		valor p
	normales media \pm DE	obesos media \pm DE		normales media \pm DE	obesos media \pm DE	
Edad (años)	13,1 \pm 0,8	12,9 \pm 1,1	NS	12,5 \pm 0,8	12,8 \pm 1,2	NS
Peso (Kg)	38,8 \pm 7,92	58,2 \pm 11,8	<0,05	46,0 \pm 7,0	69,5 \pm 8,9	<0,05
Talla (Mt)	1,42 \pm 0,1	1,40 \pm 0,08	NS	1,52 \pm 0,08	1,52 \pm 0,08	NS
IMC	17,7 \pm 1,1	27,0 \pm 3,8	<0,05	18,8 \pm 2,0	28,0 \pm 2,3	<0,05

Diferencia significativa $p < 0,05$ por Test t de student.

v/s 15 mg).

El 99,6% de los estudiantes consume sucralosa, el 92,4% aspartamo, 29,2% ciclamato, 11,2% sacarina, 95,6% acesulfamo de potasio y en el caso de la estevia ninguna encuesta escolar reportó su consumo.

Al comparar por sexo no se observaron diferencias en la ingesta de ninguno de los edulcorantes estudiados.

Al comparar la ingesta de edulcorantes artificiales en escolares según estado nutricional (tabla 3), los estudiantes obesos presentaron un mayor consumo de sucralosa, aspartamo, sacarina y acesulfamo de potasio ($p<0.05$). Al comparar entre estudiantes en riesgo de obesidad y obesos, sólo se observaron diferencias en el consumo de acesulfamo de potasio ($p<0.05$). Al comparar estudiantes con estado nutricional normal y riesgo de obesidad sólo se observó diferencias significativas en el peso ($p<0.05$).

Al correlacionar las variables de edad y consumo de edulcorantes artificiales, (tabla 4) solo hubo una co-

relación significativa entre edad y consumo de sacarina ($p<0.05$).

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el 100% de los estudiantes encuestados consume algún producto con edulcorantes artificiales. Este elevado consumo se ve reflejado principalmente en la ingesta de productos como bebidas gaseosas, jugos envasados y jugos en polvo. Por otro parte se encuentran en el mercado bebidas gaseosas de líneas “económicas” que no enfatizan en sus rótulos su condición de dietéticas (19) y que, en su mayoría poseen sucralosa, aspartamo y acesulfamo de potasio entre sus ingredientes y que fueron de consumo masivo entre los estudiantes. Otro aspecto importante de este estudio es el bajo consumo de endulzantes ya sea en polvo, líquido o en tableta en los estudiantes encuestados, generándose la controversia por parte de los padres, ya que no saben si los niños pueden o no ingerirlos, ya que, se conside-

TABLA 2

Consumo promedio de edulcorantes por escolares y su ingesta diaria admitida.

Edulcorante	Consumo promedio en mg/kg	IDA en mg/kg
Sucralosa	2,7	0-15
Aspartamo	4,7	0-40
Ciclamato	0,5	0-7
Sacarina	0,02	0-5
Acesulfamo	1,7	0-15
Estevia	0	0-4

TABLA 3

Comparación de la ingesta de edulcorates en alumnos con estado nutricional normal y obesos.

	Normal Mediana (percentiles 25-75)	Obesos Mediana (percentiles 25 -75)	Valor P
Sucralosa	53 (26,2 - 123)	74 (35,6 - 216)	<0,05
Aspartamo	87 (38 -187)	141 (56 - 244)	<0,05
Ciclamato	0 (0-0)	0 (0-0,5)	NS
Sacarina	0 (0-0)	0 (0-0)	<0,05
Acelsufamo	49 (21 - 90)	85 (44 - 139)	<0,05

Diferencia significativa $p<0,05$ por Test Mann-Whitney

ran productos enfocados al consumo de los adultos y/o para el tratamiento de enfermedades crónicas como la obesidad y la diabetes mellitus.

En la actualidad existe una tendencia a reemplazar el ciclamato y la sacarina por otros edulcorantes artificiales (19) como la sucralosa, aspartamo y acesulfamo de potasio y estevia. Esto se puede interpretar a partir de los resultados de diferentes estudios realizados con animales que revelaban un aumento del riesgo de contraer cáncer de vejiga (10), manifestándose que la sacarina y ciclamato no eran compuestos inocuos para la salud.

Con respecto al edulcorante estevia, nuestro estudio no evidencia su consumo, lo que se podría deber a la reciente incorporación, el año 2009, al mercado chileno de este nuevo edulcorante. La ingesta de edulcorantes no nutritivos consumidos por los estudiantes encuestados no sobrepasa la IDA, si bien existe un alto consumo de productos que contienen edulcorantes la mayoría de estos en su composición contienen más de un edulcorante.

Nuestros resultados no muestran diferencias significativas en la ingesta de edulcorantes por sexo al igual que en un estudio realizado en Argentina el año 2007 (19). Se esperaba un mayor consumo de edulcorantes por parte de las mujeres por una tendencia social y patrones estéticos de mantener un estado nutricional normal pero quizás estas diferencias solo se observan en adultos.

Los resultados demuestran que el mayor consumo de edulcorantes artificiales es en alumnos con obesidad lo que nos lleva a interpretar que podría existir una preocupación para lograr un peso adecuado (por parte de los padres o de los mismos encuestados) o por una mayor ingesta de alimentos sin distinguir si aportan o no edulcorantes artificiales. Se ha planteado últimamente que estos productos presentan un bajo poder de saciedad, como lo indica Richard Mattes el año 2009, interfiriendo en el balance de energía y en el peso corporal (20,21).

CONCLUSIÓN

El consumo de edulcorantes artificiales como sucralosa, aspartamo, ciclamato, sacarina, acesulfamo de potasio y estevia no superan la Ingesta Diaria Admisible normada por la FAO/OMS y el Reglamento Sanitario de los alimentos de Chile. Sin embargo, el edulcorante que más se acerca al nivel máximo de IDA es el acesulfamo de potasio con un 92,6%, seguido por la sucralosa con 82,6%. De los 122 alimentos que se incluyeron en la encuesta, 73 contienen sucralosa y 49 acesulfamo.

Al comparar según estado nutricional (normales y obesos), se encontró diferencias significativas en los estudiantes obesos, a mayor peso, mayor consumo de sucralosa, aspartamo, acesulfamo de potasio y un menor consumo de sacarina.

Al correlacionar la edad de los estudiantes con el consumo de cada edulcorante, se muestra que a mayor edad existe menor consumo de sacarina, no existiendo correlación con los otros edulcorantes.

RESUMEN

Introducción: Los edulcorantes artificiales son sustancias que no aportan energía y que se agregan a los alimentos para proporcionarles un sabor dulce. Se emplean para reemplazar total o parcialmente el azúcar. Objetivo: Determinar el consumo de edulcorantes artificiales en escolares de 6 a 14 años de la región de Valparaíso y comparar su consumo según su estado nutricional. Métodos: A 281 estudiantes de ambos sexos se les realizó una evaluación antropométrica (peso y talla) y una encuesta alimentaria sobre consumo de edulcorantes. Resultados: El 100% de los estudiantes consumió alimentos o productos con contenido de edulcorantes, aunque ninguno de ellos sobre la dosis máxima admitida. Al comparar por estado nutricional, los estudiantes con obesidad presentaron una mayor consumo de sucralosa, aspartamo,

TABLA 4

Correlación de edad/edulcorante.

Edad/Colorante	Correlación	valor p*
Sucralosa	-0,1	0,1
Aspartamo	-0,05	0,4
Ciclamato	-0,04	0,4
Sacarina	-0,1	0.02*
Acesulfamo	-0,02	0,7

*<p 0,05 Se utilizó correlación de Spearman's.

sacarina y acesulfamo de potasio ($p < 0.05$). Conclusión: La ingesta de edulcorantes es masiva, pero su consumo no sobrepasa los niveles permitidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos en la muestra estudiada.

Palabras clave: edulcorantes artificiales, sacarina, aspartamo, estado nutricional, escolares.

Dirigir la correspondencia a:

Señor

Samuel Durán Agüero

Carrera de Nutrición y Dietética

Universidad Santo Tomas. Sede Viña del Mar

Viña del Mar

1 Norte 3041, piso 8

Email: sduran74@gmail.com

Telefono (56-32) 2448033

Agradecimientos: A la estadística Bárbara Leyton por su asesoría, los directores, profesores y alumnos que aceptaron participar en el estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Bartoshuk, Linda M. Sweetness: History, Preference, and Genetic Variability. *Food Technol* 1991; 45(11):108 – 10.
- Benton D. ¿Puede ayudar a los edulcorantes artificiales de control de peso corporal y la obesidad prevenir? *Nutr Rev Res* 2005; 18 (1) :63-76.
- Polyák E, Gombos K, Hajnal B, Bonyár-Müller K, Szabó S, Gubicskó-Kisbenedek A, Marton K, Ember I. Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. *Acta Physiol Hung* 2010;97(4):401-7.
- Brandle JE, Richman A, Swanson AK, Chapman BP. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Mol Biol* 2002 ;50(4-5):613-22.
- Geuns JM. Stevioside. *Phytochemistry* 2003;64: 913-21.
- Totté N, Charon L, Rohmer M, Compennolle F, Baboeuf I, Geuns J. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Letters* 2000; 41:6407-10.
- Reglamento Sanitario de los Alimentos, artículo 146. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos INTA. Disponible en: http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/reglamento_sanitario_alimentos.html
- Hagiwara A, Fukushima S, Kitaori M, Shibata M, Ito N. Effects of three sweeteners on rat urinary bladder carcinogenesis initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *Gann* 1984; 75(9): 763–8.
- Olney JW, Farber NB, Spitznagel E, Robins LN. Increasing brain tumor rates: is there a link to aspartame?. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 1115–23.
- Fukushima S, Arai M, Nakanowatari J et al. Differences in susceptibility to sodium saccharin among various strains of rats and other animal species. *Gann* 1983; 74: 8–20.
- Sturgeon SR, Hartge P, Silverman DT. Associations between bladder cancer risk factors and tumor stage and grade at diagnosis. *Epidemiolo* 1994; 5: 218-25.
- Weihrauch MR, Diehl V. Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk?. *Ann Oncol* 2004;15: 1460–5.
- Belpoggi F, Sofritti M, Padovani M, Degli Esposti D, Lauriola M, Minardi F. Results of long-term carcinogenicity bioassay on Sprague-Dawley rats exposed to aspartame administered in feed. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1076:559-77.
- Magnuson BA, Burdock GA, Doull J. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Crit Rev Toxicol* 2007;37:629-727.
- Arcella d, Le Donne C, Piccinelli R, Leclercq C. Dietary estimated intake of intense sweeteners by Italian teenagers. Present levels and projections derived from the INRAN-RM 2001 food survey. *Food Chem Toxicol* 2004;42:677-85.
- Blundell JE, Hill AJ. Paradoxical effects of an intense sweetener (aspartame) on appetite. *Lancet* 1986; 1; 1092-3.
- de la Peña C. Artificial sweetener as a historical window to culturally situated health. *Ann New York Acad Sci* 2010;1190:159-65.
- CDC/NCHS (2000): CDC growth charts: United States. <http://www.cdc.gov/growthchart> Posted May 30, 2000 on the Internet.
- Cagnasso C, López L, Valencia M. Edulcorantes no nutritivos en bebidas sin alcohol: estimación de la ingesta en niños y adolescentes. *Arch Argent Pediatr* 2007; 105(6): 517-21.
- Mattes R, Popkin B. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms *Am J Clin Nutr* 2009;89(1): 1-14.
- Bellisle F, Drewnowski A. Intense sweeteners, energy intake and the control of body weight. *Eur J Clin Nutr* 2007;61(6):691-700.