alsemac

PROTOCOLO DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS

Digestión ácida en microondas de muestras animales y vegetales

Área de Toxicología de la ULL

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

interreg Co-funded by the European Union MAC

MAC 2021-2027 Territorial Cooperation

1. Objetivo

El presente protocolo describe la mineralización de muestras de origen animal y vegetal mediante digestión ácida en vaso cerrado de PTFE-TFM, con **4 mL de HNO_3 al 65 % y 2 mL de H_2O_2 al 30 %**, en un digestor **de microondas** con un programa escalonado hasta **180 °C**. El digerido se enrasa a **10 mL**.

- **Ámbito de aplicación:** el procedimiento es común a todas las matrices, tanto de origen animal (músculo, vísceras, moluscos, crustáceos, fluidos biológicos) como vegetal (algas, cereales, legumbres, plantas medicinales, suplementos).
- **Analitos:** metales tóxicos (Cd, Pb, Hg, Al, Ni, Cr…), elementos traza (Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Mo, V, B, Ba, Li, Sr) y macroelementos (Na, K, Ca, Mg).
- **Criterio de elección frente a la mufla:** el método es preferible cuando se determina **Hg** u otros elementos volátiles, cuando la cantidad de muestra es reducida (1 g) o cuando se requiere rapidez (≈ 1,5 h por tanda de 12 vasos).

2. Fundamentación

La energía de microondas calienta directamente la mezcla ácida en el interior de un vaso cerrado. La presión generada eleva el punto de ebullición del HNO_3 y permite oxidar la materia orgánica a 180 °C sin pérdidas por volatilización. El HNO_3 rompe los enlaces C–H, mientras que el H_2O_2 aporta oxígeno adicional, regenera el ácido nítrico y reduce el carbono residual:

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

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

Aspecto	Digestión en microondas (este protocolo)	Incineración en mufla (protocolo complementario)
Sistema	Cerrado, húmedo (HNO_3 + H_2O_2)	Abierto, seco (450 °C)
Masa de muestra	1 g	15 g
Duración	≈ 1 h 30 min	≈ 72 h (secado + incineración)
Volumen final	10 mL	25 mL
Hg y volátiles	Se retienen	Se pierden
Riesgo de contaminación	Bajo (vaso cerrado)	Mayor (crisol abierto, exposición prolongada)

3. Equipos, material y reactivos

Equipos

Equipo	Función / requisito
Digestor de microondas de vaso cerrado	Control de temperatura de cada vaso; alivio automático de sobrepresión (≈ 20 bar); hasta 12 posiciones
Vasos de digestión	PTFE-TFM de 50 mL, cierre en tres piezas; un vaso por réplica
Balanza analítica	Resolución 0,1 mg

Equipo	Función / requisito
Sistema de agua ultrapura	18,2 MΩ·cm

Material

- Matraces aforados de 10 mL (clase A) y frascos de polipropileno con tapón hermético.
- Pipetas automáticas (1–5 mL) con puntas exentas de metales; espátulas de plástico o titanio.

Reactivos (calidad para análisis de trazas)

- Ácido nítrico 65 %.
- Peróxido de hidrógeno 30 %.
- Agua ultrapura (18,2 MΩ·cm).

4. Limpieza del material y control de la contaminación

Los vasos de PTFE se lavan con detergente de laboratorio y se aclaran con agua ultrapura antes de cada uso. Para la determinación de niveles traza (Cd, Pb, Hg), la limpieza se refuerza del siguiente modo:

1. El vaso se vacía y se aclara con agua corriente y, a continuación, con agua ultrapura.
2. Se lava con detergente de laboratorio sin fosfatos y se aclara tres veces con agua ultrapura.
3. Se realiza un ciclo de limpieza en el propio digestor con 5–6 mL de HNO_3 65 % (programa corto a 150–180 °C) o, alternativamente, un baño de HNO_3 al 10 % durante 24 h.
4. Se aclara con agua ultrapura, se deja secar boca abajo en una zona limpia y se guarda tapado.
5. El material de vidrio aforado y los frascos de polipropileno se mantienen 24 h en baño de HNO_3 al 10 % y se aclaran con agua ultrapura.

5. Preparación de la muestra

El procedimiento parte de la muestra ya homogeneizada conforme al manual de toma y preparación de muestras. Con independencia de su naturaleza, todas las muestras se tratan del mismo modo: se pesa **1 g de muestra** directamente en el vaso de digestión, por triplicado (en el caso de fluidos, 1 mL). Esta cantidad permite una oxidación completa sin sobrepresión.

Muestras con alto contenido graso (pescado azul, huevo, embutidos): se pesa igualmente 1 g, pero la pre-digestión en abierto se prolonga hasta 1 h, ya que la grasa genera una presión elevada y la válvula de alivio podría actuar antes de alcanzar 180 °C.

6. Procedimiento de digestión

Cada muestra se digiere por triplicado.

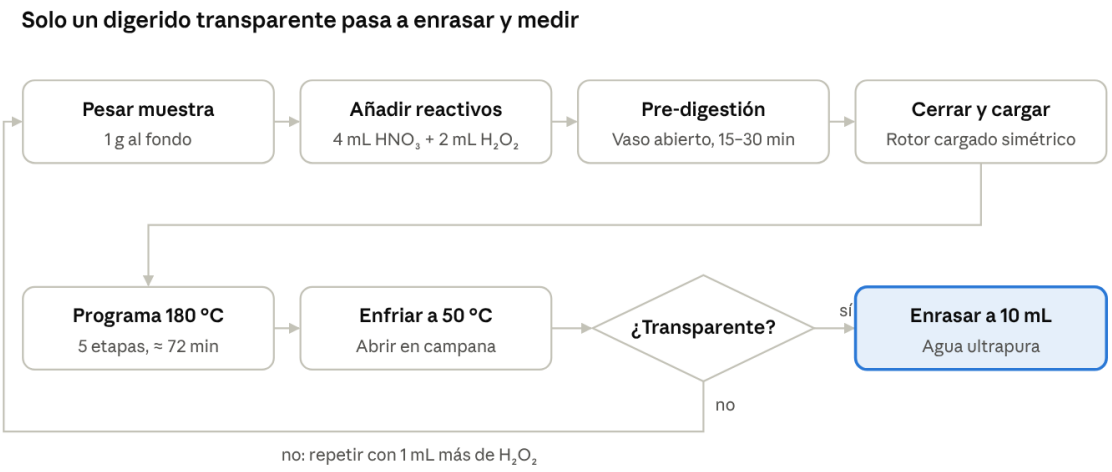

Figura 1. Secuencia de la digestión y criterio de aceptación del digerido.

1. **Encendido y comprobación.** Se enciende el digestor y se comprueba que el sensor IR está limpio y que los vasos y tapas no presentan grietas ni deformaciones.
2. **Pesada.** Se tara el vaso seco y la muestra se pesa directamente en el fondo, registrando la masa con una precisión de 0,1 mg. Se evita que queden partículas adheridas a las paredes o a la rosca.
3. **Ácido nítrico.** Se añaden **4 mL de HNO_3 al 65 %**, arrastrando el material adherido a las paredes.
4. **Peróxido de hidrógeno.** Se añaden lentamente **2 mL de H_2O_2 al 30 %**, gota a gota al principio, ya que la reacción con la materia orgánica es exotérmica y produce espuma.
5. **Pre-digestión en abierto.** El vaso se mantiene sin cerrar 15–30 min en campana hasta que cesan la espuma y los vapores pardos. En muestras grasas o ricas en azúcares, este tiempo se prolonga hasta 1 h.
6. **Cierre.** La tapa de tres piezas se monta hasta el punto de cierre, sin apretar en exceso.
7. **Carga del rotor.** Los vasos se colocan de forma simétrica en el rotor.
8. **Programa.** Se ejecuta el programa descrito en la sección 7 y la puerta no se abre hasta que la temperatura desciende a 50 °C.
9. **Apertura.** En campana, la tapa se afloja gradualmente para liberar los gases nitrosos.
10. **Inspección.** El digerido debe ser líquido, transparente (incoloro o amarillo pálido) y estar libre de partículas oscuras y de grasa sobrenadante. En caso contrario, la digestión se repite con 1 mL adicional de H_2O_2. Un residuo blanco y fino suele corresponder a sílice, que no retiene los metales de interés y se elimina por filtración (sección 8).

7. Programa de temperatura

El programa es el mismo para todas las muestras: asciende en cinco etapas hasta 180 °C y mantiene esta temperatura durante 10 min, con 72 min de calentamiento y ≈ 1 h 26 min en total incluyendo el enfriamiento hasta 50 °C. Las mesetas a 50, 60, 70 y 90 °C permiten que la materia orgánica reaccione de forma progresiva y evitan picos de presión.

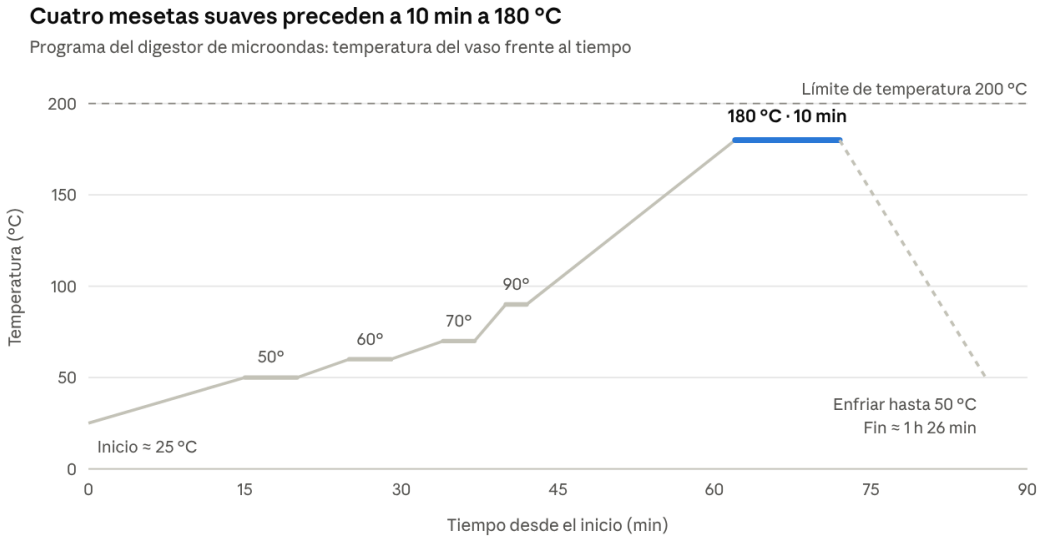

Figura 2. Programa de digestión (inicio a 25 °C supuesto).

Parámetros que se introducen en el equipo:

Etapa	Rampa (min)	Temperatura (°C)	Mantenimiento (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 límite: 200 °C. **Temperatura de enfriamiento:** 50 °C.

Potencia: no es necesario fijarla; el digestor la regula automáticamente para seguir la rampa de temperatura.

8. Post-digestión: enrase y conservación

El digerido se lleva a **10 mL con agua ultrapura en matraz aforado** inmediatamente después de la digestión y se conserva en un frasco hermético hasta su análisis.

1. El digerido se trasvasa al matraz de 10 mL con ayuda de un embudo pequeño.
2. El vaso y la tapa se lavan 2–3 veces con pequeños volúmenes de agua ultrapura (≈ 1 mL) y los lavados se incorporan al matraz, sin sobrepasar el aforo.
3. Se enrasa a 10 mL, se tapa y se homogeneiza invirtiendo el matraz diez veces.
4. Si queda residuo insoluble (sílice), la disolución se filtra por papel sin cenizas o por filtro de jeringa de 0,45 µm de PTFE/PES.
5. La disolución se transfiere a un frasco de polipropileno con tapón hermético, etiquetado debidamente

Acidez final. La dilución de 4 mL de HNO_3 65 % a 10 mL da lugar a una disolución con ≈ 40 % v/v de HNO_3 concentrado (algo menos tras la reacción). Este dato debe indicarse en la hoja de envío de las muestras, ya que puede ser necesario diluir el digerido o preparar los patrones en la misma matriz ácida.

9. Seguridad

- Se trabaja en campana de gases con bata, gafas o pantalla facial y guantes de nitrilo. El HNO_3 65 % es corrosivo y oxidante; el H_2O_2 30 % es oxidante y produce quemaduras en la piel.
- El peróxido se añade siempre después del ácido y de forma lenta; no se cierra ningún vaso mientras presente espuma.
- No se digieren en estos vasos disolventes orgánicos, alcoholes ni muestras que contengan explosivos o perclorato.
- Los vasos se abren únicamente por debajo de 50 °C y orientados hacia el fondo de la campana, ya que se liberan vapores nitrosos (NO_2) tóxicos.
- Antes de cada tanda se revisan las tapas y los cuerpos de los vasos y se retiran los que presentan grietas, rayas profundas o deformaciones.
- Los residuos ácidos se recogen en el contenedor de residuos ácidos inorgánicos del laboratorio.

10. Referencias

[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