

# ASPECTOS ANALÍTICOS DEL GLUTAMATO

*Susanne Rath  
Flavia Pereira da Silva Airoidi*

El glutamato monosódico es la sal sódica del ácido glutámico, aminoácido no esencial. El glutamato puede existir formando parte de las proteínas, en conjunto con otros aminoácidos, o en forma libre en tejidos vegetales y animales. Sin embargo, es el glutamato libre el que juega un papel importante en el sabor y en la palatabilidad de los alimentos.

El primer relato acerca de la obtención del ácido glutámico se remonta a 1866, cuando el químico alemán Ritthausen describió la obtención de ese compuesto puro a partir de la hidrólisis ácida de la gliadina, un componente del gluten. No obstante, sus propiedades de realzar el sabor permanecieron desconocidas hasta la primera década del siglo XX. En 1908, el profesor Kikunae Ikeda de la Universidad Imperial de Tokio descubrió que el ácido glutámico es responsable del sabor característico del caldo hecho a partir del *kombu* (*Laminaria japonica*), un tipo de alga usada a través de los siglos en la cocina tradicional japonesa. Mediante un proceso simple de extracción con agua caliente, fue posible que el profesor Ikeda aislara 30 g de ácido L-glutámico, a partir de 40 kg de algas (Ault, 2004).

El proceso de obtención de glutamato monosódico (GMS) a partir de harina de trigo fue patentado en 1909 y el compuesto se comercializó bajo el nombre comercial de Ajinomoto.

Debido a sus características de potenciador o realzador del sabor, el GMS ha sido ampliamente utilizado en todo el mundo, atribuyéndosele el gusto umami, que es considerado el quinto gusto básico, distinto de los otros cuatro gustos: dulce, amargo, ácido y salado. El GMS se ha añadido a los alimentos preparados y procesados tales como alimentos congelados, mezcla de condimentos, sopas enlatadas y deshidratadas, salsas, aderezos para ensaladas y productos cárnicos como salchichas y jamones. En su forma natural, está presente en alimentos ricos en proteínas como carnes, hortalizas y leche.

El organismo humano también produce glutamato en gran escala. Los músculos, el cerebro y otros órganos contienen glutamato en forma libre o unido a proteínas. El L-glutamato libre es el más abundante de los aminoácidos en el cerebro y uno de los más importantes neurotransmisores excitadores en el sistema nervioso central de los mamíferos. Cuando la concentración de glutamato en el cerebro es excesiva, se vuelve tóxico para las neuronas que contienen receptores de glutamato (Blandini & Greenamyre, 1998).

Debido a la importancia del glutamato monosódico en el ámbito biológico, así como a su uso como ingrediente alimenticio, se han llevado a cabo muchas investigaciones acerca de la inocuidad y eficacia del GMS, enfocando principalmente en su utilidad en la alimentación. Para este fin, es necesario que haya disponibilidad de métodos analíticos confiables, capaces de determinar el glutamato y el ácido L-glutámico en matrices complejas, tales como alimentos y material biológico.

Este capítulo tiene como objetivo describir las propiedades físico-químicas del glutamato y discutir sobre los métodos analíticos desarrollados a través del tiempo.

## 1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL GLUTAMATO MONOSÓDICO

El compuesto 2-amino-5-hidroxi-5-oxo-pentanoato de sodio, comúnmente conocido como glutamato monosódico, o GMS, existe en dos formas enantiómeras. Si bien el isómero levógiro (L) es responsable del característico gusto umami, el isómero dextrógiro (D) no presenta características organolépticas.

La estructura química de GMS se muestra en la Figura 2.1.

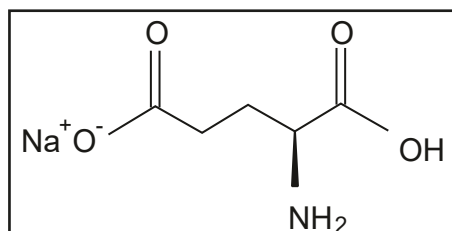


Figura 2.1 – Estructura química del glutamato monosódico.

Fuente: figura elaborada por los autores.

El GMS está registrado en el *Chemical Abstract Service* bajo la identificación CAS 142-47-2. Las propiedades físico-químicas se resumen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 – Propiedades físico-químicas del glutamato monosódico.

Fórmula molecular	Masa molar	Apariencia	Punto de fusión	Solubilidad
$\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$	169,11	Polvo cristalino blanco	225 °C	Muy soluble en agua y poco soluble en etanol.

El GMS no es higroscópico y es estable cuando se almacena a temperatura ambiente durante periodos prolongados. El pH de una solución acuosa de 1:20 (m/v) se sitúa entre 6,7 y 7,2 (CFCC, 2004).

Además, el GMS no sufre descomposición durante el procesamiento, es decir, en la cocción normal de los alimentos. Mientras en condiciones ácidas (pH 2,2 a 2,4) y a altas temperaturas, se transforma en 5-pirrolidona-2-carboxilato (Yamaguchi & Ninomiya, 1998).

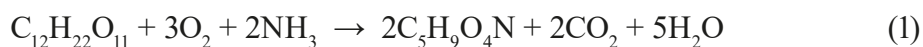
En general, el GMS se comercializa en su forma hidratada (masa molar 187,13) y CAS 6106-04-3 (CFCC, 2004).

## 1.1 Producción

La producción industrial de GMS se realiza a partir del hidrocloreuro del ácido L-glutámico o simplemente del ácido L-glutámico, el cual es disuelto en agua, neutralizado y convertido en sal monosódica mediante la adición de hidróxido de sodio. Los cristales de GMS se obtienen después por concentración al vacío de la solución que contiene GMS, a 60 °C y tras la posterior centrifugación (Ault, 2004).

A su vez, el ácido glutámico puede obtenerse por extracción a partir de fuentes naturales, por síntesis química, fermentación o catálisis enzimática. La

obtención de ácido L-glutámico por fermentación es actualmente el proceso más importante a considerar en la producción de glutamato monosódico. Este proceso se estableció hace más de medio siglo, cuando se descubrió que la *E. coli* es capaz de sintetizar y secretar aminoácidos y que el rendimiento de la reacción se incrementa por la presencia de sales de amonio en el medio de cultivo. Las materias primas más importantes para este proceso han sido la caña de azúcar, el maíz y la yuca. Más tarde, otra bacteria fue descubierta, la *Corynebacterium glutamicum*, que produce el ácido L-glutámico ( $C_5H_9O_4N$ ) a partir de carbohidratos, oxígeno y amoníaco (Reacción 1).



La ventaja del proceso de fermentación es la producción del isómero levógiro del ácido glutámico, que en forma de sal sódica tiene las propiedades organolépticas deseadas de potenciador o realzador del sabor. Por otro lado, en el proceso de síntesis se obtiene una mezcla racémica y la separación enantiomérica necesita ser realizada en una etapa adicional.

## 2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Uno de los primeros métodos descritos para la determinación de glutamato fue propuesto por Fernández-Flores *et al.* (1969). El método se basa en la titulación del ácido glutámico con hidróxido de sodio en presencia de formaldehído, después de la separación previa de este aminoácido de una matriz acuosa en una columna de intercambio iónico. Sin embargo, este método titrimétrico no presenta detectabilidad y selectividad suficientes para cuantificar el glutamato en los alimentos, en presencia de otros aminoácidos. Posteriormente, para sortear estas limitaciones, fueron propuestas modificaciones tanto en la preparación de muestras (separación y purificación), como con relación a artificios para aumentar la detectabilidad del glutamato (Sporns, 1982).

Desde entonces, una gran variedad de métodos han sido descritos en la literatura para la determinación de glutamato en matrices diversas como alimentos y material biológico. Entre ellas, titulaciones potenciométricas, métodos fluorimétricos, cromatografía en papel, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta eficiencia, electroforesis capilar y determinación mediante los analizadores de aminoácidos. En la actualidad, la mayoría de los métodos destinados a la determinación de L-glutamato en matrices biológicas, incluyendo alimentos,

implica el uso de una cromatografía líquida de alta eficiencia, la electroforesis capilar o mediciones amperométricas con el uso de biosensores.

Aunque la cromatografía en papel y la cromatografía de gases hayan sido empleadas para la determinación del glutamato, la primera carece de precisión y la segunda requiere una etapa previa de derivatización. Los métodos que emplean la cromatografía líquida de alta eficiencia o analizador de aminoácidos asociados a detectores UV o fluorescencia también requieren derivatización del ácido glutámico post o precolumna. En general, las técnicas cromatográficas requieren una preparación previa de la muestra, antes de la cuantificación, destinada a extraer el analito de la matriz, así como también la eliminación de interferencias de otros componentes y concentración, lo que requiere tiempo y consumo de reactivos.

En este sentido, los métodos enzimáticos, utilizando biosensores, son una interesante alternativa para los métodos cromatográficos debido a sus características de selectividad y rapidez de respuesta.

El método oficial propuesto por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) se basa en la cuantificación del ácido glutámico mediante la titulación con hidróxido sódico en presencia de formaldehído, después de la extracción y limpieza en columna de intercambio iónico (AOAC, 2005). No obstante, este método no es adecuado para la cuantificación del glutamato en los alimentos y en material biológico y no indica la contaminación cruzada por otros aminoácidos (Lau & Mok, 1995).

A continuación se discuten los principales métodos analíticos utilizados para la determinación de glutamato en alimentos y matrices biológicas.

## 2.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia

Los métodos cromatográficos han sido ampliamente utilizados en las más diversas áreas por sus numerosas ventajas sobre otros métodos, en especial en la separación, identificación y cuantificación de compuestos en matrices complejas hechas en un solo análisis. La sensibilidad de la técnica depende del sistema de detección asociado al método cromatográfico. El glutamato no posee un cromóforo que resulte en una absorción significativa de energía en la región ultravioleta o visible del espectro electromagnético, ni tampoco tiene un grupo funcional con propiedades fluorescentes, que permita la cuantificación del GMS en matrices biológicas. Por esta razón, son necesarias reacciones de derivatización pre o postcolumna. Como reactivos de derivatización se han utilizado, entre otros, fenilisotiocianato (PITC), cloruro de dansilo (DNS-Cl), o-ftalaldehído (OPA),

9-Fluorenilmetil cloroformato (FMOCl). No obstante, en general, las reacciones de derivatización consumen tiempo, muchas veces los derivados carecen de estabilidad y los interferentes de matrices biológicas no son totalmente eliminados. Todos estos factores pueden afectar la selectividad del método (Zhang *et al.*, 2006).

El método más conocido para la determinación de aminoácidos por HPLC implica la reacción del analito con o-ftalaldehído (OPA) y 2-mercaptoetanol (2-ME) para producir derivados isoindoles fluorescentes. Estos últimos compuestos son separados en la columna cromatográfica y cuantificados mediante un detector de fluorescencia. Sin embargo, el método no permite la diferenciación de enantiómeros. Para el análisis enantioselectivo, el 2-ME necesita ser reemplazado por tioles quirales tales como N-acetilcisteína, N-isobutiril-L-cisteína (IBC) y otros (Grant *et al.*, 2006). La reacción de derivatización de un aminoácido con OPA e IBC se representa en la Figura 2.2.

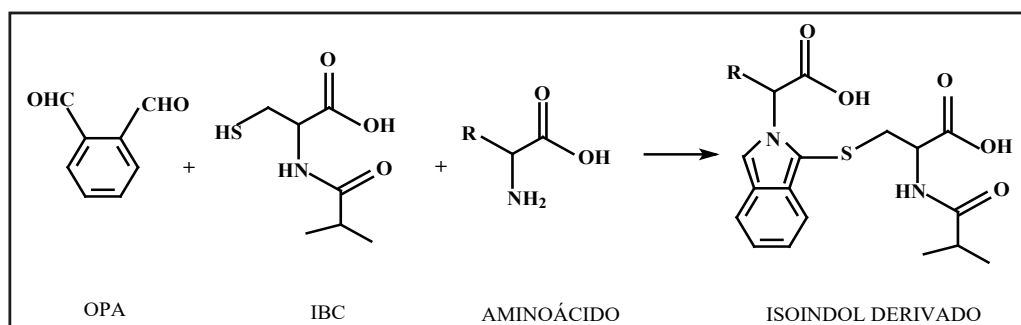


Figura 2.2 – Reacción de derivatización de un aminoácido con o-ftalaldehído (OPA) y N-isobutiril-L-cisteína (IBC).

Fuente: figura elaborada por los autores.

La propiedad del cloruro de dansilo de formar derivados fluorescentes con aminas primarias y secundarias también ha sido explorada para cuantificar el glutamato mediante HPLC. En este caso, los derivados fluorescentes pueden separarse en una fase estacionaria octadecilsilano, usando una fase móvil compuesta de metanol:agua. Williams & Winfield (1982) emplean este procedimiento para la determinación de glutamato en muestras de sopas. Las longitudes de onda de excitación y emisión del dispositivo de detección fueron ajustadas en 245 nm y 328 nm, respectivamente y el glutamato de las muestras fue extraído con agua.

Populin *et al.* (2007) determinaron aminoácidos, entre estos el ácido glutámico y aminas biógenas en alimentos (sopas instantáneas, aderezos para ensaladas, verduras, carnes, proteínas vegetales hidrolizadas, entre otros), con

y sin la presencia de GMS. Para eso emplearon la cromatografía líquida de alta eficiencia, asociada a un detector de fluorescencia (HPLC-FL). Los aminoácidos fueron derivatizados con OPA y la separación se realizó en una columna octadecilsilano, usando agua como fase móvil agua:tampón fosfato pH 7,0 (370:90 v/v) + acetonitrilo y elución por gradiente. Para la detección se utilizaron longitudes de onda de excitación y emisión de 330 y 440 nm, respectivamente. La preparación de las muestras consistió básicamente en la extracción de los aminoácidos de la matriz con agua antes de la derivatización con OPA. Las muestras líquidas (listas para el consumo), fueron simplemente diluidas con agua antes de la reacción de derivatización y cuantificación por HPLC. Las muestras en polvo, las granuladas y las pastas fueron disueltas en agua hirviendo y tratadas como muestras líquidas. En el caso de muestras más complejas, como las sopas con trozos de hortalizas, aderezos para ensaladas y condimentos, una parte representativa de la muestra fue homogenizada y luego se le añadió ácido clorhídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. La solución fue centrifugada y el sobrenadante fue filtrado antes de la etapa de derivatización. La mayor concentración de glutamato en los alimentos a los que no se les adicionó GMS fue constatada en los productos que contenían hidrolizados de proteína (> 129 mg/100g). Los alimentos con mayor porcentaje de glutamato monosódico en su composición fueron las sopas y los aderezos para ensalada (76,8 – 92,5%).

Harada *et al.* (2004) estudiaron el efecto de la cepa y del medio de cultivo en la composición química de los componentes responsables del sabor (azúcares solubles y aminoácidos libres) en hongos *Hypsizygus marmoreus*. La preparación de las muestras consistió en la extracción de los analitos de la muestra previamente liofilizada con una solución de agua:etanol (20:80 v/v). La cuantificación de los aminoácidos se realizó por HPLC-FL.

Rotzoll *et al.* (2006) realizaron un estudio para identificar compuestos con propiedades organolépticas en hongos *Morchella deliciosa* Fr, entre ellos el ácido L-glutámico. Antes de la cuantificación, los hongos fueron triturados, y los aminoácidos extraídos con agua. El extracto fue filtrado y fraccionado por ultracentrifugación. La fracción de baja masa molecular (<1 kDa) fue liofilizada y posteriormente disuelta en una solución tampón 0,1 mol L<sup>-1</sup> que contenía acetato de sodio, metanol, ácido fórmico, ácido acético y ácido octanoico, antes de la cuantificación. Para este fin fue utilizado un analizador de aminoácidos.

En lugar del detector de fluorescencia, Lau & Mok (1995) desarrollaron un método para la determinación de glutamato en los alimentos (sopas, salsas y alimentos para bebés), empleando HPLC asociada a un detector de conductivi-

dad. Como columna analítica se utilizó una columna Econosil NC y como fase móvil agua:acetonitrilo:tetrahidrofurano (77:22:3 v/v/v) adicionada de 1 mmol L<sup>-1</sup> de ácido perclórico. Las muestras que no contenían almidón en su composición fueron previamente homogeneizadas y se les añadió agua y carbón activado. La limpieza del extracto, después del proceso de filtración, fue realizada por medio de una columna de intercambio iónico (Dowex 50W-X8 (H<sup>+</sup>), 100-200 mesh). Antes del análisis cromatográfico, los eluatos fueron liofilizados para la eliminación del ácido clorhídrico.

Un método simple y versátil, que utiliza HPLC-FL, fue descrito por Grant *et al.* (2006) para la determinación de aminoácidos neuroactivos en el sistema glutaminérgico, entre ellos, L-serina, L-glutamato, L-glutamina y glicina. Antes del análisis, los aminoácidos fueron derivatizados con OPA y N isobutiril L-cisteína (IBC) en una solución de metanol y tampón borato pH 10. El método fue aplicado al análisis del plasma y para este fin, las muestras fueron previamente desproteinizadas, utilizando metanol y centrifugación. La separación cromatográfica fue realizada en una columna octadecilsilano con una fase móvil compuesta de dos solventes: (i) fosfato de sodio 0,04 mol L<sup>-1</sup>:metanol (85:15 v/v) y (ii) fosfato de sodio 0,04 mol L<sup>-1</sup>:metanol:tetrahidrofurano (67:55,5:3 v/v/v), ambas fases ajustadas para pH 6,2. La elución fue realizada por gradiente. Los derivados de aminoácidos fueron monitoreados en las longitudes de onda de excitación y de emisión de 260 y 455 nm, respectivamente. El método mostró ser lineal en el intervalo de 2,5 a 100 ng de L-glutamato.

Zhang *et al.* (2006), describieron un método utilizando HPLC-FL para la determinación de glutamato y aspartato en retina de conejos. Para esto, combinaron la microextracción en polímero monolito con derivación de los analitos usando 8-fenil-(4-oxi ácido acético N-hidroxisuccinimida éster)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-S-indaceno. El límite de detección establecido para el glutamato fue de 0,53 nmol L<sup>-1</sup>.

Nagata *et al.* (2006), determinaron la concentración de serina, alanina, prolina, aspartato y glutamato en la saliva humana, utilizando dos técnicas de cromatografía en serie: cromatografía en capa fina bidimensional y HPLC. Las muestras de saliva libres de células fueron tratadas con ácido tricloroacético al 5% para la eliminación de las proteínas y el extracto fue clarificado en columna de intercambio iónico. Posteriormente, se procedió a la concentración del eluato y a la derivatización de los aminoácidos con 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida antes de su separación por cromatografía en capa fina bidimensional. Después de la separación, los derivados fueron retirados de la placa y analizados



por HPLC con detección en longitud de onda de 340 nm. Para este fin, fue utilizada una fase estacionaria octadecilo y una fase móvil compuesta de acetonitrilo y tampón de trietilamina-fosfato pH 3,5. Fue realizada la elución en gradiente.

Kang *et al.* (2006) propusieron un método para la determinación de doce aminoácidos, entre ellos el glutamato, tanto en el tejido cerebral de ratas como en el plasma de conejos. Para este fin, el cerebro o el plasma fue homogeneizado en ácido perclórico, seguido de centrifugación para la eliminación de las proteínas. Luego, los extractos fueron transferidos a una solución de bicarbonato de potasio-hidróxido de potasio 2 mol L<sup>-1</sup> y los aminoácidos fueron derivatizados con DNS-Cl en medio de acetonitrilo. La reacción fue encubada a 80 °C en la oscuridad, durante 30 min. Inmediatamente después, la reacción fue interrumpida por adición de ácido acético. La mezcla fue centrifugada y el sobrenadante fue inyectado en el sistema cromatográfico. La separación de los derivados fue realizada en columna de fase reversa octadecilsilano y una fase móvil compuesta de metanol:agua adicionada de trietilamonio 1,5% e hidróxido de tetrabutilamonio 5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 2,5 bajo elución isocrática. La cuantificación fue realizada en la región ultravioleta a 286 nm. Los autores concluyeron que, en las condiciones experimentales establecidas, el detector de UV mostró una mayor sensibilidad que el detector de fluorescencia. El límite de detección para un volumen de inyección de 20 µL fue de 38 ng para el glutamato.

La cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) ha estado reemplazando a la cromatografía líquida de alta eficiencia en la última década en las aplicaciones más diversas. Los motivos son las ventajas de alta eficiencia de las columnas analíticas con un diámetro de partícula menor a 2 µm combinado con tiempos de análisis más cortos y menor consumo de solventes. González *et al.* (2011) utilizaron UHPLC asociada con espectrometría de masas secuencial (UHPLC-MS/MS) para la determinación de neurotransmisores, incluido el glutamato, en el cerebro de ratas. Stragierowicz *et al.* (2017) reportaron un método para la determinación de neurotransmisores en la misma matriz usando UHPLC con detector de fluorescencia.

La ventaja de usar UHPLC-MS/MS en la determinación de glutamato y otros aminoácidos es la selectividad cuando se opera en el modo de reacciones seleccionadas y que no se necesita agregar un agente de derivatización. Zheng *et al.* (2019) reportaron un método que utiliza UHPLC-MS/MS para la determinación de aminoácidos, purinas en suero sanguíneo, incluido el glutamato. Para la cuantificación, se controló la transición del ión precursor (*m/z* 148,2) al ión producto (*m/z* 84,0). La preparación de la muestra consistió en la precipitación

de proteínas mediante la adición de metanol. Después de la centrifugación y separación de proteínas, el sobrenadante se filtró y se analizó directamente en UHPLC-MS/MS. La fuente de electrospray se hizo funcionar en modo positivo. El límite de cuantificación del método para la determinación de glutamato en suero fue de 0,8 ng mL<sup>-1</sup>.

## 2.2. Cromatografía gaseosa

Numerosos investigadores han explorado el uso de la cromatografía de gases para la resolución de aminoácidos ópticamente activos. En el caso de la producción del GMS por fermentación, es importante disponer de técnicas que permitan la diferenciación de los dos enantiómeros, incluso cuando uno esté en concentración mucho más baja que el otro. En este contexto, Curry *et al.* (1983) describieron un método para la determinación de D-GMS y L-GMS por cromatografía gaseosa utilizando una columna capilar quiral y un detector de ionización de llama. La cuantificación fue realizada después de la derivatización del glutamato con anhídrido trifluoroacético y usando la L-fenilalanina como patrón interno. El método fue evaluado en muestras líquidas que contenían de 30-40% de GMS en su composición.

## 2.3. Electroforesis capilar

Las técnicas electroforéticas basadas en la electromigración de moléculas cargadas en solución bajo la fuerza de un campo eléctrico han sido ampliamente empleadas en diversas aplicaciones analíticas, especialmente en el campo de la bioquímica. Entre estas técnicas, la electroforesis capilar de zona o solución libre (CZE) se ha destacado en los últimos años, debido principalmente a algunas ventajas en comparación con los demás métodos cromatográficos. Por ejemplo: alta eficiencia, requerimiento de pequeñas cantidades de solventes y muestras, así como rapidez de análisis. Basado en la electromigración y en los diferentes modos de separación, se han desarrollado técnicas tales como, la cromatografía micelar electrocinética (MEKC), la electroforesis capilar en gel (CGE) y la electroforesis capilar por focalización isoelectrica (CIEF). Una de las grandes versatilidades de la electroforesis capilar es la posibilidad de asociación a una amplia variedad de técnicas de detección, como: la absorción en el UV-Vis, la fluorescencia, la fluorescencia inducida por láser, la espectrometría de masas, la conductividad, la amperometría, la radiactividad, el índice de refracción, el dicroísmo circular y Raman.

No obstante, para la separación y la determinación de aminoácidos se ha destacado el uso de la CZE y MECK, asociadas a los detectores de absorción en el UV y/o fluorescencia inducida por láser (LIF).

Debido a las propiedades físico-químicas del GMS, antes de la cuantificación se recomiendan procedimientos de derivatización para mejorar la sensibilidad del método. Para la detección mediante LIF, se han utilizado reactivos como 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan, (NBD-F), naftaleno-dicarboxaldehído (NAD) y el o-ftalaldehído (OPA) (Chen *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2006).

Pérez-Ruiz *et al.* (2000) describieron un método para la determinación de glutamato en bebidas y alimentos usando CZE con detección por LID. El método presentó linealidad en el rango de concentración de glutamato de  $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ , con un límite de detección de  $5,4 \cdot 10^{-10}$  mol  $L^{-1}$ .

Chen *et al.* (2007) propusieron un método que emplea la técnica MEKC para la separación de veinte aminoácidos, incluyendo el ácido glutámico. Los aminoácidos fueron derivatizados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y cuantificados con un detector de fluorescencia con excitación multifotónica desarrollado por los propios autores.

Bodor *et al.* (2001) utilizaron la isotacoforesis en un *chip* con detector de conductividad para la separación y determinación de aditivos alimentarios, entre estos, el benzoato, el sorbato, los ésteres de ácido p-hidroxibenzoico y el glutamato. El método fue utilizado para la determinación de glutamato en alimentos.

Para la detección de aminoácidos excitadores, Wang *et al.* (2006) utilizaron la electroforesis capilar asociada a un detector de fluorescencia. Los aminoácidos fueron derivatizados con naftaleno-2,3 dicarboxaldehído. Los analitos fueron separados en capilar de sílice fundida con tampón borato 10 mmol  $L^{-1}$ , pH 9,3. El límite de detección para el ácido glutámico fue de  $2,1 \cdot 10^{-8}$  mol  $L^{-1}$ . Este método fue utilizado para la determinación de ácido glutámico y aspártico en fluidos biológicos (suero humano y líquido cefalorraquídeo). Las muestras de suero y líquido cefalorraquídeo fueron diluidas y agitadas con acetonitrilo para precipitar las proteínas. La mezcla se encubó en baño de hielo durante una hora y luego fue centrifugada. Enseguida fue añadido el agente de derivatización.

Li *et al.* (2006) propusieron un nuevo método para la determinación de la actividad de las enzimas aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa en los fluidos biológicos. Este procedimiento está basado en la separación y cuantificación de alanina, glutamato y aspartato por electroforesis capilar con detección por electroquimioluminiscencia. La separación fue promovida en tampón fosfato 5 mmol  $L^{-1}$ , pH 2,1. La detección se llevó a cabo en un electrodo

de disco de platino (1,2 V vs Ag/AgCl) en presencia de tris (2,2-bipiridilo) rutenio (II) disuelto en fosfato 80 mmol L<sup>-1</sup>, pH 10,5. El método se mostró adecuado para su aplicación en biología celular y en el área clínica.

El uso de detectores electroquímicos ofrece ventaja sobre los detectores ópticos porque no requiere la derivatización del glutamato antes de la cuantificación. En este contexto, se destacan los detectores de conductividad conductimétrica sin contacto acopladas capacitivamente (C4D). Aunque estos detectores son de bajo costo, son simples técnicamente y permiten la detección de compuestos múltiples, sufren el efecto de la matriz, lo que puede comprometer la selectividad y detectabilidad de los analitos.

Campos *et al.* (2019) desarrollaron un método que emplea electroextracción líquido-líquido (sistema acuoso bifásico) en línea (*on-line*) con electroforesis capilar y usando sistema de detección conductimétrica sin contacto acoplada capacitivamente. Este método fue utilizado para la determinación de ácido glutámico en muestras de *shoyu*, que presentan alto contenido de sodio.

Las principales reacciones y condiciones empleadas para la determinación de glutamato por técnicas de separación se resumen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 – Métodos de separación empleados para la determinación de glutamato en alimentos y material biológico.

Técnica	Columna	Fase móvil	Agente de derivatización	Rango Lineal (LOD)	Matriz	Referencias
HPLC-FLD	ODS	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O	DNS-Cl	0-10 µg mL <sup>-1</sup>	Sopas	Williams & Winfield, 1982
GC-FID	Fase quiral	Helio	Anhidrido trifluoroacético	-	Muestras líquidas	Curry <i>et al.</i> , 1983
HPLC-CD	Ciano	H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN/THF/HClO <sub>4</sub>	-	0 a 500 µg mL <sup>-1</sup>	Sopas y aderezos	Lau & Mok, 1995
TLC+	ODS	CH <sub>3</sub> CN (tampón trietilamina-fosfato pH 3,5	1-Fluoro-2,4-dinitro fenil-5-L-alaninamida	-	Saliva	Nagata <i>et al.</i> , 2006
HPLC-FLD	ODS	Fosfato de sodio pH 6,2/CH <sub>3</sub> OH y fosfato de sodio pH 6,2/CH <sub>3</sub> OH/THF	OPA e IBC	2,5 a 100 ng	Plasma	Grant <i>et al.</i> , 2006
HPLC-UV	ODS	CH <sub>3</sub> OH / H <sub>2</sub> O – trietilamonio-hidróxido de tetrabutilamonio, pH 2,5	DNS-Cl	23 a 454 ng (38 ng)	Cerebro de ratas y plasma de conejo	Kang <i>et al.</i> , 2006
CZE-EQ		PBS 5 mmol L <sup>-1</sup> , pH 2,1			Material biológico	Li <i>et al.</i> , 2006
CZE-FLD		BBS 10 mmol L <sup>-1</sup> , pH 9,3	Naftaleno-2,3 dicarboxaldehído	(2,1 10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup> )	Fluidos biológicos	Wang <i>et al.</i> , 2006
CZE-FLD		Ácido [3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propa-no sulfónico] 20 mmol L <sup>-1</sup> , pH 9,0	FITC	10 <sup>-7</sup> a 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> (5,4 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup> )	Alimentos y bebidas	Pérez-Ruiz <i>et al.</i> , 2000
HPLC-FLD	ODS	H <sub>2</sub> O-PBS pH 7,0/ acetónitrilo	OPA	-	Sopas instantáneas, aderezos de ensaladas, vegetales, carnes, proteínas vegetales hidrolisadas	Populin <i>et al.</i> , 2007
UHPLC-FLD	BEH C18	Tampón acetato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 6,0; CH <sub>3</sub> OH	OPA	100 a 10000 ng mL <sup>-1</sup> (30 ng mL <sup>-1</sup> )	Cerebro de ratas	Stragierowicz <i>et al.</i> , 2017
UHPLC-UV	Fenil-hexil	N-metil morfolina 50 mmol L <sup>-1</sup> tampón acetato pH 7,4/12% CH <sub>3</sub> CN	2,4-Dinitro fluorobenzeno		Tomates	Agius <i>et al.</i> , 2018
UHPLC-MS/MS	BEH C18	CH <sub>3</sub> OH y ácido fórmico con adición de HFBA 1 mmol L <sup>-1</sup>	HFBA	1 a 200 µg L <sup>-1</sup> (0,73 µg g <sup>-1</sup> )	Cerebro de ratas	González <i>et al.</i> , 2011
UHPLC-MS/MS	Nucleoshell HILIC	Formiato de amonio 25 mmol L <sup>-1</sup> , pH 3,5 (ajustado con ácido fórmico) y CH <sub>3</sub> CN	-	2,5 a 2000 ng mL <sup>-1</sup> (0,25 ng mL <sup>-1</sup> )	Córtex de ratas	Defaix <i>et al.</i> , 2018
UHPLC-MS/MS	BEH amida	Ácido fórmico 0,1% acuoso y CH <sub>3</sub> CN adicionado de ácido fórmico 0,1% BBS 25 mmol L <sup>-1</sup>	-	0,099 a 9,9 µg mL <sup>-1</sup> (0,2 µg mL <sup>-1</sup> )	Suero sanguíneo	Zheng <i>et al.</i> , 2019
MEKC-MPEF		SDS 100 mmol L <sup>-1</sup> e 5% CH <sub>3</sub> OH, pH 11,0	FITC	9,73 a 109 µmol L <sup>-1</sup> (1,25 µmol L <sup>-1</sup> )	Suplementos nutricionales	Chen <i>et al.</i> , 2007

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia; UHPLC: cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia; FLD: detector de fluorescencia; CD: detector de conductividad; UV: ultra-violeta; MS/MS: espectrometría de masas secuencial; TLC: cromatografía en capa fina; CZE: electroforesis capilar de zona; MEKC: cromatografía electrocinética micelar; MPEF: fluorescencia con excitación multifotónica; EQ: electroquimioluminiscencia; GC: cromatografía gaseosa; FID: ionización de llama; ODS: octadecilsilano; DNS-Cl: cloruro de dansilo; OPA: o-ftalaldehído; IBC: N-isobutilil L-cisteína; BBS: tampón borato; PBS: tampón fosfato; HFBA: ácido heptafluoro butírico.

Fuente: tabla elaborada por los autores.

## 2.4. Métodos espectroanalíticos

Chapman & Zhou (1999) desarrollaron dos métodos fluorimétricos para la determinación de L-glutamato en muestras biológicas y alimentos. El primero describe el uso de una reacción de reciclaje continua de sustrato catalizada por las enzimas L-glutamato oxidasa (GLOD) y glutamato piruvato transaminasa (GPT). El peróxido de hidrógeno formado en la reacción enzimática es determinado indirectamente en la forma de Resorufin (derivado fluorescente) que se forma en la reacción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con Amplex Roja (Amplex Red). El segundo método sigue el mismo principio del primero, sin embargo, utiliza como enzimas la L-glutamato deshidrogenasa (GLDH) y GPT. En esta reacción, el glutamato es cuantificado a través de la medida del NADH formado en la reacción enzimática mediante la reacción de este con resazurina en presencia de diaforasa. De esta forma, en esta reacción ocurre la formación del derivado fluorescente Resorufin. Los métodos fueron aplicados para la determinación de L-glutamato en sopas. La preparación de las muestras consistió en la centrifugación de las muestras líquidas y dilución del sobrenadante en tampón Tris – HCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,5. Los autores enfatizan que el método fluorimétrico con Amplex Roja es 500 veces más sensible que el método espectrofotométrico convencional, debido a la estrategia de reciclado del sustrato, así como al uso de reactivo de derivatización.

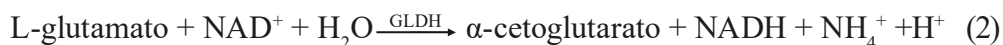
Basado en el mismo principio de reciclaje de sustrato, Khampha *et al.* (2004) describieron un método para la determinación de L-glutamato en los alimentos, utilizando como enzimas la GLDH y la D-fenilglicina aminotransferasa (D-PhgAT). La GDLH convierte el glutamato en  $\alpha$ -cetoglutarato con reducción concomitante del  $\text{NAD}^+$  para NADH. El  $\alpha$ -cetoglutarato, a su vez, es reciclado para formar glutamato por la reacción de transaminación catalizada por la enzima D-PhgAT utilizando la D-hidroxifenilglicina como un donante del grupo amino. En esta reacción, la hidroxifenilglicina es convertida en 4-hidroxibenzoilformato que absorbe fuertemente a 340 nm. El límite de detección es de 0,14  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

## 2.5. Biosensores

Los biosensores son dispositivos en los cuales los materiales de origen biológico (enzimas, anticuerpos, organelos, ácidos nucleicos y otros) son inmovilizados junto a un transductor adecuado. Según el transductor utilizado, el biosensor puede ser clasificado como óptico (medida de fluorescencia, luminiscencia, etc.), electroquímico (conductimétrico, potenciométrico y amperométrico) y detector de masas. Existe un número elevado de artículos científicos publicados en la literatura que describen métodos que emplean biosensores para aplicaciones

analíticas en alimentos y material biológico. Esto puede ser atribuido a sus importantes características como selectividad, respuesta rápida, bajo costo y facilidad de construcción, así como a las posibilidades de miniaturización.

El primer biosensor electroquímico para glutamato fue desarrollado por Malinauskas & Kulys en 1978, utilizando la enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) y la coenzima  $\text{NAD}^+$ , inmovilizadas en una membrana semipermeable. En esta reacción (Reacción 2), ocurre la formación de NADH que, generalmente, es la especie monitoreada para fines cuantitativos.



No obstante, la oxidación directa del NADH en electrodos no modificados requiere un elevado sobrepotencial, debido al proceso lento de transferencia de cargas. Para sortear esta limitación, diferentes mediadores redox han sido incorporados en la superficie de los electrodos, entre ellos:  $\text{MnO}_2$  (Beyene *et al.*, 2003), tetratio fulvaleno-tetracianoquinodimetano (Pauliukaite *et al.*, 2006), metosulfato de fenazina (Malinauskas & Kulys, 1978; Curruli *et al.*, 1997), entre otros. Los mediadores pueden ser inmovilizados por diferentes procesos, tales como quimiosorción, unión covalente en la superficie del electrodo o polímeros conductores, películas poliméricas depositadas electroquímicamente en la superficie del electrodo y en pasta de carbono (Curruli *et al.*, 1997). Recientemente se ha verificado que los nanotubos de carbono son capaces de reducir el sobrepotencial para la oxidación del NADH (Chakraborty & Raj, 2007).

Además de la enzima GLDH, la L-glutamato oxidasa (GLOD) producida por *Streptomyces sp.*, ha sido ampliamente utilizada en biosensores para la determinación del glutamato. La GLOD oxida el L-glutamato a  $\alpha$ -cetoglutarato con la formación de amonio y peróxido de hidrógeno (Reacción 3).



La reacción y cuantificación del glutamato pueden ser monitoreadas por la formación de peróxido de hidrógeno, usando el método amperométrico. Sin embargo, semejante al NADH, la determinación de peróxido de hidrógeno a través de su oxidación requiere un elevado sobrepotencial, lo que puede llegar a afectar la selectividad del método.

En las mediciones electroquímicas utilizando biosensores, los electrodos empleados generalmente son metales inertes y la enzima necesita ser incorporada a la superficie de los mismos. Para este fin, se han empleado membranas poliméricas Nafion y películas de polifenildiamina, entre otras (Pauliukaite *et al.*, 2006).

A continuación se describen algunos biosensores y sus aplicaciones en la determinación de L-glutamato en muestras de alimentos y material biológico. La Tabla 2.3 presenta un resumen de los biosensores utilizados.

Kwong *et al.* (2000) desarrollaron un biosensor para la determinación de L-glutamato en salsas de soya. La enzima GLOD fue inmovilizada mediante un hidrogel de poli(carbamil sulfonato) y cuantificada por un detector electroquímico. El sensor mostró linealidad en el rango de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> a 5 mmol L<sup>-1</sup> de L-glutamato, con un límite de detección de 1,01 µmol L<sup>-1</sup>. Además, el sensor mostró selectividad en la presencia de la mayoría de otros aminoácidos, con excepción de L-asparagina, L-glutamina, L-ácido aspártico y L-histidina.

La formación de amonio en la reacción enzimática fue empleada para la determinación de glutamato en alimentos, a través de un sensor potenciométrico (Nikolelis, 1987). El método presentó linealidad adecuada para el glutamato en el rango de 1 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> a 1 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.



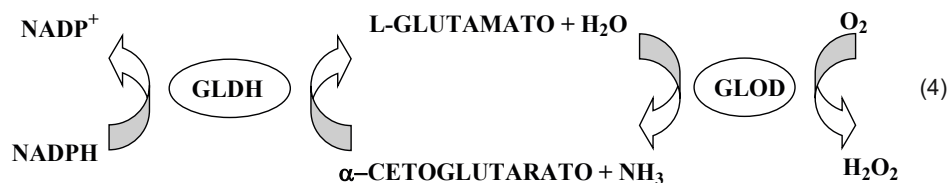
Tabla 2.3 – Biosensores utilizados para la determinación de glutamato en alimentos y material biológico.

Técnica/Potencial	Biosensor	Especie Monitoreada	Muestras	Electrolitos	Rango Lineal (LOD)	Referencia
Potenciometría	GLDH	NH <sub>3</sub>	Sopas	Tris-HCl pH 8,5	1 10 <sup>-4</sup> a 1 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>	Nikolelis, 1987
FIA-Amperometría/ 650 mV	Inosina monofosfato deshidrogenasa y NADH deshidrogenasa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Condimentos	PBS 0,3 mol L <sup>-1</sup> , pH 8,0	1,0 a 10,0 mmol L <sup>-1</sup>	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998
FIA-Amperometría/ 400 mV	Pt/GLOD+Hidrogel policarboxil sulfonato/	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Condimentos	PBS 67 mmol L <sup>-1</sup> pH 6,86	0,1 a 5 mmol L <sup>-1</sup> (1,01 µmol L <sup>-1</sup> )	Kwong <i>et al.</i> , 2000
FIA-Amperometría/ 50 mV	Azul de Prusia-Nafion®/GLOD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	–	PBS 0,05 mol L <sup>-1</sup> e KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 6,0.	1 10 <sup>-7</sup> a 1 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> (1 10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> )	Karyakin <i>et al.</i> , 2000
Amperometría/ 440 mV	Electrodo de carbono impreso/ filme de Nafion® + MnO <sub>2</sub> + GLOD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Condimentos	PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,75	10 a 60 mg L <sup>-1</sup> (1,7 mg L <sup>-1</sup> )	Beyene <i>et al.</i> , 2003
Potenciometría	Electrodo de oxígeno/GLOD + GLDH + policarbonato	O <sub>2</sub>	Sopas y aderezos	PBS 0,2 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0	0,02 a 1,2 mg L <sup>-1</sup> (0,02 mg L <sup>-1</sup> )	Basu <i>et al.</i> , 2006
Fluorescencia	Sol-gel de titanio inmovilizado con carboxi seminaftorhodamina-1-dextran/ GLDH	Derivado fluorescente	Agua y suero de albúmina bovina	Tampón, 3-bis[tris(hidroximetil) metilaminol] propano, 2,5 mmol L <sup>-1</sup> , pH 9,0	0,02 a 10 mmol L <sup>-1</sup> (6,7 µmol L <sup>-1</sup> )	Doong & Shih, 2006
Amperometría/ 200 mV	Poli(amidoamina) encapsuladas en nanopartículas de platino sobre nanotubos de carbono/ GLDH			PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,4	0,2 a 250 µmol L <sup>-1</sup> (10 nmol L <sup>-1</sup> )	Tang <i>et al.</i> , 2007
Amperometría/ 600 mV	Electrodo de platino/ poli(m-fenilenediamina)/GLOD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Nervios cerebrales de ratas	Tampón HEPES 25 mmol L <sup>-1</sup> pH 7,4	2 a 400 µmol L <sup>-1</sup> (2 µmol L <sup>-1</sup> )	Borisova <i>et al.</i> , 2018

FIA: análisis de inyección de flujo; GLDH: glutamato deshidrogenasa; GLOD: glutamato oxidasa; PBS: tampón fosfato HEPES; ácido 2- [4- (2-hidroxietil) -piperazin-1-il] -etanosulfónico.

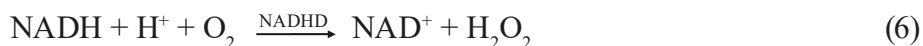
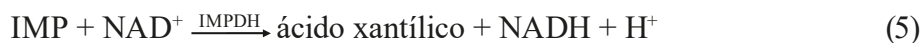
Fuente: tabla elaborada por los autores.

Basu *et al.* (2006) desarrollaron un sensor para GMS por coinmovilización de GLOD y GLDH, basado en el reciclaje de sustrato. Este paso de reciclaje del sustrato proporciona una amplificación de la respuesta del biosensor (Reacción 4). En presencia de NADPH y GMS, son utilizadas las actividades de las dos enzimas y el GMS es regenerado. La cuantificación del GMS fue realizada a través del consumo de oxígeno por el sistema.



El biosensor desarrollado presentó linealidad en el rango de concentración de GMS de 0,02 a 1,2 mg L<sup>-1</sup> en presencia de 10 mmol L<sup>-1</sup> de amoníaco. El pH óptimo fue de 7 ± 2 y el tiempo de respuesta de 2 min. El sensor se utilizó para la determinación de GMS en salsas y sopas. La preparación de la muestra consistió simplemente en la centrifugación de las muestras y la dilución del sobrenadante en tampón fosfato pH 7,0. Además fue adicionada una pequeña cantidad de ácido clorhídrico para prevenir la conversión del ácido glutámico en ácido pirrolidocarboxílico.

Matsumoto *et al.* (1998) desarrollaron un biosensor para la determinación simultánea de L-glutamato e inosina monofosfato (IMP) en alimentos. Para este fin, fueron acoplados dos reactores enzimáticos en serie, y las mediciones fueron realizadas en flujo. El interés en la determinación de IMP y GMS reside en el hecho de que ambos compuestos utilizados como aditivos alimentarios tienen la propiedad de realzar el sabor de los alimentos. Existe un efecto sinérgico del IMP y el glutamato, lo que lleva a aumentar la intensidad del gusto umami. En el método propuesto para la determinación de IMP fueron utilizadas las enzimas inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), obtenida a partir de *Bacillus cereus*, y la NADH deshidrogenasa (NADHD), obtenida de *Bacillus licheniformis* (Reacciones 5 y 6). La cuantificación del IMP se efectuó a través de la determinación del peróxido de hidrógeno con un transductor amperométrico.



Por otro lado, la cuantificación del glutamato se realizó a través de la reacción enzimática, utilizando la GLOD y de la determinación del peróxido de hidrógeno formado. El método presentó un rango lineal para el IMP y glutamato de 0,1 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup> y 1,0 a 10,0 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Las muestras de condimentos fueron diluidas en agua y filtradas antes del análisis. Como interferentes potenciales fueron identificados inosina difosfato e inosina trifosfato.

Karyakin *et al.* (2000) modificaron un biosensor amperométrico para la determinación de glutamato. Los autores inmovilizaron la GLOD en una película de Nafion bajo la superficie de un electrodo modificado con Azul de Prusia. El glutamato se determinó en un sistema de análisis por inyección en flujo en tampón fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> e KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,0. El potencial de detección fue de -50 mV *versus* Ag/AgCl, KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. El rango lineal del método estuvo en el intervalo de 1 10<sup>-7</sup> a 1 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de glutamato.

En los últimos años, se ha dado especial atención al desarrollo de membranas desechables que permiten eliminar procedimientos de regeneración de superficie de los sensores después de su uso. En este contexto, la tecnología de serigrafía (*screen-printing*), más conocida como *silk-screen* se ha utilizado con gran éxito en la fabricación de electrodos en las últimas décadas. Esto hace posible, la producción en masa de electrodos mediante un proceso simple, a un costo extremadamente bajo y que puede ser practicada en cualquier laboratorio. El electrodo impreso es una película depositada sobre un soporte inerte (Agnes & Nascimento, 1998). Utilizando esta tecnología, Beyene *et al.* (2003) propusieron un biosensor amperométrico para glutamato usando electrodo de carbono impreso modificado con MnO<sub>2</sub> y GLOD inmovilizada en película de Nafion®. El MnO<sub>2</sub> actúa como mediador de electrones, entre la enzima reducida y el electrodo. Las mediciones se realizaron en sistema de análisis por inyección en flujo, utilizando como cargador tampón fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,75 y un potencial de 440 mV *versus* Ag/AgCl. La curva analítica presentó un rango lineal de 10 a 160 mg L<sup>-1</sup>, con un límite de detección para glutamato 1,7 mg L<sup>-1</sup>. El biosensor fue aplicado en la determinación de glutamato en condimentos. En este caso, las muestras fueron disueltas en tampón fosfato y filtradas en membrana de 0,22 µm, antes de la cuantificación.

En los últimos años, los materiales sol-gel han atraído el interés de los investigadores por las características propicias del material para la inmovilización de enzimas en la construcción de biosensores. En este contexto, Doong & Shih (2006) desarrollaron un biosensor óptico de sol-gel de titanio, inmovilizado con seminaftorhodamina-1-dextrano (compuesto fluorescente) y la enzima GLDH

para aplicación en la determinación de glutamato en agua y material biológico (suero de albúmina bovina). La longitud de excitación utilizada fue de 488 nm y la emisión fue monitoreada en 588 y 640 nm. Utilizando material biológico, el sensor presentó un rango lineal para el glutamato de 0,02 a 10 mmol L<sup>-1</sup> y un límite de detección de 6,7 μmol L<sup>-1</sup>.

Tang *et al.* (2007) desarrollaron un biosensor amperométrico basado en la autoorganización de los dendrímeros de poli(amidoamina) encapsulados en nanopartículas de platino sobre nanotubos de carbono para la inmovilización de GLDH. El biosensor mostró un rango lineal para el glutamato de 0,2 a 250 μmol L<sup>-1</sup> con un tiempo de respuesta de 3 s. El límite de detección fue de 10 nmol L<sup>-1</sup>.

Borisova *et al.* (2018) describieron un biosensor amperométrico para monitorear la liberación de glutamato en terminales nerviosas en el cerebro de ratas. Con este fin, los autores construyeron un biosensor amperométrico que inmovilizaba la enzima GLOD y desarrollaron un algoritmo para monitorear la cinética de la liberación de glutamato tónico exocitótico y mediada por el transporte de terminales nerviosas aisladas del cerebro de ratas. El límite de detección del sensor fue de 2 μmol L<sup>-1</sup>.

### 3. CONSIDERACIONES FINALES

El glutamato monosódico ha despertado el interés de los investigadores desde hace un siglo por sus propiedades de realzar el sabor de los alimentos. Por este motivo, se han promovido discusiones tanto para aclarar su inocuidad como su eficacia. Todos estos estudios requieren métodos analíticos que sean capaces de cuantificar el glutamato en matrices complejas como alimentos y material biológico en un amplio rango de concentraciones. Si bien el glutamato está presente en alimentos en concentraciones de hasta 1 mg kg<sup>-1</sup>, en el material biológico se encuentra en nivel de μg g<sup>-1</sup>. Por lo tanto, para el análisis de los alimentos o del material biológico, los métodos analíticos requieren un desempeño diferenciado.

Los primeros métodos desarrollados para la determinación de glutamato en los alimentos fueron los titrimétricos, que aún hoy se recomiendan como métodos oficiales de análisis. Sin embargo, ellos han sido sustituidos por los métodos cromatográficos, principalmente por asociar rapidez de análisis con alta selectividad y capacidad de detección. Entre los métodos cromatográficos, la cromatografía líquida de alta eficiencia ha sido la más importante, asociada con los detectores de absorción en el ultravioleta (UV) y de fluorescencia. Debido

a que el glutamato no tiene fluorescencia nativa y no presenta absorción significativa en la región del UV, se han utilizado ampliamente las reacciones de derivatización pre y postcolumna. Sin embargo, con el desarrollo de columnas analíticas con partículas de diámetro menores de 2  $\mu\text{m}$ , la cromatografía líquida de ultra alta eficiencia ha sustituido la HPLC. Los análisis con alta eficiencia son más rápidos y consumen menos solventes y cuando se asocian con espectrometría de masas secuencial permiten la confirmación de la identidad del analito. Además, esta técnica no requiere reacciones de derivatización para permitir la cuantificación del glutamato y se puede aplicar tanto a muestras de alimentos como a material biológico.

También ha sido reportado en la literatura el uso de métodos electroforéticos, pero en menor medida. Estas metodologías usan los mismos detectores que la cromatografía líquida. Los avances consisten en los microdispositivos de tipo *Lab-on-a-chip*.

El uso de la cromatografía gaseosa ya no es una tendencia actual, dado que el glutamato presenta un alto punto de ebullición y no puede ser determinado por esta técnica sin previa derivatización para la formación de derivados volátiles.

Sin lugar a dudas, la estrategia más destacada para la determinación de glutamato en los últimos años ha sido el desarrollo y el uso de biosensores. Estos dispositivos son herramientas que han complementado las técnicas ya existentes, debido a sus características únicas, entre ellas: selectividad, costo relativamente bajo de construcción y almacenamiento, potencial para la miniaturización, facilidad de automatización de equipos y la construcción de equipamientos simples y portátiles. Muchos biosensores han sido desarrollados y aplicados en la determinación de glutamato en alimentos y en material biológico. La dificultad inicial del alto sobrevoltaje necesario para cuantificar el peróxido de hidrógeno o el NADH formado en las reacciones enzimáticas que utilizan la glutamato oxidasa o glutamato deshidrogenasa, fue superada por la incorporación de mediadores en los sensores. Además, nuevos materiales se han destacado en la elaboración de biosensores, entre ellos los electrodos impresos, que son desechables y los nanotubos de carbono. De esta forma, la combinación de biosensores con mediciones amperométricas ha representado el mayor avance con relación a métodos analíticos destinados a la determinación de glutamato en los alimentos y matrices biológicas. Aún más, por ser una técnica de relativo bajo costo y por todas las otras ventajas mencionadas, puede ser utilizada en varios segmentos de la industria y en centros de investigación.

#### 4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS C. *et al.* “Quantification of glutamate and aspartate by ultra-high performance liquid chromatography”. *Molecules*. 23(6): 1389-1404, 2018.

AGNES, L. & NASCIMENTO, V. B. “Eletrodos fabricados por silk-screen”. *Química Nova* . 21: 614, 1998.

AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. Official Method 970.37. “Monosodium Glutamate in Food”. *Potentiometric titration method*. 18. ed. Gaithersburg, AOAC International, 2005.

AULT, A. “The monosodium glutamate story: the commercial production of MSG and other amino acids”. *Journal of Chemical Education*. 81: 347-355, 2004.

BASU, A. K. *et al.* “A biosensor based on co-immobilized l-glutamate oxidase and l-glutamate dehydrogenase for analysis of monosodium glutamate in food”. *Biosensors Bioelectronics*. 21: 1968-1972, 2006.

BEYENE, N.W.; MODEREGGER, H. & KAICHER, K. “A stable glutamate biosensor based on MnO<sub>2</sub> bulk modified screen-printed carbon electrode and Nafion® film immobilized glutamate oxidase”. *South African Journal of Chemistry*. 56: 54-59, 2003.

BLANDINI, F. & GREENAMYRE, J. T. “Prospects of glutamate antagonists in the therapy of Parkinson’s disease”. *Fundamentals of Clinical Pharmacology*. 4-12, 1998.

BODOR, R. *et al.* “Isotachophoresis and isotachophoresis-zone electrophoresis of food additives on a *chip* with column-coupling separation channels”. *Journal of Separation Science*. 24: 802-809, 2001.

BORISOVA, R. *et al.* “An amperometric glutamate biosensor for monitoring glutamate release from brain nerve terminals and in blood plasma”. *Analytica Chimica Acta*. 1022: 113-123, 2018.

CAMPOS C. D. M. *et al.* “On-line electroextraction in capillary electrophoresis: application on the determination of glutamic acid in soy sauces”. *Electrophoresis*. 40: 322-329, 2019.

CFCC. COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX. *Food and Nutrition Board. Institute of Medicine on the National Academies*. 5. ed. Washington, The National Academies Press, 2004.

CHAKRABORTY, S. & RAJ, C. R. “Amperometric biosensing of glutamate using carbon nanotube based electrode”. *Electrochemistry Communications*. 9: 1323-1330, 2007.

CHAPMAN, J. & ZHOU, M. “Microplate-based fluorometric methods for the enzymatic determination of L-glutamate: application in measuring L-glutamate in food samples”. *Analytica Chimica Acta*. 402: 47-52, 1999.

CHEN, S. *et al.* “Separation and determination of amino acids by micellar electrokinetic chromatography coupling with novel multiphoton excited fluorescence detection”. *Journal of Chromatography A*. 1162: 149-153, 2007.

CURRY, K. K.; EVANS, J. W. & SCHWAB, G. “Determination of monosodium glutamate enantiomers by chiral phase capillary gas chromatography”. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*. 6(9): 510-511, 1983.

CURULLI, A. *et al.* “Enzyme electrode probes obtained by electropolymerization of monomers with PMS and selected dehydrogenase enzymes”. *Talanta*. 44: 1659-1669, 1997.

DEFAIX, C. *et al.* “Rapid analysis of glutamate, glutamine and GABA in mice frontal cortex microdialysis samples using HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 152: 31-38, 2018.

DOONG, R. & SHIH, H. M. “Glutamate optical biosensor based on the immobilization of glutamate dehydrogenase in titanium dioxide sol–gel matrix”. *Biosensors Bioelectronics*. 22: 185–191, 2006.

FERNANDEZ-FLORES, E.; JOHNSON, A. R. & BLOMQUIST, V. H. “Estimation of monosodium glutamate in food products”. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 52: 744-746, 1969.

GONZÁLEZ, R. R. *et al.* “Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass-spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples”. *Journal of Neuroscience Methods*. 198: 187-194, 2011.



GRANT, S. L. *et al.* “Determination of D-serine and related neuroactive aminoacids in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection”. *Journal of Chromatography B*. 804: 278-282, 2006.

HARADA, A. *et al.* “Effects of strain and cultivation medium on the chemical composition of the taste components in fruit-body of *Hypsizygus marmoreus*”. *Food Chemistry*. 84: 265-270, 2004.

KANG, X. *et al.* “Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples”. *Clinical Chimica Acta*. 366: 352-356, 2006.

KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E. & GORTON, L. “Amperometric biosensor for glutamate using Prussian blue-based artificial peroxidase as a transducer for hydrogen peroxide”. *Analytical Chemistry*. 72: 1720-1723, 2000.

KHAMPHA, W.; MEEVOOTISOM, V. & WIYAKRUTTA, S. “Spectrophotometric enzymatic cycling method using L-glutamate dehydrogenase and d-phenylglycine aminotransferase for determination of L-glutamate in foods”. *Analytica Chimica Acta*. 520: 133-135, 2004.

KWONG, A. W. K. *et al.* “Comparative study of hydrogel-immobilized L-glutamate oxidases for a novel thick-film biosensor and its application in food samples”. *Biotechnology Letters*. 22: 267-272, 2000.

LAU, O. W. & MOK, C. S. “Indirect conductometric detection of amino acids after liquid chromatographic separation. Part II. determination of monosodium glutamate in foods”. *Analytica Chimica Acta*. 302(1): 45-52, 1995.

LI, T. *et al.* “Capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection for measurement of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities in biofluids”. *Journal of Chromatography A*. 1134: 311-316, 2006.

MALINAUSKAS, A. & KULYS, J. “Alcohol, lactate and glutamate sensors based on oxidoreductases with regeneration of nicotinamide adenine dinucleotide”. *Analytica Chimica Acta*. 98: 31-37, 1978.

MATSUMOTO, K.; ASADA, W. & MURAI, R. “Simultaneous biosensing of inosine monophosphate and glutamate by use of immobilized enzyme reactors”. *Analytica Chimica Acta*. 358: 127-136, 1998.



NAGATA, Y. *et al.* “The presence of high concentrations of free d-amino acids in human saliva”. *Life Sciences*. 78: 1677-1681, 2006.

NIKOLELIS, D. P. “Kinetic-potentiometric determination of monosodium glutamate in soups and soup bases and of glutamic dehydrogenase”. *Analyst*. 112: 763-765, 1987.

PAULIUKAITE, R. *et al.* “L-Glutamate biosensor for estimation of the taste of tomato specimens”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386: 220-227, 2006.

PÉREZ-RUIZ, T. *et al.* “Analysis of glutamate in beverages and foodstuffs by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection”. *Chromatographia*. 52: 599-602, 2000.

POPULIN, T.; MORET, S. & TRUANT, S. “A survey on the presence of free glutamic acid in foodstuffs, with and without added monosodium glutamate”. *Food Chemistry*. 104: 1712-1717, 2007.

ROTZOLL, N.; DUNKEL, A. & HOFMANN, T. “Quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments on the key taste compounds in morel mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.)”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 2705-2711, 2006.

SPORNS, P. “Rapid high-performance liquid-chromatographic determination of monosodium glutamate in food”. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 65: 567-571, 1982.

STRAGIEROWICZ, J.; DARAGÓ, A. & KILANOWICZ, A. “Optimization of ultra-performance liquid chromatography (UPLC) with fluorescence detector (FLD) method for the quantitative determination of selected neurotransmitters in rat brain”. *Medycyna Pracy*. 68(5): 583-591 2017.

TANG, L. *et al.* “Amperometric glutamate biosensor based on self-assembling glutamate dehydrogenase and dendrimer-encapsulated platinum nanoparticles onto carbon nanotubes”. *Talanta*. 73: 438-443, 2007.

WANG, C. *et al.* “Determination of excitatory amino acids in biological fluids by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode induced fluorescence detection”. *Journal of Chromatography B*. 833: 129-134, 2006.

WILLIAMS, A. T. R. & WINFIELD, S. A. “Determination of monosodium glutamate in food using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection”. *Analyst*. 167: 1092-1094, 1982.

YAMAGUCHI, S. & NINOMIYA, K. “What is umami?”. *Food Reviews International*. 14: 123-138, 1998.

ZHANG, H. J. *et al.* “Determination of aspartate and glutamate in rabbit retina using polymer monolith microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386: 2035-2042, 2006.

ZHENG, Y. *et al.* “Simultaneous determination of amino acids, purines and derivatives in serum by ultrahigh-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry”. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 33: 81-88, 2019.