



MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO SHIKÍMICO EN VINO

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2020/21

Alumno: CRISTINA PULIDO ANTÓN
Tutor: DANIEL SANCHO RINCÓN

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

RESUMEN:

En los últimos años ha adquirido mucha importancia la elaboración de productos de calidad que complazcan las necesidades del consumidor y uno de los productos que más se consume es el vino. Por lo que para determinar la calidad del vino y evitar así fraudes de autenticidad se ha empleado el ácido shikímico. El ácido shikímico es un ácido carboxílico que se obtiene principalmente de plantas y que se caracteriza tanto por participar en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos que proporcionan aromas al vino, como por ayudar a distinguir variedades de uvas. En la siguiente revisión bibliográfica se presenta una descripción del ácido shikímico, así como las técnicas analíticas que existen para su determinación en el vino. Finalmente, se ha podido observar que los métodos cromatográficos como es la HPLC son los que más se emplean para cuantificar este ácido, pero a pesar de ello siguen existiendo muchas dudas y por tanto se debe seguir investigando.

PALABRAS CLAVES: ácido shikímico, vino, cromatografía, marcador varietal, calidad, bebidas.

ABSTRACT:

In recent years, the production of quality products that satisfy the needs of the consumer has become very important and one of the most consumed products is wine. Therefore, to determine the quality of the wine and thus avoid fraud of authenticity, shikimic acid has been used. Shikimic acid is a carboxylic acid that is obtained mainly from plants and that is characterized both by participating in the biosynthesis of aromatic amino acids that provide aromas to the wine and by helping to distinguish grape varieties. The following bibliographic review presents a description of shikimic acid, as well as the analytical techniques that exist for its determination in wine. Finally, it has been observed that chromatographic methods such as HPLC are the most widely used to quantify this acid, but despite this, many doubts remain and therefore further research should be done.

KEY WORDS: shikimic acid, wine, chromatography, varietal marker, quality, beverages.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
4.1 Técnicas analíticas para el ácido shikímico	6
4.2 Métodos de determinación del ácido shikímico en plantas	7
4.3 Métodos de determinación del ácido shikímico en alimentos y bebidas	11
4.4 Métodos de determinación del ácido shikímico en vino	13
4.5 Método oficial para la determinación del ácido shikímico en el vino	16
5. CONCLUSIONES	18
6. BIBLIOGRAFÍA	19
ANEXO 1	29

1. INTRODUCCIÓN

El sector vinícola tiene una gran importancia en España tanto por motivos medioambientales y económicos como por su relevancia en la sociedad y la cultura del país. Además, el vino es una de las bebidas que más se consume para acompañar las comidas por lo cual adquiere un gran interés la obtención de vinos de calidad que puedan satisfacer las necesidades de los consumidores y se introduzcan eficazmente en el mercado (AFI, 2020).

Antes de nada, es importante entender que se entiende por calidad, la cual sería el cumplimiento de las especificaciones y de las propiedades intrínsecas legales. Así pues, al tener más conocimiento de los componentes del vino y las diferentes transformaciones que se producen en él, ayudará a obtener una mayor calidad. Por lo tanto, los análisis sensoriales y químicos obtienen cada vez más importancia para la innovación de nuevos productos (Cedrón Fernández, 2004).

El vino se puede definir como “un alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva” (España, 2003). Y España se encuentra entre los tres países principales que producen esta bebida alcohólica siendo los otros dos Francia e Italia (Lorenzo et al., 2018). En referencia a la definición anterior se puede deducir que la calidad del vino va a depender de la variedad y la composición de uva que se utilice para elaborarlo. Y, además, los vinos se pueden discernir según las variaciones presentes en un viñedo, por la ubicación geográfica de estos, las técnicas de crianza y elaboración del vino; y por las diversas prácticas vitivinícolas utilizadas en el proceso (Markoski et al., 2016).

Al analizar la información recogida durante el año 2020 se ha observado que la producción mundial de vino fue similar a la del año 2019, pero si se compara con la gran producción que ocurrió en el 2018 se ha determinado que el volumen de producción fue menor a la media de los últimos cinco años. Esta disminución en la producción del vino se ha debido a diversos factores que influyeron, como son el cambio climático, las tensiones geopolíticas y la destacada pandemia del Covid-19 que produjo una elevada incertidumbre en el mercado mundial del vino (OIV, 2020).

El vino está formado por diversos compuestos y muchos de ellos están en concentraciones muy bajas, pero se destacan por ser imprescindibles para la calidad y la evolución del vino. Entre los principales componentes que constituyen el vino se

encuentran el etanol aproximadamente un 11,2%; otros oligoelementos, polisacáridos y glicerol un 1%; compuestos volátiles un 0,5 %, diversos tipos de ácidos con un 0,5 % y el componente mayoritario es el agua con alrededor de un 86,8% (Sumbly et al., 2010).

Los ácidos orgánicos se consideran un grupo importante porque permiten determinar a partir de ellos la autenticidad y calidad de diversas bebidas entre las que se encuentra el vino (Bakker & Clarke, 2011). Asimismo, influyen en el color, estabilidad y sabor del producto resultante (García Romero et al., 1993). Por lo cual, esta determinación está obteniendo cada vez más relevancia en la actualidad debido a la exigencia por parte del consumidor de productos de calidad. Y también es importante el análisis de los diferentes ácidos presentes en el vino para conocer sus propiedades o la función que desempeñan en él (Bakker & Clarke, 2011).

Uno de estos ácidos sería el denominado ácido shikímico (ácido 3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexeno-1-carboxílico) que se define como un compuesto orgánico natural y funciona como un precursor en la biosíntesis de muchos aminoácidos aromáticos como son el triptófano, la fenilalanina o la tirosina; en la biosíntesis de lignina y en la mayoría de los alcaloides que se encuentran en microorganismos y plantas. Asimismo, es un compuesto que se aísla principalmente de las plantas del género *Illicium* (Bochkov et al., 2012). Este ácido carboxílico está presente de forma minoritaria y natural en los vinos; y su contenido en los vinos va a depender de factores como el suelo, la variedad o el clima. Además, este ácido se obtiene a partir del ácido quínico mediante un proceso de deshidratación (Manzano, 2015) y funciona como un variable discriminante para poder realizar una clasificación varietal entre diversos vinos (Etièvant et al., 1989). Todo ello es debido a que se ha podido demostrar la existencia de diferencias significativas en el contenido de este ácido dentro de una misma variedad y por todo esto se le considera una variable muy interesante para poder clasificar zonas (Manzano, 2015).

El ácido shikímico no es soluble en disolventes no polares, pero presenta una alta solubilidad en el agua; por lo que su extracción a partir del anís estrellado chino denominado *Illicium verum* que es la mayor fuente comercial de este ácido, se debe realizar con agua caliente (Ohira et al., 2009). Y la cantidad que se puede encontrar del ácido en esta planta dependerá del tejido del que se obtenga o del tiempo de la cosecha. Además de este método de extracción hay otros que implican la utilización

de alcoholes, ácidos, una extracción asistida por microondas o la formación de complejos. Y a pesar de que se puede realizar la extracción mediante microorganismos, esto no es tan rentable como obtenerlo del anís (Ghosh et al., 2012).

La producción de este ácido se puede llevar a cabo por diferentes vías; en primer lugar, se puede obtener al extraerlo de plantas como se ha mencionado anteriormente como son el abeto, el pino o las semillas del anís estrellado chino por medio de agua a unos 45-75 °C. En segundo lugar, se puede producir mediante procesos de fermentación como son la vía del ácido shikímico que suele ocurrir en los microorganismos y también mediante bacterias modificadas metabólicamente a las cuales se le ha modificado el metabolismo central del carbono, y por tanto la vía del ácido shikímico. En tercer lugar, se puede obtener por síntesis química como se consiguió en 1960 al utilizar la reacción de Diels-Alder (que es una reacción de cicloadición entre un dienófilo y un dieno conjugado para dar como resultado un derivado sustituido del ciclohexeno). Y se puede conseguir a partir de benceno, azúcares como la D-manosa o a partir del ácido (-)-quinico y sus derivados a través de transformaciones químicas (Ghosh et al., 2012).

Y finalmente también es posible producir ácido shikímico con la ayuda de diversos microorganismos que transforman el ácido quinico o también denominado quinato en 3-deshidroquinico (DHQ) por acción de la enzima quinato deshidrogenasa. Y el DHQ es un intermediario dentro de la vía del ácido shikímico por lo cual mediante dos pasos es capaz de transformarse en ácido shikímico (Adachi et al., 2003).

La ruta o vía del ácido shikímico que es un conjunto de reacciones metabólicas, adquiere mucha importancia por tanto en la biosíntesis del ácido shikímico que se biosintetiza inicialmente a partir de la eritrosa 4-fosfato y del fosfoenolpiruvato (PEP) para obtener el precursor de este ácido que es denominado ácido 3-deshidroquinico (Talapatra et al., 2015; Martín Gordo, 2018). Esta vía está presente tanto en algas, bacterias, hongos, ciertos parásitos y plantas, pero no se observa en el caso de los mamíferos debido a que estos últimos obtienen los aminoácidos aromáticos sintetizados en esta ruta por medio de la dieta (Díaz-Quiroz et al., 2018).

La eritrosa 4-fosfato y el PEP se transforman en el ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosónico-7-fosfato (DAHP), luego da lugar al ácido 3-deshidroquinico (DHQ) que

puede transformarse en ácido quínico o viceversa; y después el DHQ se transforma en ácido 3-deshidrosikimico que finalmente se transformará en ácido shikímico. Si el ácido shikímico sigue transformándose dará lugar a los tres aminoácidos aromáticos mencionados al inicio (Jiang & Singh, 1998).

Algunas de las propiedades del ácido shikímico cuyo aspecto es cristalino blanco son el poseer un punto de fusión de 190°C y que el punto máximo para ser detectado por el rango de UV es de una longitud de onda de 235 nm (Bochkov et al., 2012). De igual importancia es saber que esta sustancia tiene una rotación específica de $[\alpha] = 157^\circ \times \text{cm}^3 / \text{g} \times \text{dm}^{-1}$. Por otra parte, se han descubierto muchos isómeros de este ácido, pero únicamente el isómero- α posee actividad biológica [Figura 1], y la estereoquímica de esta molécula se caracteriza por presentar tres grupos hidroxilo, un grupo carboxilo y un doble enlace (Bochkov et al., 2012).

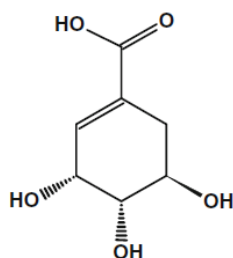


Figura 1: Estructura del isómero- α del ácido shikímico (Bochkov et al., 2012)

Gracias a diversos estudios tanto in vivo como in vitro, se ha podido descubrir que el ácido shikímico y sus derivados tienen diferentes efectos farmacológicos entre los que se encuentran que es anticoagulante, analgésico, antitrombótico, antiinflamatorio, anticancerígeno, antioxidante y algunos efectos antibacterianos (Chen et al., 2014).

Y además gracias a otros estudios, se ha llegado a la conclusión de que este ácido contribuye al aroma final del vino. De igual importancia es que la curiosidad por conocer la composición de los aromas característicos de esta bebida ha estado siempre presente entre los enólogos, pero debido al poco conocimiento de métodos analíticos capaces de conseguir determinar el ácido shikímico en el vino, sigue siendo un tema muy interesante que se sigue investigando (Cedrón Fernández, 2004).

En el presente trabajo efectuaremos una revisión bibliográfica en referencia al ácido shikímico y específicamente a los métodos que existen para determinar este ácido.

Comenzaremos explicando los métodos de determinación que existen para el ácido shikímico en general, después hablaremos de los métodos que se utilizan en las plantas para dicho ácido y luego pasaremos a los alimentos en referencia también a la determinación de este ácido. Seguiremos exponiendo como se podría determinar este ácido en diferentes bebidas, incluyendo el vino, y seguidamente se destacará el método oficial que se utiliza para determinar el ácido shikímico en los vinos y explicaremos en que consiste dicho método.

Como se expondrá posteriormente todavía sigue habiendo varias dudas sobre como determinar este ácido en los vinos, debido a que, aunque existe un método oficial todavía se están investigando otras posibilidades diferentes. Por lo cual se intentará responder a las dudas que se plantean sobre este tema a continuación.

2. OBJETIVO

De manera que el objetivo del presente trabajo de fin de máster será realizar una revisión bibliográfica que englobe en la medida de lo posible las diferentes posibilidades que se han planteado para ejecutar la determinación del ácido shikímico en el vino.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las bases de datos que se han utilizado para realizar la revisión bibliográfica se detallan a continuación:

- Google Académico: <https://scholar.google.es/> (29/06/2021)
- Wiley Online Library: <https://onlinelibrary.wiley.com/> (29/06/2021)
- Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/> (29/06/2021)
- National Center for Biotechnology Information (NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (29/06/2021)
- Springer: <https://www.springer.com/gp> (29/06/2021)
- Almena biblioteca de la UVA: <https://almena.uva.es/> (29/06/2021)

Y para realizar la búsqueda de la información se han estimado los siguientes criterios:

- Artículos compuestos en español e inglés fundamentalmente, y alguno en francés e italiano.
- Artículos que han sido publicado en los últimos 40 años.
- Y artículos relacionados con los métodos de determinación del ácido shikímico y artículos relacionados con el vino.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cinco sentidos se han empleado desde siempre para poder estimar la calidad de los diferentes alimentos, pero hoy en día es posible aplicar estos sentidos en técnicas analíticas capaces de evaluar la composición y las propiedades de los alimentos. Y además las bebidas alcohólicas como es el vino, presenta diversas ventajas para el desarrollo y aplicación de métodos instrumentales para la determinación de su perfil sensorial o su calidad debido a que poseen una compleja naturaleza (Smyth & Cozzolino, 2013).

4.1 Técnicas analíticas para el ácido shikímico

Se han descrito varios métodos de determinación para el ácido shikímico, entre los que se encuentran la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la resonancia magnética nuclear (RMN), la cromatografía de gases con espectroscopía de masas (GC-MS), la electroforesis de zona capilar/electroforesis capilar (CZE / CE) unido con HPLC, la espectroscopía de masas (MS) y la cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC). Pero a pesar de existir varios métodos, aquellos basados en HPLC o la espectrofotometría son los que más se han utilizado. Además, se han observado en la literatura muchas variedades de este tipo de metodologías (Zelaya et al., 2011).

En el caso de los métodos espectrofotométricos, estos consisten en la derivatización del ácido shikímico con peryodato, que forma un cromóforo del PDC (ácido trans-2-penteno-1,5-dialdehído-3-carboxílico) a una longitud de onda máxima de 380-382 nm. Y los métodos de HPLC comprenden una separación precolumna, una separación en fase sólida de intercambio aniónico altamente básica y una refracción diferencial; y una cromatografía de fase inversa en una fase móvil de fosfato o un intercambio

aniónico débil en disolventes orgánicos (Zelaya et al., 2011). Además, conviene subrayar que después de realizarse varios estudios se ha concluido que el método HPLC es el más cuantitativo de los dos; ya que, aunque los métodos espectrofotométricos son más baratos y sencillos de ejecutar, presentan un límite de detección mucho menor a HPLC y como consecuencia una menor cuantificación del ácido shikímico (Pline et al., 2002).

Pero también hay que destacar la existencia de otras técnicas para la determinación de ácidos orgánicos, entre los que se encuentra el ácido shikímico. Estas técnicas además de las anteriores pueden ser métodos electroquímicos o quimioluminiscentes. Pero, además, se piensa que los métodos de cromatografía líquida (LC) y de cromatografía de gases (GC) junto a la detección de masas pueden ser más selectivos y sensibles para ácidos orgánicos (Flores et al., 2012).

4.2 Métodos de determinación del ácido shikímico en plantas

Con frecuencia en la industria farmacéutica como en la alimentaria se emplean diversos metabolitos vegetales como sería el caso del ácido shikímico (Debruille et al., 2019). Y una aplicación que tiene este ácido es que es un gran precursor de Oseltamivir, que es un antiviral que se usa contra el virus de la gripe (Candeias et al., 2018). Además, para poder seleccionar estos compuestos de fuentes vegetales se debe realizar en primer lugar un aislamiento, que normalmente se lleva a cabo por técnicas tradicionales como son la cromatografía, la extracción con disolventes o por cristalización. Y luego se procede a la identificación por medio de técnicas instrumentales avanzadas (Debruille et al., 2019).

El ácido shikímico se encuentra mayormente en plantas, y específicamente se obtiene del anís estrellado chino. Este es un fruto que crece mayormente en cuatro provincias montañosas situadas en China y también en Vietnam; y se recolecta durante los meses de marzo y mayo. Otras fuentes de las que se puede obtener este ácido son la fruta de liquidámbar (*Liquidambar formosana* y *L. styraciflua*) y también del árbol de ginkgo (Avula et al., 2009). Por otra parte, este ácido puede jugar un papel en las plantas al poder estar implicado con la movilización de fósforo o en la desintoxicación de metales (Oburger et al., 2009).

Además, en el caso del fruto de plantas de la familia *Illiciaceae* se ha realizado en un estudio la determinación del ácido shikímico mediante cromatografía líquida con

detección de matriz de diodos, pero la información referida a este método ha sido poca (Zhang et al., 2013). Este mismo método (HPLC-PDA) se utilizó también en la planta del jacinto de agua para determinar este ácido, y lo que se pudo deducir es que en las raíces de esta planta hay una menor concentración de este ácido en comparación con sus partes aéreas (Cardoso et al., 2014). Y también se empleó el método anterior, para determinar la cantidad de este ácido que poseían diferentes plantas tratadas con glifosato, observando un mayor aumento del ácido al pasar 7 días del tratamiento con glifosato; además se concluyó que era un método rápido, sensible y confiable (Matallo et al., 2009).

Otros métodos utilizados para la determinar la ausencia o presencia de este ácido en plantas de esta familia, han sido un método de cromatografía líquida con detección UV (LC-UV) y un método de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MSD-TOF). De tal forma que se empleó para la separación por el método LC-MSD-TOF una columna C12 que usaba acetonitrilo y agua, que poseían los dos como fase móvil ácido acético de 0,1 %. Y para realizar la separación LC-UV se utilizó una cromatografía de fase inversa con una columna C18 que usaba como fase móvil metanol y dihidrogenofosfato de potasio. Estos dos métodos proporcionaban tanto un análisis cualitativo como cuantitativo, pero también se observó que el método TOF era hasta diez veces más sensible que el método LC-UV (Avula et al., 2009).

Para la determinación del ácido shikímico en el anís estrellado chino también se ha empleado un método de análisis de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC); y para el análisis se aplicó un detector UV-VIS de 210 nm de longitud de onda. Y gracias al este tipo de ensayo se pudo descubrir que tanto el ácido shikímico sintético como el extracto crudo del anís estrellado chino poseían una gran actividad inhibidora sobre el posible crecimiento del hipocótilo o la radícula de la lechuga. Gracias a este descubrimiento se ha deducido que este ácido podría utilizarse para controlar las malezas que se desarrollan entre las plantas de cultivo; y que además debido a la actividad biológica del ácido, este podría tener mucho potencial para la agricultura ecológica y para la alelopatía (Aniya et al., 2020).

Para la extracción del ácido a partir del anís estrellado chino, se ha empleado en otro ensayo la cromatografía ultrarrápida en columna preempaquetada con polímeros de impresión molecular (MIP). Por otro lado, al comparar este tipo de cromatografía con la

HPLC, se pudo deducir que esta primera es más factible, rápida, es más sencilla de automatizar y, además, es más económica (Xue et al., 2013).

En otro estudio de Usuki et al. (2011) se ha realizado la extracción de ácido shikímico de hojas del *Ginkgo biloba* con la ayuda de cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio líquido iónico, ya que la celulosa se encuentra disuelta a altas temperaturas.

Luego se disolvió el ácido extraído en metanol para formar soluciones madre que más tarde se almacenaron a 4°C y se volvieron a diluir con metanol antes de realizar el análisis por HPLC. Para la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se utilizó como fase móvil una solución acuosa de ácido sulfúrico al 0,01% y para la separación se empleó la elución isocrática. Finalmente se realizó la detección del ácido por UV de 213 nm de longitud de onda y se obtuvo gracias a estas condiciones cromatográficas un buen resultado en la separación inicial del ácido shikímico (Chen et al., 2014). Esta metodología se caracteriza por ser exacta, necesitar poca cantidad de muestra, eficaz, automatizable, elimina la generación de residuos resultantes, poseer un tiempo de respuesta corto y muy poca interacción con el analista (Anderson et al., 2001).

También ha sido posible la cuantificación simultánea de varios metabolitos vegetales incluido el ácido shikímico, mediante la tecnología HPLC-HRMS (HPLC acoplada a detección por espectrometría de masas de alta resolución). Todo ello para entender mejor la función que tiene el estrés de las plantas (Scalabrin et al., 2016).

Según la investigación de Al-Malki (2019) , se pudo determinar este ácido a partir de las hojas de *Artemisia absinthium* (ajenjo), ya que sería un compuesto fenólico natural presente en esta planta como también se observa en muchas frutas. Y el método para hacerlo sería aplicando una cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS). Todo esto para poder distinguir este compuesto por el espectro de masas de ionización mediante impacto de electrones y con los índices de retención transformados. Después del análisis se pudo deducir que este ácido puede disminuir el estrés oxidativo y que debido a que se encuentra en muchas plantas y cereales, es venenoso para los patógenos pero útil para los humanos.

Al comienzo del año 2000, se descubrió un método de extracción ecológico que se denominaba extracción con agua caliente a presión (PHWE) que consistía en una máquina de café expresso; y con el que se conseguía aislar el ácido shikímico a partir de varias plantas. Este método se caracterizaba por extraer una menor cantidad de

clorofilas, y como consecuencia se obtenían extractos mucho más limpios. Luego se realizó a partir de la muestra aislada un análisis de electroforesis de zona capilar (CZE), que se basa en emplear el campo eléctrico para realizar la separación de los metabolitos de las diferentes plantas debido a la diferencia en la movilidad electroforética. Una de los beneficios de esta técnica analítica es que no requiere una complicada preparación de la muestra y por tanto no se tiene que utilizar una gran cantidad de disolventes orgánicos. Este ensayo consiguió obtener el ácido shikímico de manera más simple, ecológica, eficaz y rápida (Debrulle et al., 2019).

Otra manera para cuantificar la cantidad de ácido shikímico presente en el polvo de anís estrellado sería la espectroscopía de RMN ¹³C (resonancia magnética nuclear de carbono 13) de estado sólido (Xu et al., 2017). Esta metodología junto a ³¹P NMR fueron usadas para poder determinar el efecto que tiene el glifosato sobre el metabolismo de las diversas células de plantas de espinaca o de tomate. Debido a que el glifosato fue capaz de producir el almacenamiento de shikimato 3-fosfato y ácido shikímico. Lo que demuestra lo importante que es esta técnica para comprender mejor los cambios bioquímicos que se producen al bloquear la vía del ácido shikímico (Gout et al., 1992).

El glifosato, conocido por ser un gran herbicida, es muy utilizado para el control de las malezas presentes entre los cultivos (Sammons & Gaines, 2014). Por lo que durante un estudio se intentó producir cultivos transgénicos que fueran tolerantes al glifosato para que no pudieran ser dañados al utilizar este herbicida. Se determinó la existencia de niveles reducidos de ácido shikímico en muestras de maíz transgénico mediante dos técnicas no destructivas de gran rendimiento, denominadas técnicas de imágenes de fluorescencia de clorofila y otra de imágenes hiperespectrales del infrarrojo visible y cercano. Además, los niveles bajos de este ácido demostraban que el maíz era tolerante al herbicida ya que éste produciría el bloqueo de su ruta y por tanto su acumulación. Se empleó una mezcla de métodos quimiométricos y espectroscópicos para determinar el ácido por la técnica de imágenes hiperespectrales. Y los resultados indicaron la eficacia de las dos técnicas propuestas (Feng et al., 2018).

Varios autores como Petersen et al. (2006) desarrollaron con éxito el método de cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC) para determinar a la vez tanto el shikimato 3-fosfato como el ácido shikímico en determinados extractos crudos de plantas. Este método consiste en la detección UV que es capaz de medir la

absorbancia del doble enlace que posee este ácido. Por lo que estos analitos primero son separados gracias a un tampón de colato-aurina con un pH de 7,3 mediante MECC y luego son detectados de manera directa por UV a una longitud de onda de 206 nm. Al observar el electroferograma resultante con el método CZE, se puede indicar que este nuevo método genera un mayor rango de linealidad, así como picos más claros. Todo lo anterior ayudó a obtener una mayor cuantificación y separación, y además, se consiguió hasta un 99,8 % del ácido shikímico presente en las muestras vegetales.

4.3 Métodos de determinación del ácido shikímico en alimentos y bebidas

En uno de los primeros experimentos se pudieron determinar varios ácidos orgánicos como el ácido málico, tartárico, acético, láctico y el ácido shikímico entre otros, mediante una RP-HPLC con dos columnas C18 a partir de vinos, mostos y vinagres. Todos los ácidos anteriores fueron determinados a la vez, gracias a la alta eficacia del método propuesto y se pudo evitar que surgieran problemas con los azúcares presentes en las muestras o los polifenoles y antocianinas que son eliminados durante la preparación de la muestra. Por lo cual permite una precisión mucho mayor en los resultados obtenidos (García Romero et al., 1993). Este mismo método se ha empleado en la fruta, específicamente en el albaricoque marroquí. Todo ello por lo importantes que son estos ácidos para la tecnología de bebidas y alimentos, así como para evaluar su calidad; y asimismo sus cantidades pueden cambiar según las prácticas de horticultura y del tipo de cultivo. Y se ha podido observar la presencia de ácido shikímico en la pulpa del albaricoque con unos 23,78 mg/kg; además, para su identificación se han comparado los tiempos de espectros de absorción y retención del ácido con los de unos patrones. Por lo que se puede estimar como un método rápido y preciso para este tipo de ácidos (Hasib et al., 2002).

Hay que destacar, que la determinación del ácido shikímico en diversos alimentos se ha llevado a cabo por medio de una HPLC. Por ejemplo, en productos derivados de abejas como es la miel, se tuvo como objetivo obtener más conocimiento de la concentración y composición que tiene la miel de este tipo de ácido orgánico. En un primer paso, se produjeron muchas interferencias durante este proceso, por lo cual se utilizó una columna C18 corta que se dispuso en serie con una columna ionex para conseguir una separación satisfactoria de los ácidos shikímico y quínico en unos 10

minutos. Demostrando ser esta técnica lineal, exacta, reproducible y precisa; tanto para una concentración menor como mayor de estos ácidos. Además, se evitó realizar un pretratamiento difícil del producto y consiguió ser validado como método (Hroboňová et al., 2007).

Mientras que en el caso de los zumos de frutas, los ácidos orgánicos representan un papel fundamental para poder determinar su autenticidad (Correa Navarro & Rivera Giraldo, 2018). En un estudio se validó un reciente analizador de RMN (espectroscopía de resonancia magnética nuclear) denominado "JuiceScreener" para determinar diversos analitos en este tipo de zumos, donde se observó también la cantidad de ácido shikímico que se podía apreciar en el zumo de manzana, por ejemplo. Por lo que se concluyó que era un método reproducible, automatizable y preciso por poder analizar un total de 29 sustancias diferentes (Monakhova et al., 2014). Y, además, otro método utilizado en los zumos de frutas ha sido la cromatografía de iones suprimidos (IC) y ha sido validado en referencia a la recuperación, precisión interdiaria e intradiaria, linealidad y límites de detección. Pero debido a que cada tipo de zumo de frutas posee perfiles de ácidos orgánicos específicos, que pueden incluir ácidos orgánicos monovalentes como el quínico o el shikímico además de otros ácidos, se ha desarrollado en este estudio un intercambiador de aniones hiperramificado químicamente derivatizado que posee una mayor selectividad y se puede emplear en muestras más complejas como son los zumos (Uzhel et al., 2021). Entre otros métodos están la HPLC-RMN y la HPLC-MS empleados para analizar los ácidos presentes en diferentes jugos de arándanos (Jensen et al., 2002).

En otro estudio se pudo determinar el ácido shikímico con un método analítico denominado LC-MS / MS (cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem). Este método evita que se tenga que realizar la derivatización de las muestras a analizar, que en este caso fueron cinco tipos de verduras y cinco tipos de frutas. Además, esta técnica demostró que necesitaba de una menor preparación de las muestras, por lo cual se pueden hacer varias muestras a la vez; era más simple y rápida, ya que solo tardaba alrededor de 15 minutos en realizar el análisis completo. Asimismo, al analizar el estudio de validación se observó que esta técnica tenía una sensibilidad, repetibilidad, linealidad y recuperación adecuadas (Flores et al., 2012). Esta técnica también ha sido aplicada en aguas naturales debido a la importancia que

tienen los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como es el ácido shikímico. Todo ello por sus propiedades quelantes de metales, por lo cual influyen en la biodisponibilidad de los metales y también están relacionados con la formación del suelo. Otros métodos utilizados para estos ácidos en aguas han sido electroforesis capilar (CE) y para la detección espectrometría de masas de ionización química a presión atmosférica, o de ionización por electropulverización (Bylund et al., 2007).

4.4 Métodos de determinación del ácido shikímico en vino

El ácido shikímico es crucial para la formación de compuestos fenólicos responsables del aroma presente en diversas bebidas. Y la ausencia o presencia de estos compuestos es muy importante para determinar la calidad de diferentes bebidas entre las que se incluye el vino (Araya Jara, 2019). Por lo cual, para que exista confianza en el vino que se entrega a los consumidores, es importante conservar su posición en el mercado global y por ello se destaca la calidad y la autenticidad varietal del producto (Tessini et al., 2009). Por lo que este ácido se considera un importante marcador varietal, es decir, es muy utilizado para clasificar los vinos según la variedad de uva que se ha empleado para producirlos (Spring et al., 2014; Fauhl-Hassek, 2009). A pesar de que su concentración suele disminuir con la maduración de la uva y por consecuencia, la cantidad de ácido se ve afectada por el período de cosecha. Aunque también se produce un aumento de su contenido durante el final de la fermentación (Tamborra et al., 2014). Por lo cual, podemos encontrar una baja concentración de este ácido (10-150 mg/L) en el mosto de uva y pasa al vino en el transcurso de la maceración y la fermentación (Ivanova-Petropulos et al., 2018). También se ha podido demostrar que el efecto invernadero y por tanto el aumento de CO₂ puede disminuir este ácido (Wohlfahrt et al., 2021). Además, también se ha descubierto que los vinos más viejos poseen una mayor cantidad de ácido shikímico (Gougeon et al., 2019), y que en los vinos espumosos se observa una reducción de este ácido cuanto mayor es el tiempo de almacenamiento del vino (Focea et al., 2017).

Un método que se ha utilizado mucho para clasificar las variedades de vino, según la concentración de ácido shikímico ha sido la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detector UV. Esta metodología consiste en una columna de separación de fase inversa en serie junto con una columna de exclusión de iones; se inyecta la muestra de vino directamente en el sistema HPLC después de realizar únicamente como tratamiento previo una filtración de la muestra. Lo que se ha podido concluir es

que de menor a mayor concentración de ácido shikímico, el orden según el tipo de uva y por consiguiente de vino es: Pinot Noir, Carmenère, Merlot, Shiraz y finalmente el de mayor concentración encontrado en este estudio ha sido el vino Cabernet Sauvignon (Tessini et al., 2009). Pero hay que acentuar, que la cantidad de este ácido ayuda a diferenciar entre Merlot o Carmenère y Cabernet Sauvignon; pero no puede diferenciar entre las dos primeras variedades (Von Baer et al., 2007) . Además, este ácido se ha encontrado ante todo en la piel de la uva y como consecuencia de que la piel de las uvas de tipo Pinot Noir es más fina, este tipo de vino posee una concentración inferior de ácido shikímico si se compara con otros tipos de uvas (Tessini et al., 2009). Pero el método HPLC con detección UV (Mato et al., 2005) se caracteriza por tener mayor sensibilidad, ser más rápido y preciso para determinar la baja concentración de ácido shikímico que podemos encontrar en los vinos (Mattivi & Moser, 2003). A pesar del buen rendimiento de la HPLC de fase reversa con detección UV, sufre de baja selectividad y sensibilidad; y a veces necesita de derivatización, lo que alarga el tiempo del análisis (De Villiers et al., 2003).

Asimismo, como he indicado anteriormente, los vinos tipo Pinot poseen menor cantidad de este ácido, siendo inferior a 10 mg/L. Y al compararlos con otras variedades como Trebbiano o Chardonnay se observa que éstas presentan cantidades mayores, siendo aproximadamente 100 y 60 mg /L respectivamente (Mattivi & Moser, 2003). En otros estudios el valor determinado para la variedad de uva Chardonnay ha sido de 73 mg/L y en el caso de la Semillon 3 mg/L, pero hay que tener en cuenta que se ha concluido que la cantidad de ácido shikímico puede variar dependiendo del crecimiento de la vid o la localización geográfica de la cosecha (Chabreyrie et al., 2008). Igualmente, en otro estudio se ha determinado la concentración presente de este ácido en diferentes vinos blancos monovarietales procedentes de Italia (ANEXO 1), observándose cantidades parecidas en algunos casos, y se expone que la maceración carbónica es responsable del aumento del ácido shikímico (Roman et al., 2018). Además, las posibles variables que ayudan a separar este ácido mediante HPLC-UV son tanto los 40°C de temperatura, como el disolvente utilizado para extraerlo (metanol al 5% a un pH2) (Dopico-García et al., 2007). Se recomienda usar una columna RP-18 que este en serie con una columna S-DVB (de exclusión iónica de sulfonil-estireno-divinilbenceno), ya que la primera columna elimina las posibles interferencias del vino y la segunda ayuda a separar el ácido shikímico del conjunto de ácidos orgánicos presentes en el vino (Mardones et al., 2005).

Otras técnicas utilizadas para este tipo de ácido son la cromatografía de intercambio iónico (IC) y la cromatografía de gases (GC). Pero tienen limitaciones como son el no poder determinar muchos tipos de ácidos orgánicos a la vez, en el caso de la IC y el solo analizar ácidos orgánicos volátiles para la GC (Ivanova-Petropulos et al., 2018). Además con la IC se obtienen buenas separaciones, pero las condiciones difíciles de funcionamiento, las columnas caras, así como la necesidad de limpiar las muestras complejas, provocan que este método se use menos (Peres et al., 2009).

Por otra parte, se destaca la electroforesis capilar (CE) como una técnica recientemente usada en muestras complejas como los vinos, ya que proporciona una correcta reproducibilidad, alta eficiencia de separación, consume poca muestra y electrolitos, y, además, es rápida. Aunque no se necesita realizar una preparación previa de la muestra, aunque sí que es necesario hacer filtraciones o diluciones (Saavedra & Barbas, 2003). Además, la electroforesis capilar con detección indirecta de UV es un método sencillo, versátil, barato y rápido; y proporciona una buena repetibilidad y selectividad (Peres et al., 2009). Es capaz de identificar y separar compuestos altamente polares que no permiten ser separados por HPLC, y encima realiza un análisis simultáneo de diversos analitos de naturaleza distinta (Saavedra & Barbas, 2003). Otra manera de utilizar esta técnica es uniéndola con una espectrometría de masas de ionización-cuadrupolo-tiempo de vuelo-electropulverización (CZE-ESI/QTOF-MS), que genera un análisis más selectivo y sensible, además de sencillo y rápido en referencia al ácido shikímico en vinos; pero siempre después de una dilución del mismo. Este nuevo método reduce el tiempo de análisis si se compara con los métodos de CE o HPLC anteriormente descritos (Ivanova-Petropulos et al., 2018). También se ha observado que aunque se puede emplear CE de detección indirecta o la de detección directa para determinar este ácido, solo se obtienen resultados estadísticamente parecidos a la HPLC con la CE directa (Mardones et al., 2005).

En relación a la ICP-MS (espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente) y la RMN (espectroscopia de resonancia magnética nuclear), también son técnicas utilizadas para analizar el ácido shikímico, y por tanto se utilizan para determinar el fraude y caracterizar los vinos (Mascellani et al., 2021; Duley et al., 2021). En el caso de la ICP-MS es útil para precisar la regionalidad del vino y la RMN para analizar sus componentes durante la viticultura y vinificación (Duley et al., 2021).

Cada espectro obtenido de una RMN puede interpretarse como una “huella digital” particular de un vino, que posee información sobre el origen, variedad, estado fisiológico, añada o sobre los tratamientos tecnológicos empleados para la elaboración de dicho vino (Godelmann et al., 2013). Por otra parte, al utilizar la RMN junto a un análisis multivariante se puede distinguir el área específica a la cual pertenece la variedad de uva empleada (Gougeon et al., 2019). De igual manera, al utilizar la RMN junto a la quimiometría se consigue ajustar de manera limitada el pH que se forma como consecuencia de añadir una solución tampón a la muestra de vino que se quiere analizar. Proporcionando ventajas como son una preparación más rentable de la muestra, generando que éste método sea más sencillo y rápido, y por tanto, se convierte en un método adecuado para cuando se quiere analizar muchas muestras (Magdas et al., 2019).

Otro método analítico empleado es la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), que se ha utilizado para analizar los componentes que conforman las lías del vino, encontrando restos de ácidos como es el ácido shikímico (Delgado de la Torre et al., 2015). Y también se han utilizado técnicas de ionización ambiental junto a espectrometría de masas cuadrupolo-Orbitrap (AI-Q-Orbitrap), que se caracterizan por ser precisas y rápidas para determinar compuestos ácidos (Guo et al., 2021).

Finalmente, otros ejemplos de métodos aplicables para analizar el ácido shikímico en los vinos pueden ser la HPLC-HRMS (cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas de alta resolución) (Tufariello et al., 2021) y la cromatografía de gases con columnas capilares de vidrio, que consigue adquirir mucha información tanto cualitativa como cuantitativa sobre los diversos componentes no volátiles del vino como son los ácidos, y todo ello, a partir de pequeñas cantidades de muestra (De Smedt et al., 1981). Pero a pesar de estos posibles métodos para determinar el ácido shikímico, podemos observar que también se utilizan métodos oficiales en otros casos (Nicolini et al., 2018; Carinci, 2014).

4.5 Método oficial para la determinación del ácido shikímico en el vino

La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) posee un compendio que hace referencia a los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos; así como

de los materiales y equipos necesarios para realizarlos (OIV, 2021a; OIV, 2021b). Y la Unión Europea reconoce como válidos todos estos métodos según lo expone el Reglamento (CE) nº 479/2008 que establece que los métodos para determinar la composición de los productos recogidos en dicho Reglamento y comprobar si estos productos han sufrido procesos que desobedecen las prácticas enológicas son aquellos recomendados por la OIV (Parlamento Europeo, 2008); igualmente se redactó una descripción y lista de los métodos que se exponen en el compendio para más transparencia mediante el Reglamento (CE) nº 606/2009 (Parlamento Europeo, 2009). Para determinar el ácido shikímico existen dos métodos oficiales, primero está el método OIV-MA-AS313-17 (Resolución Oeno 33/2004) que es de categoría II (Método de Referencia) y el segundo es el método OIV-MA-AS316-01 (Resolución Oeno 618/2020) que ha sido implantado recientemente y es de categoría IV (Método Auxiliar) (OIV, 2021a; OIV, 2021b).

El método tipo II consiste en una cromatografía líquida de alto rendimiento con detección UV (HPLC-UV), que es aplicable a vinos blancos, rosados y tintos (incluidos los vinos especiales y espumosos) y que determina un rango de 1-300 mg/L de concentración de ácido shikímico. Con este método no es necesario una preparación de la muestra cuando se trata de un vino limpio, pero en el caso de ser turbio, se requiere una filtración. Por otra parte, se emplea un sistema de columnas que está formado en primer lugar por una columna de fase inversa de tipo C18 y luego se usa una columna intercambiadora de iones que se calienta a unos 65°C. Por último, el ácido shikímico es detectado por UV a unos 210 nm de absorción (OIV, 2021a). Mientras que el método de tipo IV consiste en una espectroscopía de resonancia magnética nuclear cuantitativa (¹H-NMR) capaz de determinar el ácido shikímico, ácido málico, la glucosa, ácido acético, ácido sórbico y el ácido fumárico en muestras de vino. En este caso, la muestra de vino debe ser diluida en una solución amortiguadora al 10% en D₂O y si la muestra es turbia debe ser filtrada. Asimismo, el límite de cuantificación (LQ) para el ácido shikímico con este método es de 20 mg/L, el límite de detección (LD) es de 5 mg/L y en cuanto al intervalo de trabajo es de 20-500 mg/L (OIV, 2021b).

5. CONCLUSIONES

Después de todo lo mencionado en este trabajo, podemos concluir que el ácido shikímico está adquiriendo una mayor importancia en los últimos años, tanto en alimentos como en bebidas, entre las que se incluye el vino. Esta importancia es debido a que se considera un gran marcador varietal que ayuda a distinguir si se está produciendo un fraude en referencia a la variedad de uva usada, y por tanto conservar la calidad del vino que se está proporcionando al consumidor. Además, también participa en la formación de los aminoácidos aromáticos que proporcionan el aroma característico del vino.

Para cuantificar este ácido, se han utilizado diversos métodos analíticos, pero se destacan principalmente los métodos cromatográficos, ya que han resultado ser muy eficaces en su determinación. La cromatografía líquida de alto rendimiento con detección ultravioleta se ha podido utilizar tanto para plantas, alimentos, bebidas y vinos; y este método se caracteriza por ser rápido, tener más sensibilidad y ser más preciso para determinar el ácido shikímico que se suele encontrar en bajas concentraciones. Otro bastante utilizado es la espectroscopía, sin embargo, hay que destacar que a pesar de ser sencillos de utilizar y baratos, poseen un límite de detección mucho más bajo y por tanto son menos adecuados.

En definitiva, la mejor técnica por el momento para cuantificar el ácido shikímico es la HPLC-UV. Con esto quiero decir que es un tema que actualmente se sigue investigando, y que se requiere de una mayor cantidad de información para poder discernir totalmente si con otras técnicas se podría conseguir mejores resultados. También creo que se debería indagar más en las propiedades que puede otorgar este ácido a los vinos, ya que hay poca o casi ninguna información al respecto.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, O., Tanasupawat, S., Yoshihara, N., Toyama, H., & Matsushita, K. (2003). 3-Dehydroquinone production by oxidative fermentation and further conversion of 3-dehydroquinone to the intermediates in the shikimate pathway. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(10), 2124–2131. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2124>
- AFI. (2020). *Importancia económica y social del sector vitivinícola en España*. 34–91. www.afi.es
- Al-Malki, A. L. (2019). Shikimic acid from *Artemisia absinthium* inhibits protein glycation in diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1212–1216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.072>
- Anderson, K. A., Cobb, W. T., & Loper, B. R. (2001). Analytical method for determination of shikimic acid: Shikimic acid proportional to glyphosate application rates. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(17–18), 2831–2840. <https://doi.org/10.1081/CSS-120000965>
- Aniya, Nomura, Y., Fuerdeng, Appiah, K. S., & Fujii, Y. (2020). Evaluation of allelopathic activity of Chinese medicinal plants and identification of shikimic acid as an allelochemical from *illicium verum hook. f.* *Plants*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/plants9060684>
- Araya Jara, E. F. (2019). *PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Evaluación del efecto del uso de ultrasonido, maceración pre fermentativa en frío y vinificación tradicional sobre la composición fenólica y sensorial de vino elaborado a partir de Vitis vinífera cv. Cabernet Sauvignon proveni.*
- Avula, B., Wang, Y. H., Smillie, T. J., & Khan, I. A. (2009). Determination of Shikimic acid in fruits of *illicium* species and various other plant samples by LC-UV and LC-ESI-MS. *Chromatographia*, 69(3–4), 307–314. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0884-z>
- Bakker, J., & Clarke, R. J. (2011). Wine Flavour Chemistry, Second Edition. In *Wine Flavour Chemistry, Second Edition*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444346022>

Bochkov, D. V., Sysolyatin, S. V., Kalashnikov, A. I., & Surmacheva, I. A. (2012). Shikimic acid: Review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. *Journal of Chemical Biology*, 5(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s12154-011-0064-8>

Bylund, D., Norström, S. H., Essén, S. A., & Lundström, U. S. (2007). Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1176(1–2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.064>

Candeias, N. R., Assoah, B., & Simeonov, S. P. (2018). Production and Synthetic Modifications of Shikimic Acid. *Chemical Reviews*, 118(20), 10458–10550. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00350>

Cardoso, S. F., Lopes, L. M. X., & Nascimento, I. R. (2014). Eichhornia crassipes: An advantageous source of shikimic acid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(4), 439–442. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.08.003>

Carinci, V. (2014). MAPPATURA TRIENNALE DELL'ACIDO SHIKIMICO NEI VINI BIANCHI PRODOTTI IN ABRUZZO. *Rivista Internet Di Viticoltura Ed Enologia*, 5(2), 1–4.

Cedron Fernández, M. T. (2004). Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. *Universidad de La Rioja*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=103>

Chabreyrie, D., Chauvet, S., Guyon, F., Salagoity, M. H., Antinelli, J. F., & Medina, B. (2008). Characterization and quantification of grape variety by means of shikimic acid concentration and protein fingerprint in still white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6785–6790. <https://doi.org/10.1021/jf800117k>

Chen, F., Hou, K., Li, S., Zu, Y., & Yang, L. (2014). Extraction and chromatographic determination of shikimic acid in Chinese conifer needles with 1-benzyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid aqueous solutions. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/256473>

Correa Navarro, Y. M., & Rivera Giraldo, J. D. (2018). Evaluación de ácidos orgánicos en refrescos de fruta comerciales por cromatografía líquida de alta eficiencia. *Revista*

de *La Facultad de Ciencias Básicas*, ISSN-e 1900-4699, Vol. 14, Num. 1, 2018, Pág. 6, 14(1), 6.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6600815&info=resumen&idioma=ENG>

De Smedt, P., Liddle, P. A. P., Cresto, B., & Bossard, A. (1981). The Analysis of Non-Volatile Constituents of Wine By Glass Capillary Gas Chromatography. *Journal of the Institute of Brewing*, 87(6), 349–351. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1981.tb04048.x>

De Villiers, A., Lynen, F., Crouch, A., & Sandra, P. (2003). A robust capillary electrophoresis method for the determination of organic acids in wines. *European Food Research and Technology*, 217(6), 535–540. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0819-8>

Debrulle, K., Smith, J. A., & Quirino, J. P. (2019). Pressurized Hot Water extraction and capillary electrophoresis for green and fast analysis of useful metabolites in plants. *Molecules*, 24(13). <https://doi.org/10.3390/molecules24132349>

Delgado de la Torre, M. P., Priego-Capote, F., & Luque De Castro, M. D. (2015). Tentative identification of polar and mid-polar compounds in extracts from wine lees by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high-resolution mode. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(6), 826–837. <https://doi.org/10.1002/jms.3592>

Díaz-Quiroz, D. C., Cardona-Félix, C. S., Viveros-Ceballos, J. L., Reyes-González, M. A., Bolívar, F., Ordoñez, M., & Escalante, A. (2018). Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of shikimic acid derivatives as inhibitors of the shikimate dehydrogenase enzyme of *Escherichia coli*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 397–404. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1422125>

Dopico-García, M. S., Valentão, P., Guerra, L., Andrade, P. B., & Seabra, R. M. (2007). Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white “Vinho Verde” grapes. *Analytica Chimica Acta*, 583(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.056>

Duley, G., Dujourdy, L., Klein, S., Werwein, A., Spartz, C., Gougeon, R. D., & Taylor, D. K. (2021). Regionality in Australian Pinot noir wines: A study on the use of NMR and ICP-MS on commercial wines. *Food Chemistry*, 340(August 2020), 127906. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127906>

España. (2003). Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino. *Boletín Oficial del Estado*, 11 de julio de 2003, (165), 27165-27179.

Etiévant, P., Schlich, P., Cantagrel, R., Bertrand, M., & Bouvier, J. -C. (1989). Varietal and geographic classification of french red wines in terms of major acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46(4), 421–438. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740460405>

Fauhl-Hassek, C. (2009). Trends in wine authentication. *Bulletin de l'OIV*, 82(935), 93–100.

Feng, X., Yu, C., Chen, Y., Peng, J., Ye, L., Shen, T., Wen, H., & He, Y. (2018). Non-destructive determination of shikimic acid concentration in transgenic maize exhibiting glyphosate tolerance using chlorophyll fluorescence and hyperspectral imaging. *Frontiers in Plant Science*, 9(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00468>

Flores, P., Hellín, P., & Fenoll, J. (2012). Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 132(2), 1049–1054. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.064>

Foce, M. C., Luchian, C. E., Moroşanu, A. M., Niculaua, M., Cotea, V. V., Odăgeriu, G., & Zamfir, C. I. (2017). Content of metals and organic acids from experimental sparkling white wine. *BIO Web of Conferences*, 9, 02007. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170902007>

García Romero, E., Sánchez Muñoz, G., Martín Alvarez, P. J., & Cabezudo Ibáñez, M. D. (1993). Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 655(1), 111–117. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)87018-H](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)87018-H)

Ghosh, S., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2012). Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1425–1431. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.001>

Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & Spraul, M. (2013). Targeted and nontargeted wine analysis by ¹H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. differentiation of important parameters:

Grape variety, geographical origin, year of vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610–5619. <https://doi.org/10.1021/jf400800d>

Gougeon, L., da Costa, G., Guyon, F., & Richard, T. (2019). ¹H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines. *Food Chemistry*, 301, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125257>

Gout, E., Bligny, R., Genix, P., Tissut, M., & Douce, R. (1992). Effect of glyphosate on plant cell metabolism. ³¹P and ¹³C NMR studies. *Biochimie*, 74(9–10), 875–882. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90071-L](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90071-L)

Guo, T., Tang, C., Song, H., Dong, Y., & Ma, Q. (2021). Structural identification of sour compounds in wine and tea by ambient ionization mass spectrometry according to characteristic product ion and neutral loss. *Food Chemistry*, 353(March), 129446. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129446>

Hasib, A., Jaouad, A., Mahrouz, M., & Khouili, M. (2002). HPLC Determination of organic acids in Moroccan Apricot. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(4), 207–211. <https://doi.org/10.1080/11358120209487729>

Hroboňová, K., Lehotay, J., & Čižmárik, J. (2007). Determination of quinic and shikimic acids in products derived from bees and their preparates by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 30(17), 2635–2644. <https://doi.org/10.1080/10826070701540654>

Ivanova-Petropulos, V., Naceva, Z., Sándor, V., Makszin, L., Deutsch-Nagy, L., Berkics, B., Stafilov, T., & Kilár, F. (2018). Fast determination of lactic, succinic, malic, tartaric, shikimic, and citric acids in red Vranec wines by CZE-ESI-QTOF-MS. *Electrophoresis*, 39(13), 1597–1605. <https://doi.org/10.1002/elps.201700492>

Jensen, H. D., Krogfelt, K. A., Cornett, C., Hansen, S. H., & Christensen, S. B. (2002). Hydrophilic carboxylic acids and iridoid glycosides in the juice of American and European cranberries (*Vaccinium macrocarpon* and *V. oxycoccos*), lingonberries (*V. vitis-idaea*), and blueberries (*V. myrtillus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6871–6874. <https://doi.org/10.1021/jf0205110>

Jiang, S., & Singh, G. (1998). Chemical synthesis of shikimic acid and its analogues. *Tetrahedron*, 54(19), 4697–4753. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00016-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00016-7)

Lorenzo, J. R. F., Rubio, M. T. M., & Garcés, S. A. (2018). The competitive advantage in business, capabilities and strategy. What general performance factors are found in the Spanish wine industry? *Wine Economics and Policy*, 7(2), 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2018.04.001>

Magdas, D. A., Pirnau, A., Feher, I., Guyon, F., & Cozar, B. I. (2019). Alternative approach of applying ¹H NMR in conjunction with chemometrics for wine classification. *Lwt*, 109(October 2018), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.054>

Manzano, M. H. (2015). *Determinación del origen geográfico del vino variedad Malbec en Mendoza y su correlación con provincias vitivinícolas del país a través del análisis físico-químico y estadístico*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Mardones, C., Hitschfeld, A., Contreras, A., Lepe, K., Gutiérrez, L., & Von Baer, D. (2005). Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines. *Journal of Chromatography A*, 1085(2), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.022>

Markoski, M. M., Garavaglia, J., Oliveira, A., Olivaes, J., & Marcadenti, A. (2016). Molecular properties of red wine compounds and cardiometabolic benefits. *Nutrition and Metabolic Insights*, 9, 51–57. <https://doi.org/10.4137/NMI.S32909>

Martín Gordo, D. A. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>

Mascellani, A., Hoca, G., Babisz, M., Krska, P., Kloucek, P., & Havlik, J. (2021). ¹H NMR chemometric models for classification of Czech wine type and variety. *Food Chemistry*, 339(May 2020), 127852. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127852>

Matallo, M. B., Almeida, S. D. B., Cerdeira, A. L., Franco, D. A., Blanco, F. M. G., Menezes, P. T. C., Luchini, L. C., Moura, M. A. M., & Duke, S. O. (2009). Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. *Planta Daninha*, 27(SPECIAL ISSUE.), 987–994. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582009000500012>

Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38(10), 1175–1188. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.04.007>

Mattivi, F., & Moser, S. (2003). *Shikimic acid quantification in experimental monovarietal white wines produced in Italy. January.*

Monakhova, Y. B., Schütz, B., Schäfer, H., Spraul, M., Kuballa, T., Hahn, H., & Lachenmeier, D. W. (2014). Validation studies for multicomponent quantitative NMR analysis: The example of apple fruit juice. *Accreditation and Quality Assurance*, 19(1), 17–29. <https://doi.org/10.1007/s00769-013-1026-3>

Nicolini, G.; Barp, L.; Roman, T.; Larcher, R.; Malacarne, M.; Bottura, M.; Tait, F.; Battisti, F.; Stedile Mereles, M.; Battistella, R. (2018). Resistenti bianchi e rossi: primi dati da esperienze trentine sulla concentrazione nei vini di shikimico e flavonoidi. *L'ENOLOGO* (3): 89-93. handle: <http://hdl.handle.net/10449/46327>

Oburger, E., Kirk, G. J. D., Wenzel, W. W., Puschenreiter, M., & Jones, D. L. (2009). Interactive effects of organic acids in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(3), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.034>

Ohira, H., Torii, N., Aida, T. M., Watanabe, M., & Smith, R. L. (2009). Rapid separation of shikimic acid from Chinese star anise (*Illicium verum* Hook. f.) with hot water extraction. *Separation and Purification Technology*, 69(1), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.07.005>

OIV. (2020). *Producción de vino en 2020*. 1–8.

OIV. (2021a). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. In *International Organisation of Vine and Wine* (Vol. 1).

OIV. (2021b). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. In *International Organisation of Vine and Wine* (Vol. 2).

Parlamento Europeo, C. de la U. E. (2008). Reglamento (CE) Nº 479/2008 DEL CONSEJO de 29 de abril de 2008 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola, se modifican los Reglamentos (CE) nº 1493/1999, (CE) nº 1782/2003, (CE) nº 1290/2005 y (CE) nº 3/2008 y se derogan los R. Diario Oficial de la Unión Europea, Serie L., (148, 6 de junio), 1-61.

Parlamento Europeo, C. de la U. E. (2009). Reglamento (CE) N° 606/2009 DE LA COMISIÓN de 10 de julio de 2009 que fija determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 479/2008 del Consejo en lo relativo a las categorías de productos vitícolas, las prácticas enológicas y las restricciones aplicables. *Diario Oficial de la Unión Europea, Serie L*, (193, 24 de julio), 1-59.

Peres, R. G., Moraes, E. P., Micke, G. A., Tonin, F. G., Tavares, M. F. M., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2009). Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Control*, 20(6), 548–552. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.004>

Petersen, I. L., Andersen, K. E., Sørensen, J. C., & Sørensen, H. (2006). Determination of shikimate in crude plant extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1130(2 SPEC. ISS.), 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.011>

Pline, W. A., Wilcut, J. W., Duke, S. O., Edmisten, K. L., & Wells, R. (2002). Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 506–512. <https://doi.org/10.1021/jf0110699>

Roman, T., Nicolini, G., Barp, L., Malacarne, M., Tait, F., & Larcher, R. (2018). Shikimic acid concentration in white wines produced with different processing protocols from fungus-resistant grapes growing in the Alps. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 57(2), 41–46. <https://doi.org/10.5073/vitis.2018.57.41-46>

Saavedra, L., & Barbas, C. (2003). Validated capillary electrophoresis method for small-anions measurement in wines. *Electrophoresis*, 24(12–13), 2235–2243. <https://doi.org/10.1002/elps.200305415>

Sammons, R. D., & Gaines, T. A. (2014). Glyphosate resistance: State of knowledge. *Pest Management Science*, 70(9), 1367–1377. <https://doi.org/10.1002/ps.3743>

Scalabrin, E., Radaelli, M., & Capodaglio, G. (2016). Simultaneous determination of shikimic acid, salicylic acid and jasmonic acid in wild and transgenic *Nicotiana glauca* plants exposed to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.040>

Smyth, H., & Cozzolino, D. (2013). Instrumental methods (Spectroscopy, Electronic Nose, and Tongue) as tools to predict taste and aroma in beverages: Advantages and limitations. *Chemical Reviews*, 113(3), 1429–1440. <https://doi.org/10.1021/cr300076c>

Spring, J., Thibon, C., Pons, A., Dienes-nagy, Á., Redon, P., Darriet, P., & Lorenzini, F. (2014). *Influence de l' alimentation azotée sur la qualité des vins du cépage Arvine*. 2014.

Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.004>

Talapatra, S. K., Talapatra, B., & Nicolaou, K. C. (2015). Chemistry of plant natural products: Stereochemistry, conformation, synthesis, biology, and medicine. In *Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-45410-3>

Tamborra, P., Bolettieri, D., Latorraca, M., Tamborra, M., Paradiso, F., & Savino, M. (2014). The shikimic acid: An important metabolite for Aglianico del Vulture wines. *Italian Journal of Agronomy*, 9(4), 182–184. <https://doi.org/10.4081/ija.2014.615>

Tessini, C., Mardones, C., Rivas, L., & von Baer, D. (2009). Measurement uncertainty of shikimic acid in red wines produced in Chile. *Accreditation and Quality Assurance*, 14(7), 381–387. <https://doi.org/10.1007/s00769-009-0543-6>

Tufariello, M., Rizzuti, A., Palombi, L., Ragone, R., Capozzi, V., Gallo, V., Mastroilli, P., & Grieco, F. (2021). Non-targeted metabolomic approach as a tool to evaluate the chemical profile of sparkling wines fermented with autochthonous yeast strains. *Food Control*, 126(March), 108099. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108099>

Usuki, T., Yasuda, N., Yoshizawa-Fujita, M., & Rikukawa, M. (2011). Extraction and isolation of shikimic acid from Ginkgo biloba leaves utilizing an ionic liquid that dissolves cellulose. *Chemical Communications*, 47(38), 10560–10562. <https://doi.org/10.1039/c1cc13306c>

Uzhel, A. S., Borodina, A. N., Gorbovskaya, A. V., Shpigun, O. A., & Zatirakha, A. V. (2021). Determination of full organic acid profiles in fruit juices and alcoholic beverages

using novel chemically derivatized hyperbranched anion exchanger. *Journal of Food Composition and Analysis*, 95, 103674. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103674>

Von Baer, D., Mardones, C., Gutiérrez, L., Hofmann, G., Hitschfeld, A., & Vergara, C. (2007). Anthocyanin, flavonol, and shikimic acid profiles as a tool to verify varietal authenticity in red wines produced in Chile. *ACS Symposium Series*, 952, 228–238. <https://doi.org/10.1021/bk-2007-0952.ch015>

Wohlfahrt, Y., Patz, C. D., Schmidt, D., Rauhut, D., Honermeier, B., & Stoll, M. (2021). Responses on must and wine composition of vitis vinifera l. Cvs. riesling and cabernet sauvignon under a free air co2 enrichment (face). *Foods*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/foods10010145>

Xu, S., Hossain, M. M., Lau, B. B. Y., To, T. Q., Rawal, A., & Aldous, L. (2017). Total quantification and extraction of shikimic acid from star anise (*Ilicium verum*) using solid-state NMR and cellulose-dissolving aqueous hydroxide solutions. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5(November 2016), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2016.11.002>

Xue, M., Wang, Y., Meng, Z., Zhang, W., Wu, Y., & Jiang, S. (2013). Extraction of shikimic acid from chinese star anise using flash column chromatography on a molecularly-imprinted polymer column. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 36(19), 2677–2686. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.725690>

Zelaya, I. A., Anderson, J. A. H., Owen, M. D. K., & Landes, R. D. (2011). Evaluation of spectrophotometric and HPLC methods for shikimic acid determination in plants: Models in glyphosate-resistant and -susceptible crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2202–2212. <https://doi.org/10.1021/jf1043426>

Zhang, J. M., Shi, X. F., Fu, S. W., Zhao, J., & Guo, Y. L. (2013). Separation of acidic compounds and determination of shikimic acid in water extracts of several conifers by HPLC. *Chemistry of Natural Compounds*, 49(4), 728–729. <https://doi.org/10.1007/s10600-013-0718-6>

ANEXO 1

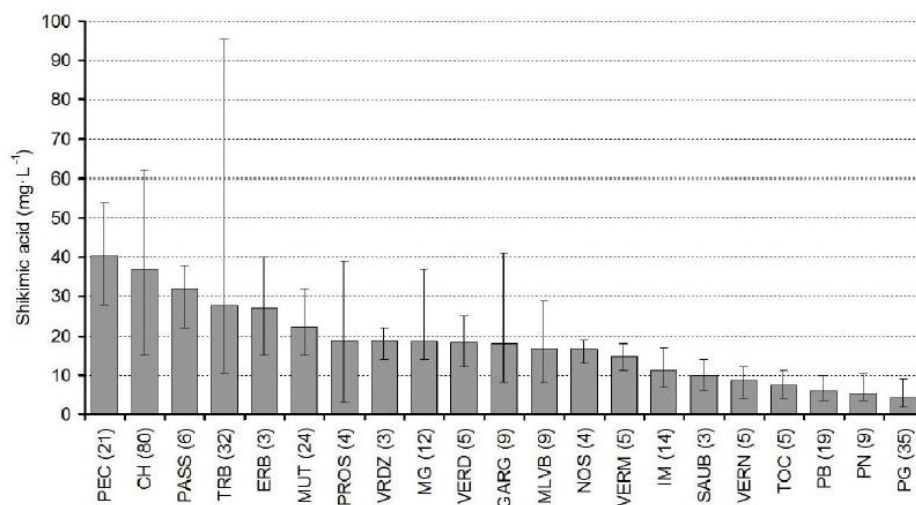


Figura 2: Esquema de la concentración máxima, media y mínima de ácido shikímico presente en diferentes vinos blancos monovarietales italianos. (PEC: Pecorino, CH: Chardonnay, PASS: Passerina, TRB: Trebbiano, ERB: Erbaluce, MUT: Müller-Thurgau, MG: Yellow Muscat, PROS: Prosecco, VRDZ: Verduzzo, VERD: Verdicchio, GARG: Garganega, MLVB: Malvasia Bianca, NOS: Nosiola, VERM: Vermentino, IM: Manzoni Bianco, SAUB: Sauvignon Blanc, VERN: Vernaccia, TOC: Tocai, PB: Pinot Blanc, PN: Pinot Noir y PG: Pinot Gris) (Roman et al., 2018).