alsemac

PROTOCOLO DE PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS

Digestão ácida em micro-ondas de amostras animais e vegetais

Área de Toxicología de la ULL

(Grupo Interuniversitario de Toxicología Ambiental y Seguridad de los Alimentos y Medicamentos)

interreg MAC Co-funded by the European Union

MAC 2021-2027 Territorial Cooperation

1. Objetivo

O presente protocolo descreve a mineralização de amostras de origem animal e vegetal por digestão ácida em vaso fechado de PTFE-TFM, com **4 mL de HNO_3 a 65 % e 2 mL de H_2O_2 a 30 %**, num digestor **de micro-ondas** com um programa por etapas até **180 °C**. O digerido é aferido a **10 mL**.

- **Âmbito de aplicação:** o procedimento é comum a todas as matrizes, tanto de origem animal (músculo, vísceras, moluscos, crustáceos, fluidos biológicos) como vegetal (algas, cereais, leguminosas, plantas medicinais, suplementos).
- **Analitos:** metais tóxicos (Cd, Pb, Hg, Al, Ni, Cr…), elementos traço (Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Mo, V, B, Ba, Li, Sr) e macroelementos (Na, K, Ca, Mg).
- **Critério de escolha face à mufla:** o método é preferível quando se determina **Hg** ou outros elementos voláteis, quando a quantidade de amostra é reduzida (1 g) ou quando se requer rapidez (≈ 1,5 h por lote de 12 vasos).

2. Fundamento

A energia de micro-ondas aquece diretamente a mistura ácida no interior de um vaso fechado. A pressão gerada eleva o ponto de ebulição do HNO_3 e permite oxidar a matéria orgânica a 180 °C sem perdas por volatilização. O HNO_3 quebra as ligações C–H, enquanto o H_2O_2 fornece oxigénio adicional, regenera o ácido nítrico e reduz o carbono residual:

$$(CH_2)_n + 2n\ HNO_3 \rightarrow n\ CO_2\uparrow + 2n\ NO\uparrow + 2n\ H_2O$$

$$2\ NO + 3\ H_2O_2 \rightarrow 2\ HNO_3 + 2\ H_2O$$

Aspeto	Digestão em micro-ondas (este protocolo)	Incineração em mufla (protocolo complementar)
Sistema	Fechado, húmido (HNO_3 + H_2O_2)	Aberto, seco (450 °C)
Massa de amostra	1 g	15 g
Duração	≈ 1 h 30 min	≈ 72 h (secagem + incineração)
Volume final	10 mL	25 mL
Hg e voláteis	São retidos	Perdem-se
Risco de contaminação	Baixo (vaso fechado)	Maior (cadinho aberto, exposição prolongada)

3. Equipamento, material e reagentes

Equipamento

Equipamento	Função / requisito
Digestor de micro-ondas de vaso fechado	Controlo de temperatura de cada vaso; alívio automático de sobrepressão (≈ 20 bar); até 12 posições
Vasos de digestão	PTFE-TFM de 50 mL, fecho em três peças; um vaso por réplica
Balança analítica	Resolução 0,1 mg

Equipamento	Função / requisito
Sistema de água ultrapura	18,2 MΩ·cm

Material

- Balões volumétricos de 10 mL (classe A) e frascos de polipropileno com tampa hermética.
- Pipetas automáticas (1–5 mL) com pontas isentas de metais; espátulas de plástico ou titânio.

Reagentes (qualidade para análise de vestígios)

- Ácido nítrico a 65 %.
- Peróxido de hidrogénio a 30 %.
- Água ultrapura (18,2 MΩ·cm).

4. Limpeza do material e controlo da contaminação

Os vasos de PTFE são lavados com detergente de laboratório e enxaguados com água ultrapura antes de cada utilização. Para a determinação de níveis vestigiais (Cd, Pb, Hg), a limpeza é reforçada da seguinte forma:

1. O vaso é esvaziado e enxaguado com água corrente e, em seguida, com água ultrapura.
2. É lavado com detergente de laboratório sem fosfatos e enxaguado três vezes com água ultrapura.
3. Realiza-se um ciclo de limpeza no próprio digestor com 5–6 mL de HNO_3 a 65 % (programa curto a 150–180 °C) ou, em alternativa, um banho de HNO_3 a 10 % durante 24 h.
4. É enxaguado com água ultrapura, deixado secar de boca para baixo numa zona limpa e guardado tapado.
5. O material de vidro volumétrico e os frascos de polipropileno são mantidos 24 h em banho de HNO_3 a 10 % e enxaguados com água ultrapura.

5. Preparação da amostra

O procedimento parte da amostra já homogeneizada de acordo com o manual de colheita e preparação de amostras. Independentemente da sua natureza, todas as amostras são tratadas da mesma forma: pesa-se **1 g de amostra** diretamente no vaso de digestão, em triplicado (no caso de fluidos, 1 mL). Esta quantidade permite uma oxidação completa sem sobrepressão.

Amostras com elevado teor de gordura (peixe gordo, ovo, enchidos): pesa-se igualmente 1 g, mas a pré-digestão em aberto prolonga-se até 1 h, uma vez que a gordura gera uma pressão elevada e a válvula de alívio poderia atuar antes de atingir 180 °C.

6. Procedimento de digestão

Cada amostra é digerida em triplicado.

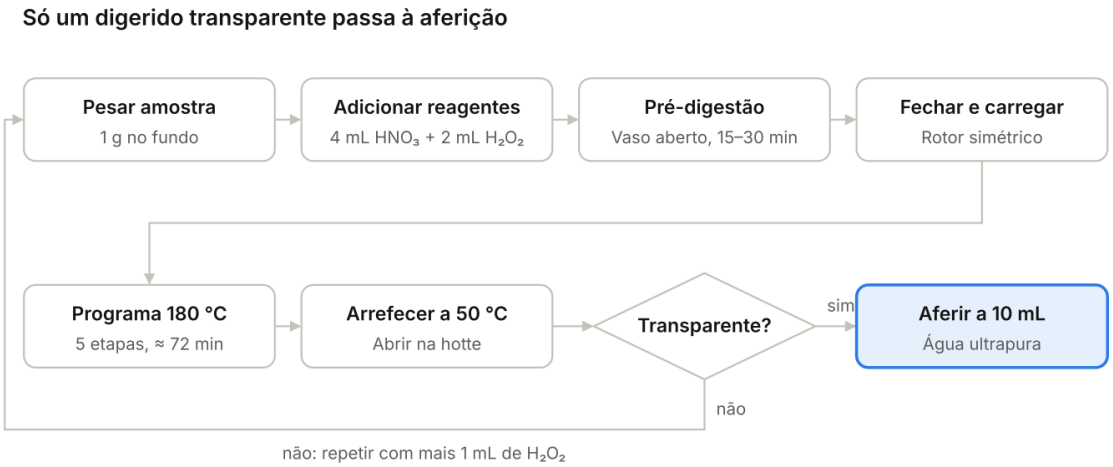

Figura 1. Sequência da digestão e critério de aceitação do digerido.

1. **Ligação e verificação.** Liga-se o digestor e verifica-se que o sensor IV está limpo e que os vasos e tampas não apresentam fissuras nem deformações.
2. **Pesagem.** Tara-se o vaso seco e a amostra é pesada diretamente no fundo, registando a massa com uma precisão de 0,1 mg. Evita-se que fiquem partículas aderidas às paredes ou à rosca.
3. **Ácido nítrico.** Adicionam-se **4 mL de HNO_3 a 65 %**, arrastando o material aderido às paredes.
4. **Peróxido de hidrogénio.** Adicionam-se lentamente **2 mL de H_2O_2 a 30 %**, gota a gota no início, uma vez que a reação com a matéria orgânica é exotérmica e produz espuma.
5. **Pré-digestão em aberto.** O vaso mantém-se aberto durante 15–30 min na hotte até cessarem a espuma e os vapores castanhos. Em amostras gordas ou ricas em açúcares, este tempo prolonga-se até 1 h.
6. **Fecho.** A tampa de três peças é montada até ao ponto de fecho, sem apertar em excesso.
7. **Carga do rotor.** Os vasos são colocados de forma simétrica no rotor.
8. **Programa.** Executa-se o programa descrito na secção 7 e a porta não se abre até que a temperatura desça a 50 °C.
9. **Abertura.** Na hotte, a tampa é desapertada gradualmente para libertar os gases nitrosos.
10. **Inspeção.** O digerido deve ser líquido, transparente (incolor ou amarelo-pálido) e livre de partículas escuras e de gordura sobrenadante. Caso contrário, a digestão repete-se com 1 mL adicional de H_2O_2. Um resíduo branco e fino corresponde normalmente a sílica, que não retém os metais de interesse e é eliminado por filtração (secção 8).

7. Programa de temperatura

O programa é o mesmo para todas as amostras: sobe em cinco etapas até 180 °C e mantém esta temperatura durante 10 min, com 72 min de aquecimento e ≈ 1 h 26 min no total incluindo o arrefecimento até 50 °C. Os patamares a 50, 60, 70 e 90 °C permitem que a matéria orgânica reaja de forma progressiva e evitam picos de pressão.

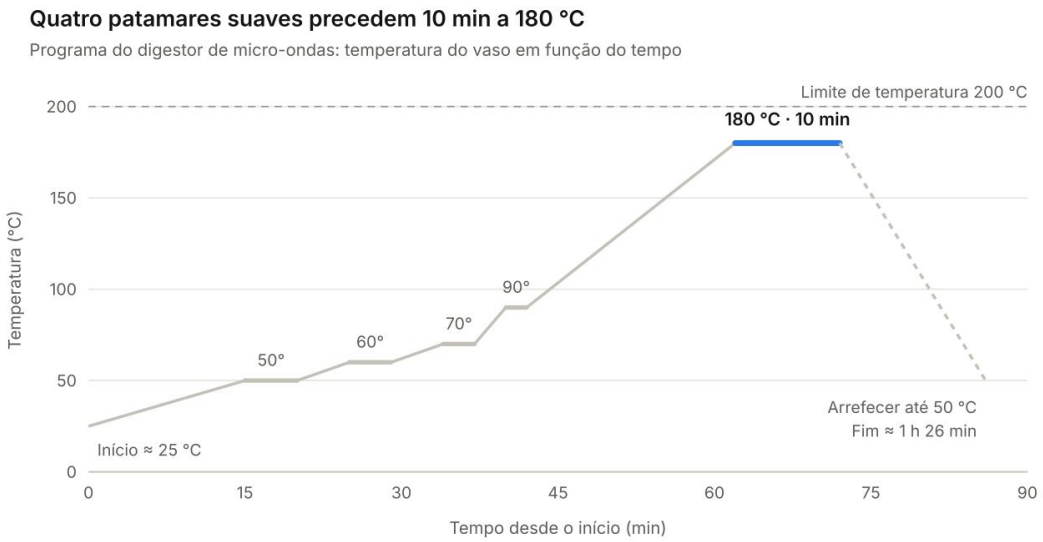

Figura 2. Programa de digestão (temperatura inicial de 25 °C assumida).

Parâmetros introduzidos no equipamento:

Etapa	Rampa (min)	Temperatura (°C)	Manutenção (min)
1	15:00	50	5:00
2	5:00	60	4:00
3	5:00	70	3:00
4	3:00	90	2:00
5	20:00	180	10:00

Temperatura limite: 200 °C. **Temperatura de arrefecimento:** 50 °C.

Potência: não é necessário defini-la; o digestor regula-a automaticamente para seguir a rampa de temperatura.

8. Pós-digestão: aferição e conservação

O digerido é levado a **10 mL com água ultrapura em balão volumétrico** imediatamente após a digestão e conservado num frasco hermético até à análise.

1. O digerido é transferido para o balão de 10 mL com a ajuda de um funil pequeno.
2. O vaso e a tampa são lavados 2–3 vezes com pequenos volumes de água ultrapura (≈ 1 mL) e as lavagens são incorporadas no balão, sem ultrapassar o traço de aferição.
3. Afere-se a 10 mL, tapa-se e homogeneiza-se invertendo o balão dez vezes.
4. Se ficar resíduo insolúvel (sílica), a solução é filtrada por papel sem cinzas ou por filtro de seringa de 0,45 µm de PTFE/PES.
5. A solução é transferida para um frasco de polipropileno com tampa hermética, devidamente etiquetado.

Acidez final. A diluição de 4 mL de HNO_3 a 65 % para 10 mL origina uma solução com ≈ 40 % v/v de HNO_3 concentrado (algo menos após a reação). Este dado deve ser indicado na folha de envio das amostras, pois pode ser necessário diluir o digerido ou preparar os padrões na mesma matriz ácida.

9. Segurança

- Trabalha-se na hotte com bata, óculos ou viseira e luvas de nitrilo. O HNO_3 a 65 % é corrosivo e oxidante; o H_2O_2 a 30 % é oxidante e provoca queimaduras na pele.
- O peróxido é sempre adicionado depois do ácido e lentamente; nenhum vaso é fechado enquanto apresentar espuma.
- Não se digerem nestes vasos solventes orgânicos, álcoois nem amostras que contenham explosivos ou perclorato.
- Os vasos só são abertos abaixo de 50 °C e orientados para o fundo da hotte, pois libertam-se vapores nitrosos (NO_2) tóxicos.
- Antes de cada lote, inspecionam-se as tampas e os corpos dos vasos e retiram-se os que apresentem fissuras, riscos profundos ou deformações.
- Os resíduos ácidos são recolhidos no contentor de resíduos ácidos inorgânicos do laboratório.

10. Referências

[1] Pérez-Godiño García M, Delgado-Suárez I, Paz-Montelongo S, Darias-Rosales J, Martínez-Climent A, Martín-León V, Rubio C, Gutiérrez AJ, Hardisson A, Alejandro-Vega S. Nitrates and Toxic Metals in Wild Macroalgae from Tenerife, Canary Islands: Occurrence and Assessment of the Risk to Human Health. *Sustainability* 2026; 18(18): 9343. https://www.mdpi.com/2071-1050/18/18/9343

[2] Gómez-Rodríguez J, Rodríguez-Díaz R, Blanes-Zamora R, Paz-Montelongo S, et al. Influence of Follicular Fluid Metals on Female Sexual Hormones. *J Clin Med Sci* 2025; 9: 304.

[3] Rodríguez-Díaz R, Blanes-Zamora R, Paz-Montelongo S, et al. The Influence of Follicular Fluid Metals on Assisted Reproduction Outcome. *Biol Trace Elem Res* 2023; 201: 5069–5082. https://doi.org/10.1007/s12011-023-03578-3

[4] Rubio C, Paz S, Gutiérrez ÁJ, Gomes Furtado V, González-Weller D, Revert C, Hardisson A. Toxic metals in cereals in Cape Verde: risk assessment evaluation. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18(7).

[5] Martín-León V, Paz S, et al. Human Exposure to Toxic Metals (Cd, Pb, Hg) and Nitrates (NO_3^-) from Seaweed Consumption. *Appl Sci* 2021; 11: 6934. https://doi.org/10.3390/app11156934