

ASPECTOS ANALÍTICOS DO GLUTAMATO

*Susanne Rath
Flavia Pereira da Silva Airoidi*

O glutamato monossódico é o sal de sódio do ácido glutâmico, aminoácido não essencial. O glutamato pode existir na forma ligada como parte da proteína, em conjunto a outros aminoácidos, ou ser encontrado na forma livre em tecidos de plantas e animais. No entanto, é o glutamato livre que desempenha papel importante no sabor e na palatabilidade dos alimentos.

O primeiro relato da obtenção do ácido glutâmico data de 1866, quando o químico alemão Ritthausen descreveu a obtenção desse composto puro a partir da hidrólise ácida da gliadina, um componente do glúten. No entanto, suas propriedades de realçar o sabor permaneceram desconhecidas até a primeira década do século XX, quando, em 1908, o Professor Kikunae Ikeda da Universidade Imperial de Tóquio descobriu que o ácido glutâmico é responsável pelo sabor distinto presente no caldo feito a partir de *kombu* (*Laminaria Japonica*), um tipo de alga usado através de séculos na culinária tradicional japonesa. Mediante um processo simples de extração com água quente, foi possível ao Professor Ikeda isolar 30 g de ácido L-glutâmico a partir de 40 kg de algas (Ault, 2004).

O processo de obtenção de glutamato monossódico (MSG) a partir de farinha de trigo foi patenteado em 1909 e o composto foi comercializado sob o nome comercial de Ajinomoto.

Em função de suas características de realçador de sabor, o MSG tem sido largamente empregado no mundo todo, sendo atribuído a ele o gosto umami, que é considerado o quinto gosto básico, distinto dos outros quatro gostos: doce, amargo, azedo e salgado. O MSG tem sido adicionado a alimentos preparados e processados, como alimentos congelados, mistura de temperos, sopas enlatadas e desidratadas, molhos, molhos para salada e produtos cárneos, como salsichas e presuntos. Naturalmente, ele está presente em alimentos proteicos como carnes, vegetais e leite.

O organismo humano também produz glutamato em larga escala. Músculos, cérebro e outros órgãos contêm glutamato na forma livre ou ligada a proteínas. Todavia, o L-glutamato livre é o aminoácido mais abundante no cérebro e um dos mais importantes neurotransmissores excitatórios no sistema nervoso central dos mamíferos. Quando a concentração de glutamato no cérebro é excessiva, este se torna tóxico aos neurônios que contêm receptores para glutamato (Blandini & Greenamyre, 1998).

Devido à importância do glutamato monossódico em nível biológico, assim como seu uso como ingrediente alimentar, muitas pesquisas têm sido realizadas sobre sua inocuidade e eficácia. Inúmeros estudos científicos continuam sendo realizados, focando, principalmente, sua utilidade na alimentação. Para tanto, é necessário que se tenha disponibilidade de métodos analíticos confiáveis, capazes de determinar o glutamato e ácido L-glutâmico em matrizes complexas, como alimentos e material biológico.

O presente capítulo tem como objetivo descrever as propriedades físico-químicas do glutamato e discorrer sobre os métodos analíticos desenvolvidos ao longo do tempo.

1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO GLUTAMATO MONOSSÓDICO

O composto 2-amino-5-hidroxi-5-oxo-pentanoato de sódio, conhecido comumente como glutamato monossódico, ou MSG, existe em duas formas enantioméricas. Enquanto o isômero levógiro (L) é responsável pelo gosto umami, o isômero dextrógiro (D) não apresenta características organolépticas.

A estrutura química do MSG está apresentada na Figura 2.1.

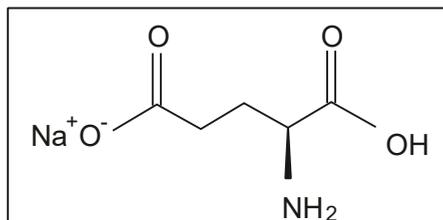


Figura 2.1 – Estrutura química do glutamato monossódico.

Fonte: figura preparada pelos autores.

O MSG está registrado no *Chemical Abstract Service* sob a identificação CAS 142-47-2. As propriedades físico-químicas estão sumarizadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas do glutamato monossódico.

Fórmula molecular	Massa molar	Aparência	Ponto de fusão	Solubilidade
$C_5H_8NO_4Na$	169,11	Pó cristalino branco	225 °C	Muito solúvel em água e pouco solúvel em etanol

O MSG não é higroscópico e é estável quando estocado à temperatura ambiente durante períodos prolongados. O pH de uma solução aquosa 1:20 (m/v) se situa entre 6,7 a 7,2 (CFCC, 2004).

Ainda, o MSG não sofre decomposição durante o processamento, ou seja, cozimento normal dos alimentos, mas em condições ácidas (pH 2,2 a 2,4) e altas temperaturas sofre conversão para 5-pirrolidona-2-carboxilato (Yamaguchi & Ninomiya, 1998).

De modo geral, o MSG é comercializado na sua forma hidratada (massa molar 187,13) e CAS 6106-04-3 (CFCC, 2004).

1.1. Produção

A produção industrial de MSG é realizada a partir do hidrocloreto do ácido L-glutâmico ou simplesmente do ácido L-glutâmico, o qual é dissolvido em água, neutralizado e convertido para o sal monossódico pela adição de hidróxido de sódio. Os cristais do MSG são obtidos após concentração da solução contendo MSG sob vácuo a 60 °C e centrifugação da mesma (Ault, 2004).

Por sua vez, o ácido glutâmico pode ser obtido a partir da sua extração de fontes naturais, síntese química, fermentação ou catálise enzimática. A obtenção

do ácido L-glutâmico por fermentação é atualmente o processo mais importante a ser considerado na produção do MSG. Esse processo foi estabelecido há mais de meio século, quando foi verificado que a *E. coli* é capaz de excretar aminoácidos e que o rendimento da reação é aumentado pela presença de sais de amônia no meio de cultura. As matérias-primas mais importantes para esse processo têm sido a cana-de-açúcar, o milho e a mandioca. Mais tarde, foi descoberta outra bactéria, a *Cornybacterium glutamicum*, que produz o ácido L-glutâmico (C₅H₉O₄N) a partir de carboidratos, oxigênio e amônia (Reação 1).



A vantagem da fermentação é a produção do isômero levógiro do ácido glutâmico, o qual na forma de sal de sódio apresenta as propriedades organolépticas desejadas de realçador de sabor. No processo de síntese se obtém uma mistura racêmica e a separação entantiomérica necessita ser realizada em uma etapa adicional.

2. MÉTODOS ANALÍTICOS

Um dos primeiros métodos descritos na literatura para determinação de glutamato foi proposto por Fernandez-Flores *et al.* (1969). O método se baseia na titulação do ácido glutâmico com hidróxido de sódio na presença de formaldeído, após separação prévia deste de uma matriz aquosa em uma coluna de troca iônica. Entretanto, esse método titrimétrico não apresenta detectabilidade e seletividade suficientes para quantificar o glutamato em alimentos na presença de outros aminoácidos. Para contornar essas limitações, modificações no método foram posteriormente propostas, tanto no preparo de amostras (separação e purificação), quanto artifícios para aumentar a detectabilidade do mesmo (Sporns, 1982).

Desde então, uma grande variedade de métodos tem sido descrita na literatura para a determinação de glutamato em matrizes diversas como alimentos e material biológico. Entre essas, titulações potenciométricas, métodos fluorimétricos, cromatografia em papel, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar e determinação por meio de analisadores de aminoácidos. Atualmente, a maioria dos métodos que visam à determinação de L-glutamato em matrizes biológicas, incluindo alimentos, envolve o emprego da

cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar ou medidas amperométricas com uso de biossensores.

Embora a cromatografia em papel e a cromatografia a gás tenham sido empregadas na determinação de glutamato, a primeira carece de precisão e a segunda requer uma etapa prévia de derivatização. Os métodos que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência ou analisador de aminoácidos associados a detectores UV ou fluorescência também demandam derivatização pós ou pré-coluna do ácido glutâmico. De modo geral, as técnicas cromatográficas requerem um preparo de amostra elaborado anterior à quantificação, visando à extração do analito da matriz, remoção de interferentes e concentração, o que demanda tempo e consumo de reagentes.

Nesse sentido, os métodos enzimáticos, utilizando biossensores, são uma alternativa interessante para os métodos cromatográficos, porque têm como característica seletividade e rapidez da resposta.

O método oficial proposto pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) baseia-se na quantificação do ácido glutâmico mediante titulação com hidróxido de sódio na presença de formaldeído, após extração e limpeza em coluna de troca iônica (AOAC, 2005). No entanto, esse método não é adequado para quantificar glutamato em alimentos e material biológico e não indica contaminação cruzada por outros aminoácidos (Lau & Mok, 1995).

A seguir, são apresentados e discutidos os principais métodos analíticos empregados para a determinação de glutamato em alimentos e matrizes biológicas.

2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

Os métodos cromatográficos têm sido largamente empregados nas mais diversas áreas, por suas inúmeras vantagens frente a outros métodos, principalmente no que concerne à separação, identificação e quantificação de compostos em matrizes complexas em uma única análise. A sensibilidade da técnica depende do sistema de detecção associado ao sistema cromatográfico. Devido ao glutamato não apresentar um cromóforo que resulte em uma absorção significativa de energia na região do ultravioleta ou visível do espectro eletromagnético, ou mesmo presente um grupo funcional com propriedades fluorescentes, reações de derivatização pré ou pós-coluna se fazem necessárias para permitir a quantificação do mesmo em matrizes biológicas. Como reagentes de derivatização, têm sido usados fenilisotiocianato (PITC), cloreto de dansila (DNS-Cl), o-ftaldialdeído (OPA), 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC), entre outros. No entanto, de

modo geral, as reações de derivatização são demoradas, os derivados formados carecem, muitas vezes, de estabilidade e os interferentes de matrizes biológicas não são totalmente eliminados, podendo afetar a seletividade do método (Zhang *et al.*, 2006).

O método mais conhecido para a determinação de aminoácidos por HPLC envolve a reação do analito com o o-ftaldialdeído (OPA) e 2-mercaptoetanol (2-ME) para produzir derivados isoindóis fluorescentes, que são separados na coluna cromatográfica e quantificados por intermédio de um detetor de fluorescência. No entanto, o método não permite a diferenciação dos entantiômeros. Para a análise enantioseletiva, o 2-ME necessita ser substituído por tióis quirais, como N-acetilcisteína, N-isobutiril-L-cisteína (IBC) e outros (Grant *et al.*, 2006). A reação de derivatização de um aminoácido com OPA e IBC está representada na Figura 2.2.

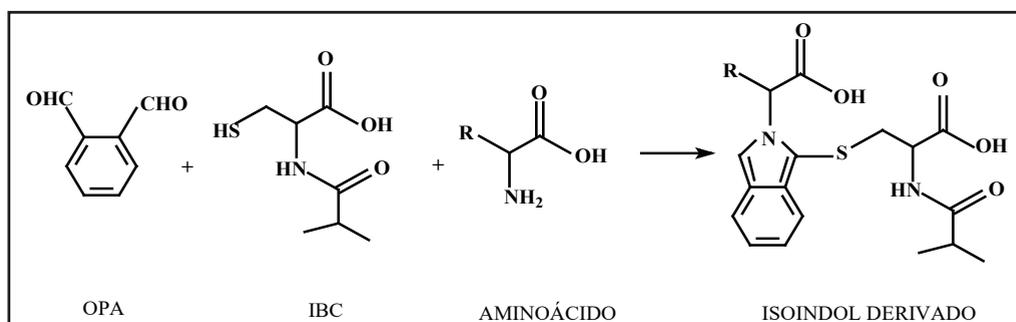


Figura 2.2 – Reação de derivatização de um aminoácido com o-ftaldialdeído (OPA) e N-isobutiril-L-cisteína (IBC).

Fonte: figura preparada pelos autores.

A propriedade do cloreto de dansila em formar derivados fluorescentes com aminas primárias e secundárias também tem sido explorada para a quantificação de glutamato por HPLC. Neste caso, os derivados fluorescentes podem ser separados em uma fase estacionária octadecilsilano, utilizando uma fase móvel composta de metanol:água. Williams & Winfield (1982) empregam esse procedimento para a determinação de glutamato em amostras de sopas. Os comprimentos de onda de excitação e emissão do dispositivo de detecção foram ajustados em 245 nm e 328 nm, respectivamente, e o glutamato foi extraído das amostras com água.

Populin *et al.* (2007) determinaram aminoácidos, entre esses o ácido glutâmico e aminas biogênicas em alimentos (sopas prontas, molhos de saladas,

vegetais, carnes, proteínas vegetais hidrolisadas, entre outros), com e sem a presença de MSG, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência associada ao detetor de fluorescência (HPLC-FL). Os aminoácidos foram derivatizados com OPA e a separação foi realizada em coluna octadecilsilano, empregando como fase móvel água:tampão fosfato pH 7,0 (370:90 v/v) + acetonitrila e eluição por gradiente. Para a detecção, foram empregados comprimentos de onda de excitação e emissão de 330 e 440 nm, respectivamente. O preparo de amostras consistiu basicamente na extração dos aminoácidos da matriz com água anterior à derivatização com OPA. As amostras líquidas (prontas para consumo) foram simplesmente diluídas com água antes da reação de derivatização e quantificação por HPLC. As amostras do tipo pós, granulados e pastas foram dissolvidas em água fervente e tratadas como amostras líquidas. No caso de amostras mais complexas, como sopas com pedaços de vegetais, molhos de saladas e temperos, uma quantidade representativa da amostra foi homogeneizada e adicionada de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. A solução foi centrifugada e o sobrenadante filtrado anteriormente à etapa de derivatização. O maior teor de glutamato em alimentos que não foram adicionados de MSG foi verificado nos produtos contendo hidrolisados de proteínas (> 129 mg/100 g) e a maior porcentagem de alimentos que apresentaram MSG na sua composição foram as sopas e molhos para salada (76,8%-92,5%).

Harada *et al.* (2004) estudaram o efeito da linhagem e o meio de cultivo sobre a composição química de componentes responsáveis pelo sabor (açúcares solúveis e aminoácidos livres) em cogumelos *Hypsizyguis marmoreus*. O preparo das amostras consistiu na extração dos analitos da amostra previamente liofilizada com uma solução água:etanol (20:80 v/v). A quantificação dos aminoácidos foi realizada por HPLC-FL.

Rotzoll *et al.* (2006) realizaram estudo para identificar compostos com propriedades organolépticas em cogumelos *Morchella deliciosa Fr*, entre esses o ácido L-glutâmico. Os cogumelos foram triturados, e os aminoácidos extraídos com água. O extrato foi filtrado e fracionado em ultracentrífuga. A fração de baixa massa molar (<1 kDa) foi liofilizada e, posteriormente, dissolvida em uma solução tampão 0,1 mol L⁻¹ contendo acetato de sódio, metanol, ácido fórmico, ácido acético e ácido octanóico anterior à quantificação, utilizando-se, para tanto, um analisador de aminoácidos.

Em substituição ao detetor de fluorescência, Lau & Mok (1995) desenvolveram um método para a determinação de glutamato em alimentos (sopas, molhos e alimentos infantis), empregando HPLC associada a um detetor de

condutividade. Como coluna analítica foi empregada uma coluna Econosil CN e como fase móvel água:acetonitrila:tetraidrofurano (77:22:3 v/v/v) adicionada de 1 mmol L⁻¹ de ácido perclórico. As amostras que não continham amido na sua composição foram previamente homogeneizadas e adicionadas de água e carvão ativo. Após filtração, o extrato foi limpo por intermédio de uma coluna de troca iônica (Dowex 50WX8 (H⁺), 100-200 mesh). Anteriormente à análise cromatográfica, os eluatos foram liofilizados para remoção do ácido clorídrico.

Um método simples e versátil, usando HPLC-FL, foi descrito por Grant *et al.* (2006) para a determinação de aminoácidos neuroativos no sistema glutamatérgico, entre esses, L-serina, L-glutamato, L-glutamina e glicina. Anteriormente à análise, os aminoácidos foram derivatizados com OPA e N-isobutil L-cisteína (IBC) em uma solução de metanol e tampão borato pH 10. O método foi aplicado na análise de plasma. Para tanto, as amostras foram previamente desproteinizadas, usando metanol e centrifugação. A separação cromatográfica foi realizada em coluna octadecilsilano e fase móvel composta de dois solventes: fosfato de sódio 0,04 mol L⁻¹:metanol (85:15 v/v) e fosfato de sódio 0,04 mol L⁻¹: metanol:tetraidrofurano (67:55,5:3 v/v/v), ambas fases ajustadas para pH 6,2. A eluição foi realizada por gradiente. Os derivados de aminoácidos foram monitorados nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 260 nm e 455 nm, respectivamente. O método se mostrou linear no intervalo de 2,5 a 100 ng de L-glutamato.

Zhang *et al.* (2006) descreveram um método, usando HPLC-FL, para a determinação de glutamato e aspartato em retina de coelhos. Para tanto, combinaram a microextração em polímero monólito com derivatização dos analitos com 8-fenil-(4-oxi-ácido acético N-hidroxisuccinimida ester)-4,4difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-S-indaceno. O limite de detecção estabelecido para o glutamato foi de 0,53 nmol L⁻¹.

Nagata *et al.* (2006) relatam resultados obtidos na determinação de serina, alanina, prolina, aspartato e glutamato em saliva, empregando duas técnicas cromatográficas em série: cromatografia em camada delgada bidimensional e HPLC. As amostras de saliva livre de células foram tratadas com ácido tricloroacético 5%, para remoção de proteínas, e o extrato foi clarificado em coluna de troca iônica. O eluato foi concentrado e os aminoácidos derivatizados com 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida anterior à separação dos mesmos por cromatografia em camada delgada bidimensional. Após separação, os derivados foram removidos da placa e analisados por HPLC com detecção em 340 nm, mediante emprego de uma fase estacionária octadecil e fase móvel

composta por acetonitrila e tampão trietilamina- fosfato pH 3,5, usando gradiente de eluição.

Um método para a determinação de doze aminoácidos, entre esses, o glutamato, em tecido cerebral de ratos e plasma de coelhos foi proposto por Kang *et al.* (2006). Para tanto, o cérebro ou plasma foi homogeneizado em ácido perclórico, seguido de centrifugação para remoção de proteínas. Subsequentemente, os extratos foram transferidos para uma solução de bicarbonato de potássio-hidróxido de potássio 2 mol L^{-1} e os aminoácidos foram derivatizados com DNS-Cl em meio de acetonitrila. A reação foi processada por 30 min, no escuro, a $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, a reação foi interrompida mediante adição de ácido acético, a mistura centrifugada e o sobrenadante injetado no sistema cromatográfico. A separação dos derivados foi realizada em coluna de fase reversa octadecilsilano e uma fase móvel composta de metanol:água adicionada de trietilamônia 1,5% e hidróxido de tetrabutilamônia 5 mmol L^{-1} , pH 2,5, sob eluição isocrática. A quantificação foi realizada na região do ultravioleta em 286 nm e os autores concluíram que, nas condições experimentais estabelecidas, o detetor UV apresentou maior sensibilidade do que o detetor de fluorescência. O limite de detecção, para um volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$, foi de 38 ng para o glutamato.

A cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) vem substituindo a cromatografia líquida de alta eficiência na última década nas mais diversas aplicações, pelas vantagens da alta eficiência das colunas analíticas de diâmetro de partículas menores do que $2 \text{ }\mu\text{m}$ aliadas a menores tempos de análise e consumo de solventes. González *et al.* (2011) empregaram a UHPLC associada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) para a determinação de neurotransmissores, incluindo o glutamato, em cérebro de ratos e Stragierowicz *et al.* (2017) reportaram um método para a determinação de neurotransmissores na mesma matriz usando a UHPLC com detector de fluorescência.

A vantagem do uso da UHPLC-MS/MS na determinação de glutamato e outros aminoácidos é a seletividade quando operado no modo de reações selecionadas e a não necessidade da adição de um agente de derivatização. Zheng *et al.* (2019) reportaram um método, usando a UHPLC-MS/MS para a determinação de aminoácidos, purinas em soro sanguíneo, incluindo glutamato. Para a quantificação foi monitorada a transição do íon precursor (m/z 148,2) para o íon produto (m/z 84,0). O preparo de amostra consistiu na precipitação das proteínas pela adição de metanol. Após centrifugação e separação das proteínas, o sobrenadante foi filtrado e analisado diretamente no UHPLC-MS/MS. A fonte de

electrospray foi operada no modo positivo. O limite de quantificação do método para a determinação de glutamato no soro foi de 0,8 ng mL⁻¹.

2.2. Cromatografia a gás

O emprego da cromatografia a gás para a resolução de aminoácidos opticamente ativos tem sido explorado por muitos pesquisadores. No caso da produção do MSG por fermentação, é importante que existam técnicas disponíveis que permitam a diferenciação dos dois enantiômeros, mesmo quando um estiver em concentração muito menor do que o outro. Nesse contexto, Curry *et al.* (1983) descreveram um método para a determinação de D-MSG e L-MSG por cromatografia a gás, usando coluna capilar quiral e um detetor de ionização por chama. A quantificação foi realizada após derivatização do glutamato com anidrido trifluoroacético e usando a L-fenilalanina como padrão interno. O método foi avaliado para amostras líquidas contendo de 30-40% de MSG em sua composição.

2.3. Eletroforese capilar

As técnicas eletroforéticas que se fundamentam na eletromigração de moléculas carregadas em solução sob a força de um campo elétrico têm sido amplamente empregadas em aplicações analíticas diversas, principalmente, no campo da bioquímica. Entre as técnicas eletroforéticas, a eletroforese capilar de zona ou solução livre (CZE) tem-se destacado nos últimos anos, principalmente devido a algumas vantagens frente aos demais métodos cromatográficos como: alta eficiência, requerimento de pequenos volumes de solventes e amostras, assim como rapidez de análise. Baseados na eletromigração e nos diferentes modos de separação, têm sido desenvolvidas técnicas, entre outras, como a cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), eletroforese capilar de gel (CGE) e eletroforese capilar por focalização isoeletrica (CIEF). Uma das grandes versatilidades da eletroforese capilar é a possibilidade da associação de uma ampla variedade de detetores, como: absorção no UV-Vis, fluorescência, fluorescência induzida por laser, espectrometria de massas, condutividade, amperometria, radioatividade, índice de refração, dicroísmo circular e Raman.

No entanto, para a separação e determinação de aminoácidos tem se destacado o emprego da CZE e MECK, associadas a detectores de absorção no UV e/ou fluorescência induzida por laser (LIF).

Devido às propriedades físico-químicas do MSG, anterior à quantificação, procedimentos de derivatização são recomendados para melhorar a sensibilidade do método. Para a detecção usando LIF, têm sido empregados reagentes como 4-fluoro-7-nitrobenofurazano (NBD-F), naftalenodicarboxaldeído (NDA) e o-ftalaldeído (OPA) (Chen *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2006).

Pérez-Ruiz *et al.* (2000) descrevem um método para a determinação de glutamato em bebidas e alimentos usando a CZE com detecção por LID. O método apresentou linearidade na faixa de concentração de glutamato de 10^{-7} a 10^{-4} mol L⁻¹, com um limite de detecção de $5,4 \cdot 10^{-10}$ mol L⁻¹.

Um método, empregando a técnica MEKC para a separação de vinte aminoácidos, incluindo o ácido glutâmico, foi proposto por Chen *et al.* (2007). Os aminoácidos foram derivatizados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e quantificados com um detetor de fluorescência com excitação multifóton desenvolvido pelos próprios autores.

Bodor *et al.* (2001) empregaram a isotacoforese em um *chip* com detetor de condutividade para a separação e determinação de aditivos alimentares, entre esses, o benzoato, sorbato, ésteres do ácido p-hidroxibenzoico e glutamato. O método foi empregado na determinação de glutamato em alimentos.

Para a determinação de aminoácidos excitatórios, Wang *et al.* (2006) empregaram a eletroforese capilar associada a um detetor de fluorescência. Os aminoácidos foram derivatizados com naftaleno-2,3 dicarboxaldeído. A separação dos analitos foi obtida em capilar de sílica fundida com tampão borato 10 mmol L⁻¹, pH 9,3. O limite de detecção para o ácido glutâmico foi de $2,1 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹ e o método foi utilizado para a determinação de ácido glutâmico e aspártico em fluidos biológicos (soro humano e fluido cefalorraquidiano). As amostras de soro e fluido cefalorraquidiano foram diluídas e agitadas com acetonitrila para precipitar as proteínas. A mistura foi deixada em banho de gelo por uma hora e centrifugada. Em seguida, foi adicionado o agente de derivatização.

Um novo método para a determinação da atividade da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase em fluidos biológicos, baseados na separação e quantificação de alanina, glutamato e aspartato por eletroforese capilar com detecção por eletroquimiluminescência, foi proposto por Li *et al.* (2006). A separação foi promovida em tampão fosfato 5 mmol L⁻¹, pH 2,1 e a detecção foi conduzida em um eletrodo de disco de platina (1,2 V vs Ag/AgCl) na presença de tris (2,2-bipiridil) rutênio (II) dissolvido em fosfato 80 mmol L⁻¹, pH 10,5. O método se mostrou adequado para aplicação na biologia celular e área clínica.

Tabela 2.2 – Métodos de separação empregados para a determinação de glutamato em alimentos e material biológico.

Técnica	Coluna	Fase móvel	Agente de derivatização	Faixa linear (LOD)	Matriz	Referência
HPLC-FLD	ODS	CH ₃ OH/H ₂ O	DNS-Cl	0 a 10 µg mL ⁻¹	Sopas	Williams & Winfield, 1982
GC-FID	Fase quiral	Hélio	Anidrido trifluoroacético	–	Amostras líquidas	Curry <i>et al.</i> , 1983
HPLC-CD	Ciano	H ₂ O/CH ₃ CN/THF/HClO ₄	–	0 a 500 µg mL ⁻¹	Sopas e molhos	Lau & Mok, 1995
TLC +	ODS	CH ₃ CN /tampão 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 sódio pH 6,2/CH ₃ OH e fosfato de sódio pH 6,2/CH ₃ OH/THF	OPA e IBC	2,5 a 100 ng	Plasma	Grant <i>et al.</i> , 2006
HPLC-FLD	ODS	CH ₃ OH / H ₂ O – trietilamina-hidróxido de tetrabutilamônia, pH 2,5	DNS-Cl	23 a 454 ng (38 ng)	Cérebro de rato e plasma de coelho	Kang <i>et al.</i> , 2006
CZE-EQ	ODS	PBS 5 mmol L ⁻¹ , pH 2,1	–	–	Material biológico	Li <i>et al.</i> , 2006
CZE-FLD	ODS	BBS 10 mmol L ⁻¹ , pH 9,3	Naftaleno-2,3 dicarboxaldeído	(2,1 10 ³ mol L ⁻¹)	Fluidos biológicos	Wang <i>et al.</i> , 2006
CZE-FLD	ODS	Ácido [3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propa-no sulfônico] 20 mmol L ⁻¹ , pH 9,0	FITC	10 ⁷ a 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ (5,4 10 ⁻¹⁰ mol L ⁻¹)	Alimentos e bebidas	Pérez-Ruiz <i>et al.</i> , 2000
HPLC-FLD	ODS	H ₂ O-PBS pH 7,0/acetonitrila	OPA	–	Sopas prontas, molhos de saladas, vegetais, carnes, proteínas vegetais hidrolisadas	Populin <i>et al.</i> , 2007
UHPLC-FLD	BEH C18	Tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 6,0; CH ₃ OH	OPA	100 a 10.000 ng mL ⁻¹ (30 ng mL ⁻¹)	Cérebro de ratos	Stragierowicz <i>et al.</i> , 2017
UHPLC-UV	Fenil-hexil	N-metilmorfolina 50 mmol L ⁻¹ tampão acetato pH 7,4/12% CH ₃ CN	2,4-Dinitrofluorobenzeno	–	Tomates	Agius <i>et al.</i> , 2018
UHPLC-MS/MS	BEH C18	CH ₃ OH e ácido fórmico com adição de HFBA 1 mmol L ⁻¹	HFBA	1 a 200 µg L ⁻¹ (0,73 µg g ⁻¹)	Cérebro de ratos	González <i>et al.</i> , 2011
UHPLC-MS/MS	Nucleoshell HILIC	Formiato de amônio 25 mmol L ⁻¹ , pH 3,5 (ajustado com ácido fórmico) e CH ₃ CN	–	2,5 a 2.000 ng mL ⁻¹ (0,25 ng mL ⁻¹)	Córtex de ratos	Defaix <i>et al.</i> , 2018
UHPLC-MS/MS	BEH amida	Ácido fórmico 0,1% aquoso e CH ₃ CN adicionado de ácido fórmico 0,1%	–	0,099 a 9,9 µg mL ⁻¹ (0,2 µg mL ⁻¹)	Soro sanguíneo	Zheng <i>et al.</i> , 2019
MEKC-MPEF	–	BBS 25 mmol L ⁻¹ , SDS 100 mmol L ⁻¹ e 5% CH ₃ OH, pH 11,0	FITC	9,73 a 109 µmol L ⁻¹ (1,25 µmol L ⁻¹)	Suplementos nutricionais	Chen <i>et al.</i> , 2007

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; UHPLC: cromatografia líquida de ultra-alta eficiência; FLD: detector de fluorescência; CD: detector de condutividade; UV: ultra-violeta; MS/MS: espectrometria de massas sequencial; TLC: cromatografia em camada delgada; CZE: eletroforese capilar de zona; MEKC: cromatografia eletrocromatográfica micelar; MPEF: fluorescência com excitação multifóton; EQ: eletroquimioluminescência; GC: cromatografia a gás; FID: ionização por chama; ODS: octadecilsilano; DNS-Cl: cloroeto de dansila; OPA: o-ftalaldeído; IBC: N-isobutiril L-cisteína; BBS: tampão borato; PBS: tampão fosfato; HFBA: ácido heptafluoro butírico.

Fonte: tabela elaborada pelos autores.

O emprego de detetores eletroquímicos oferece vantagem frente aos detetores óticos por não requer a derivatização do glutamato anterior à quantificação. Neste contexto se destacam os detetores por condutometria sem contato acoplados capacitivamente (C⁴D). Esses detetores embora sejam de baixo custo, simplicidade técnica e permitirem a detecção de multicompostos sofrem efeito da matriz, o que pode comprometer a seletividade e detectabilidade dos analitos.

Um método empregando eletroextração líquido-líquido (sistema aquoso bifásico) *on-line* à eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente foi desenvolvido por Campos *et al.* (2019) e empregado na determinação de ácido glutâmico em amostras de shoyu, que contêm alto teor de sódio.

As principais reações e condições empregadas para a determinação de glutamato por técnicas de separação estão sumarizadas na Tabela 2.2.

2.4. Métodos espectroanalíticos

Chapman & Zhou (1999) desenvolveram dois métodos fluorimétricos para a determinação de L-glutamato em amostras biológicas e alimentos. O primeiro, descreve o emprego de uma reação de reciclagem contínua do substrato catalisada pela L-glutamato oxidase (GLOD) e glutamato-piruvato-transaminase (GPT). O peróxido de hidrogênio formado na reação enzimática é determinado indiretamente na forma de Resorufin (derivado fluorescente) que se forma na reação de H₂O₂ com Amplex Red. O segundo método segue o princípio do primeiro, no entanto, emprega como enzimas a L-glutamato desidrogenase (GLDH) e GPT. Nesta reação, o glutamato é quantificado pelo NADH formado na reação enzimática mediante reação deste com resazurin na presença de diaforase. Do mesmo modo, nesta reação ocorre a formação do derivado fluorescente Resorufin. Os métodos foram aplicados na determinação de L-glutamato em sopas. O preparo de amostras consiste na centrifugação das amostras líquidas e diluição do sobrenadante em tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹, pH 7,5. Os autores enfatizam que o método fluorimétrico com Amplex Red é 500 vezes mais sensível que o método espectrofotométrico convencional, que é decorrente da estratégia de reciclagem do substrato, assim como, do emprego do reagente de derivatização.

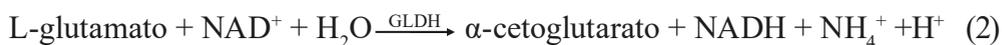
Baseado no mesmo princípio de reciclagem do substrato, Khampha *et al.* (2004) descreveram um método para a determinação de L-glutamato em alimentos, empregando como enzimas a GLDH e a D-fenilglicina aminotransferase (D-PhgAT). A GLDH transforma o glutamato em 2-oxoglutarato com redução concomitante do NAD⁺ para NADH. O oxoglutarato, por sua vez, é reciclado

para glutamato pela reação de transaminação catalisada pela enzima D-PhgAT, usando a D-hidroxifenilglicina como um doador de grupo amino. Nessa reação, a hidroxifenilglicina é convertida a 4-hidroxibenzoilformato que absorve fortemente em 340 nm. O limite de detecção é de 0,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

2.5. Biossensores

Os biossensores são dispositivos nos quais materiais de origem biológica (enzimas, anticorpos, organelas, ácidos nucleicos e outros) são imobilizados junto a um transdutor adequado. De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como óptico (medida de fluorescência, luminescência etc.), eletroquímico (condutimétrico, potenciométrico e amperométrico) e detector de massas. Existe um número elevado de artigos científicos publicados na literatura que descrevem métodos que empregam biossensores para aplicações analíticas em alimentos e material biológico, o que pode ser atribuído às suas características importantes, tais como, seletividade, resposta rápida, baixo custo e facilidade na construção, assim como possibilidades de miniaturização.

O primeiro biossensor eletroquímico para glutamato foi desenvolvido por Malinauskas & Kulys, em 1978, utilizando a enzima glutamato desidrogenase (GLDH) e a coenzima NAD^+ , imobilizadas em uma membrana semipermeável. Nesta Reação (2), ocorre a formação de NADH, que, geralmente, é a espécie monitorada para fins quantitativos.



No entanto, a oxidação direta do NADH em eletrodos não modificados requer um elevado sobrepotencial, devido ao processo lento de transferência de carga. Para contornar essa limitação, diversos mediadores redox têm sido incorporados na superfície de eletrodos, como: MnO_2 (Beyene *et al.*, 2003), tetrafulvaleno-tetracianoquinodimetano (Pauliukaite *et al.*, 2006), metassulfato de fenazina (Malinauskas & Kulys, 1978, Curulli *et al.*, 1997), entre outros. Os mediadores podem ser imobilizados por diferentes processos, como: quimiosorção, ligação covalente na superfície do eletrodo ou polímeros condutores, filmes poliméricos depositados eletroquimicamente sobre a superfície do eletrodo e em pasta de carbono (Curruli *et al.*, 1997). Ainda, foi verificado que nanotubos de carbono são capazes de reduzir o sobrepotencial para a oxidação do NADH (Chakraborty & Raj, 2007).

Além da enzima GLDH, a L-glutamato oxidase (GLOD), produzida pelo *Streptomyces sp*, tem sido amplamente empregada em biossensores para a determinação do glutamato. A GLOD oxida o L-glutamato para α -cetoglutarato com a formação de amônia e peróxido de hidrogênio (Reação 3).



A reação e a quantificação do glutamato podem ser monitoradas pela formação de peróxido de hidrogênio, usando método amperométrico. No entanto, igualmente ao NADH, a determinação de peróxido de hidrogênio através da sua oxidação requer um elevado sobrepotencial, o que pode vir a afetar a seletividade do método.

Nas medidas eletroquímicas usando biossensores, os eletrodos geralmente empregados são metais inertes e a enzima necessita ser incorporada na superfície dos mesmos. Para tanto, têm sido empregadas membranas poliméricas, Nafion, filmes de polifenildiaminas, entre outros (Pauliukaite *et al.*, 2006).

Alguns biossensores e suas aplicações na determinação de L-glutamato em amostras de alimentos e material biológico estão descritos a seguir e sumarizados na Tabela 2.3.

Kwong *et al.* (2000) desenvolveram um biossensor para a determinação de L-glutamato em molhos de soja. A enzima GLOD foi imobilizada usando um hidrogel de poli(carbamoil sulfonado) e a quantificação realizada por um detector eletroquímico. O sensor mostrou linearidade na faixa de 0,1 mmol L⁻¹ a 5 mmol L⁻¹ de L-glutamato, com um limite de detecção de 1,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ainda, o sensor apresentou seletividade na presença da maioria de outros aminoácidos, com exceção de L-asparagina, L-glutamina, L-ácido aspártico e L-histidina.

A formação de amônia na reação enzimática foi empregada para a determinação de glutamato em alimentos, através de um sensor potenciométrico (Nikolelis, 1987). O método apresentou linearidade adequada para o glutamato na faixa de 1 10⁻⁵ mol L⁻¹ a 1 10⁻⁴ mol L⁻¹.

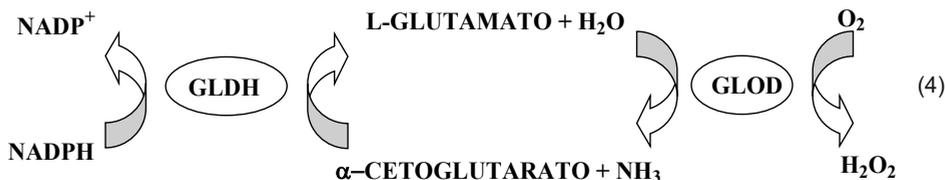
Tabela 2.3 – Biossensores empregados para a determinação de glutamato em alimentos e material biológico

Técnica/Potencial	Biossensor	Espécie Monitorada	Amostras	Eletrolito	Faixa Linear (LOD)	Referência
Potenciometria	GLDH	NH ₃	Sopas	Tris-HCl pH 8,5	1 10 ⁻⁴ a 1 10 ⁻³ mol L ⁻¹	Nikolelis, 1987
FIA-Amperometria/ 650 mV	Inosina monofosfato desidrogenase e NADH desidrogenase	H ₂ O ₂	Temperos	PBS 0,3 mol L ⁻¹ , pH 8,0	1,0 a 10,0 mmol L ⁻¹	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998
FIA-Amperometria/ 400 mV	Pt/GLOD + Hidrogel poli(carbamoil sulfonato)	H ₂ O ₂	Temperos	PBS 67 mmol L ⁻¹ pH 6,86	0,1 a 5 mmol L ⁻¹ (1,01 μmol L ⁻¹)	Kwong <i>et al.</i> , 2000
FIA-Amperometria/ 50 mV	Azul da Prússia-Nafion®/GLOD	H ₂ O ₂	–	PBS 0,05 mol L ⁻¹ e KCl 0,1 mol L ⁻¹ , pH 6,0.	1 10 ⁻⁷ a 1 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ (1 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹)	Karyakin <i>et al.</i> , 2000
Amperometria/ 440 mV	Eletrodo de carbono impresso/filme de Nafion® + MnO ₂ + GLOD	H ₂ O ₂	Temperos	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,75	10 a 60 mg L ⁻¹ (1,7 mg L ⁻¹)	Beyene <i>et al.</i> , 2003
Potenciometria	Eletrodo de oxigênio/GLOD + GLDH + policarbonato	O ₂	Sopas e molhos	PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,02 a 1,2 mg L ⁻¹ (0,02 mg L ⁻¹)	Basu <i>et al.</i> , 2006
Fluorescência	Sol-gel de titânia imobilizado com carboxi seminaftorhodamina-1-dextran/ GLDH	Derivado fluorescente	Água e soro de albumina bovina	Tampão 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino] propano, 2,5 mmol L ⁻¹ pH 9,0	0,02 a 10 mmol L ⁻¹ (6,7 μmol L ⁻¹)	Doong & Shih, 2006
Amperometria/ 200 mV	Poli(amidoamina) encapsuladas em nanopartículas de platina sobre nanotubos de carbono/ GLDH			PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4	0,2 a 250 μmol L ⁻¹ (10 nmol L ⁻¹)	Tang <i>et al.</i> , 2007
Amperometria/ 600 mV	Eletrodo de platina/ poli(m-fenilenediamina)/GLOD	H ₂ O ₂	Nervos cerebrais de ratos	Tampão HEPES 25 mmol L ⁻¹ pH 7,4	2 a 400 μmol L ⁻¹ (2 μmol L ⁻¹)	Borisova <i>et al.</i> , 2018

FIA: análise por injeção em fluxo; GLDH: glutamato desidrogenase; GLOD: glutamato desidrogenase; GLOD: glutamato oxidase; PBS: tampão fosfato; HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanosulfônico.

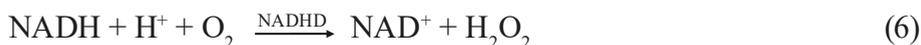
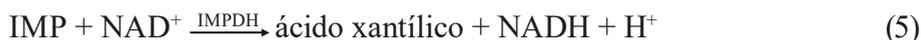
Fonte: tabela elaborada pelos autores.

Basu *et al.* (2006) desenvolveram um sensor para MSG por coimobilização de GLOD e GLDH, baseado na reciclagem do substrato. A reciclagem do substrato fornece uma amplificação da resposta do biossensor (Reação 4). Na presença de NADPH e MSG, ambas as atividades das enzimas são utilizadas e o MSG é regenerado. A quantificação do MSG foi feita através do consumo de oxigênio pelo sistema.



O biossensor desenvolvido apresentou linearidade na faixa de concentração de MSG de 0,02 a 1,2 mg L⁻¹ na presença de 10 mmol L⁻¹ de amônia. O pH ótimo foi de 7 ± 2 e o tempo de resposta de 2 min. O sensor foi empregado na determinação de MSG em molhos e sopas. O preparo de amostras consistiu simplesmente na centrifugação das amostras e diluição do sobrenadante em tampão fosfato pH 7,0 com adição de uma pequena quantidade de ácido clorídrico para prevenir a conversão do ácido glutâmico em ácido pirrolidonicarboxílico.

Matsumoto *et al.* (1998) desenvolveram um biossensor para a determinação simultânea de L-glutamato e inosina monofosfato (IMP) em alimentos. Para tanto, foram acoplados dois reatores enzimáticos em série e as medidas realizadas em fluxo. O interesse na determinação de IMP e MSG reside no fato de que ambos compostos utilizados como aditivos alimentares têm a propriedade de realçar o sabor de alimentos. Existe um efeito sinérgico do IMP e glutamato o que leva a aumentar a intensidade do gosto umami. No método proposto para a determinação de IMP, foram usadas as enzimas inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), obtida do *Bacillus cereus*, e NADH desidrogenase (NADHD), obtida do *Bacillus licheniformis* (Reações 5 e 6). A quantificação do IMP é realizada através do monitoramento de peróxido de hidrogênio por um transdutor amperométrico.



Por sua vez, a quantificação do glutamato procede através da reação enzimática, usando-se a GLOD e monitoramento do peróxido de hidrogênio formado. O método apresentou uma faixa linear para o IMP e glutamato de 0,1 a 1,0 mmol L⁻¹ e 1,0 a 10,0 mmol L⁻¹, respectivamente. As amostras de temperos foram diluídas em água e filtradas anteriormente à análise. Inosina difosfato e inosina trifosfato foram identificados como interferentes em potencial.

Uma modificação de um biossensor amperométrico, para a determinação de glutamato, foi proposta por Karyakin *et al.* (2000), os quais imobilizaram a GLOD em um filme de Nafion sob a superfície de um eletrodo modificado com azul da Prússia. O glutamato foi determinado em sistema de análise por injeção em fluxo em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0. O potencial de detecção foi de -50 mV versus Ag/AgCl, KCl 0,1 mol L⁻¹. A faixa linear do método foi no intervalo de 1 10⁻⁷ a 1 10⁻⁴ mol L⁻¹ de glutamato.

Nos últimos anos, tem sido dada atenção especial para o desenvolvimento de membranas descartáveis, as quais permitem eliminar procedimentos de regeneração de superfície dos sensores após o uso. Nesse contexto, a tecnologia de *screen-printing*, mais conhecida como *silk-screen*, tem sido empregada com grande sucesso na fabricação de eletrodos nas últimas décadas. Ao mesmo tempo em que possibilita a produção em massa de eletrodos, a um custo extremamente baixo, é simples e pode ser praticada em qualquer laboratório. O eletrodo impresso é um filme depositado sobre um suporte inerte (Agnes & Nascimento, 1998). Fazendo uso desta tecnologia, Beyene *et al.* (2003) propuseram um biossensor amperométrico para glutamato usando eletrodo de carbono impresso modificado com MnO₂ e GLOD imobilizada em filme de Nafion®. O MnO₂ atua como mediador de elétrons, entre a enzima reduzida e o eletrodo. As medidas foram realizadas em sistema de análise por injeção em fluxo, usando como carregador tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,75 e um potencial de 440 mV versus Ag/AgCl. A curva analítica apresentou faixa linear de 10 a 160 mg L⁻¹, com um limite de detecção para glutamato de 1,7 mg L⁻¹. O biossensor foi aplicado na determinação de glutamato em temperos, onde as amostras foram dissolvidas em tampão fosfato e filtradas em membrana de 0,22 μm anteriormente à quantificação.

Nos últimos anos, materiais sol-gel têm despertado o interesse de pesquisadores pelas características propícias do material para imobilização de enzimas na construção de biossensores. Nesse contexto, Doong & Shih (2006) desenvolveram um biossensor óptico de sol-gel de titânia imobilizado com carboxi seminaftorhodamina-1-dextran (composto fluorescente) e a enzima GLDH para

aplicação na determinação de glutamato em água e material biológico (soro de albumina bovina). O comprimento de onda de excitação empregado foi de 488 nm e a emissão foi monitorada em 588 e 640 nm. Em material biológico, o sensor apresentou uma faixa linear para o glutamato de 0,02 a 10 mmol L⁻¹ e um limite de detecção de 6,7 µmol L⁻¹.

Tang *et al.* (2007) desenvolveram um biossensor amperométrico baseado na auto-organização de dendrímeros de poli(amidoamina) encapsuladas em nanopartículas de platina sobre nanotubos de carbono para imobilização de GLDH. O biossensor apresentou uma faixa linear para o glutamato de 0,2 a 250 µmol L⁻¹ com um tempo de resposta de 3 s. O limite de detecção foi de 10 nmol L⁻¹.

Borisova *et al.* (2018) descrevem um biossensor amperométrico para o monitoramento da liberação de glutamato em terminais nervosos do cérebro de ratos. Para tanto, os autores construíram um biossensor amperométrico imobilizando a enzima GLOD e desenvolveram um algoritmo para o monitoramento da cinética da liberação de glutamato tônico, excitatório e mediado por transporte de terminais nervosos isolados de cérebro de ratos. O limite de detecção do sensor foi de 2 µmol L⁻¹.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O glutamato monossódico tem despertado o interesse de pesquisadores há um século por suas propriedades de realçar o sabor dos alimentos. Discussões têm sido promovidas tanto para esclarecer sua inocuidade como sua eficácia. Todos esses estudos requerem métodos analíticos que sejam capazes de quantificar o glutamato em matrizes complexas como alimentos e material biológico em uma grande faixa de concentração. Enquanto o glutamato está presente em alimentos em concentrações de até 1 mg kg⁻¹, em material biológico, se encontra em nível de µg g⁻¹. Portanto, para análise de alimentos ou material biológico, os métodos analíticos requerem uma *performance* diferenciada.

Os primeiros métodos desenvolvidos para a determinação de glutamato em alimentos foram os titrimétricos, que hoje ainda são recomendados em métodos oficiais de análise. No entanto, os métodos cromatográficos suplantaram esses, principalmente por aliar rapidez de análise com elevada seletividade e detectabilidade. Entre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido a mais reportada, associada a detectores de absorção no ultravioleta e de fluorescência. Devido a que o glutamato não tem fluorescência nativa e não apresenta absorção significativa na região do UV, reações de derivatização

pré e pós-coluna têm sido amplamente empregadas. No entanto, com o desenvolvimento de colunas analíticas com partículas de diâmetro menores do que 2 μm , a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência tem substituído a HPLC. As análises com uma elevada eficiência são mais rápidas e consomem menos solventes e quando associada a espectrometria de massas sequencial permite a confirmação de identidade do analito. Ainda, essa técnica não requer reações de derivatização para permitir a quantificação do glutamato e pode ser aplicada tanto para amostras de alimentos como material biológico.

O uso de métodos eletroforéticos também tem sido relatado na literatura, mas em menor extensão e estes, de modo geral, fazem uso dos mesmos detectores da cromatografia líquida. Os avanços consistem nos microdispositivos do tipo Lab-on-a-chip.

O uso da cromatografia a gás já não é uma tendência atual, uma vez que o glutamato apresenta um elevado ponto de ebulição e não pode ser determinado por essa técnica sem prévia derivatização para formação de derivados voláteis.

Indubitavelmente, o maior destaque para a determinação de glutamato nos últimos anos tem sido o desenvolvimento e uso de biossensores. Esses dispositivos são ferramentas que tem suplementado as técnicas já existentes, devido as suas características únicas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis. Muitos biossensores têm sido desenvolvidos e aplicados na determinação de glutamato em alimentos e material biológico, e a dificuldade inicial da elevada sobrevoltagem necessária para quantificar o peróxido de hidrogênio ou NADH formado nas reações enzimáticas, envolvendo a glutamato oxidase ou glutamato desidrogenase, foi contornada pela incorporação de mediadores nos sensores. Ainda, novos materiais têm tido destaque na confecção de biossensores, entre esses os eletrodos impressos, que são descartáveis, e os nanotubos de carbono. Assim, a associação de biossensores com medidas amperométricas tem representado o maior avanço em relação a métodos analíticos que visam à determinação de glutamato em alimentos e matizes biológicas e, por ser uma técnica de relativo baixo custo e por todas as demais vantagens relacionadas, pode ser empregada em vários segmentos da indústria e centros de pesquisa.

4. REFERÊNCIAS 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 MnO₂ 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.* “Isotachopheresis and isotachopheresis-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.

