alsemac

PROTOCOLO DE PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS

Incineração em forno mufla 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 eliminação da matéria orgânica de amostras de origem animal e vegetal por via seca. Pesam-se **15 g** de amostra, secam-se a **70 °C durante 24 h**, incineram-se em forno mufla a **450 °C ± 25 °C** até à obtenção de **cinzas brancas** (≈ 48 h) e as cinzas dissolvem-se em **HNO_3 a 1,5 %** até um volume final de **25 mL**.

- **Âmbito de aplicação:** o procedimento é comum a todas as matrizes alimentares, tanto de origem animal (peixe, invertebrados, carne, pratos preparados) como vegetal (leguminosas, cereais, plantas medicinais, suplementos).
- **Analitos:** Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V, Zn e Na, K, Ca, Mg.
- **Limitações:** o método não é adequado para Hg, As, Se nem outros elementos voláteis a 450 °C, para os quais se utiliza a digestão ácida em micro-ondas.
- **Critério de escolha:** recomenda-se quando se dispõe de amostra abundante e se determinam elementos a nível vestigial em matrizes com elevado teor orgânico. A elevada massa de amostra compensa as baixas concentrações e, ao utilizar-se uma quantidade mínima de reagentes, os brancos são muito baixos.

2. Fundamento

A 450 °C e na presença de ar, a matéria orgânica oxida-se a CO_2 e H_2O, e os metais permanecem nas cinzas sob a forma de óxidos, carbonatos e sais, que posteriormente se dissolvem em ácido nítrico diluído. O aquecimento gradual evita a combustão com chama e a projeção de partículas, enquanto não ultrapassar ≈ 450 °C limita as perdas por volatilização e a formação de óxidos refratários de difícil dissolução.

Aspeto	Incineração em mufla (este protocolo)	Digestão em micro-ondas (protocolo complementar)
Sistema	Aberto, seco (450 °C, ar)	Fechado, húmido (HNO_3 + H_2O_2, 180 °C)
Massa de amostra	15 g	1 g
Duração	24 h de secagem + ≈ 48 h de incineração	≈ 1 h 30 min
Reagentes	HNO_3 diluído (HNO_3 concentrado apenas em amostras muito gordas)	4 mL HNO_3 a 65 % + 2 mL H_2O_2 a 30 %
Volume final	25 mL	10 mL
Hg, As, Se	Perdem-se	São retidos
Capacidade	Dezenas de cápsulas por lote	12 vasos por lote

3. Equipamento, material e reagentes

Equipamento	Função / requisito
Forno mufla	Programável em rampa e patamar; 450 °C ± 25 °C

Equipamento	Função / requisito
Estufa de secagem	70 °C, 24 h
Placa de aquecimento	100 °C, para o tratamento prévio com HNO_3 e a reincineração
Cápsulas ou cadinhos de porcelana	Com tampa ou identificados na base
Balança analítica	Resolução 0,1 mg

Material

- Balões volumétricos de 25 mL (classe A) e frascos de polipropileno com tampa.
- Funis e papel de filtro sem cinzas, ou filtros de seringa de 0,45 µm.
- Pinças de cadinho compridas, luvas térmicas e exsicador.

Reagentes

- Ácido nítrico a 65 %, qualidade para análise de vestígios.
- **HNO_3 a 1,5 %:** prepara-se diluindo 15 mL de HNO_3 a 65 % até 1 L com água ultrapura (1,5 % v/v). Recomenda-se prepará-lo semanalmente.
- Água ultrapura (18,2 MΩ·cm).

4. Limpeza de cadinhos e controlo da contaminação

Os cadinhos de porcelana são reutilizados, pelo que a sua limpeza condiciona o valor do branco. Procede-se da seguinte forma:

1. Retiram-se os restos de cinza com água e uma escova macia, sem esfregões metálicos.
2. Imergem-se num banho de HNO_3 a 10 % durante pelo menos 24 h.
3. Enxaguam-se três vezes com água ultrapura e secam-se na estufa.
4. Antes da primeira utilização, ou após uma incineração, os cadinhos devem ser submetidos a um tratamento de limpeza a 800 °C durante 8 horas (a rampa com que se atinge esta temperatura deve ser de pelo menos 8 h, a fim de não submeter o material a esforço desnecessário).
5. Conservam-se no exsicador e manipulam-se exclusivamente com pinças.

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: pesam-se **15 g** em fresco em cápsula de porcelana previamente tarada e identificada, em triplicado. Os resultados expressam-se em **peso fresco** (mg/kg p.f.), base habitual para a estimativa da ingestão.

Peso fresco e humidade. Se se registar a massa da cápsula vazia, com a amostra fresca e após a secagem, obtém-se a percentagem de humidade e o resultado pode também ser expresso em peso seco.

6. Procedimento

O ciclo completo tem uma duração aproximada de 72 h: 24 h de secagem e ≈ 48 h na mufla. O ponto de controlo é a cor da cinza: apenas uma cinza branca indica a ausência de carbono residual que possa reter metais ou interferir na análise posterior.

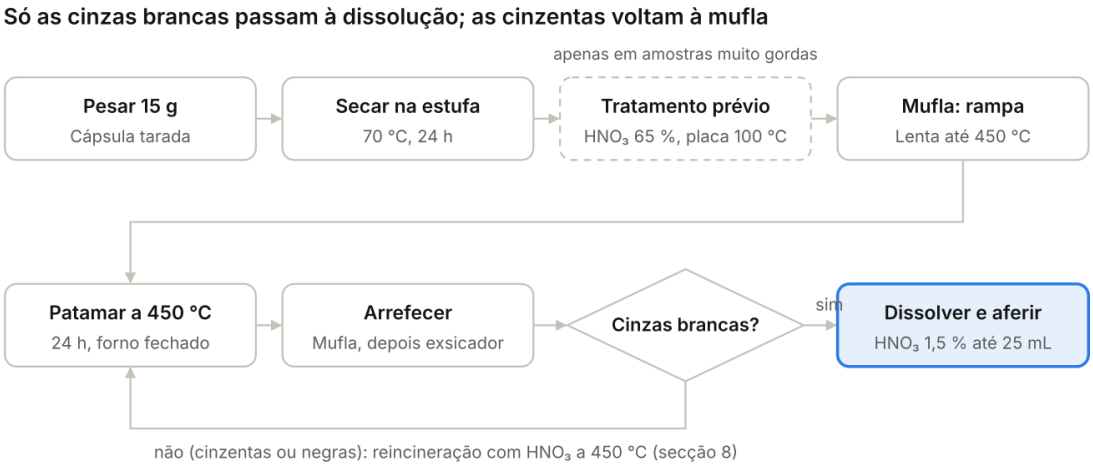

Figura 1. Sequência da incineração e critério de aceitação das cinzas.

A. Secagem

1. Pesa-se a cápsula vazia (m_0), adicionam-se 15 g de amostra e volta a pesar-se (m_1). Cada amostra é analisada em triplicado.
2. As cápsulas secam-se na estufa a **70 °C** durante **24 h**.
3. Deixam-se arrefecer no exsicador e pesam-se (m_2) para determinar a humidade.

B. Tratamento prévio com ácido nítrico (apenas em amostras muito gordas)

4. Este passo só se considera em amostras com um teor de gordura muito elevado que apresentem dificuldades durante a incineração (combustão com chama, projeções ou cinzas fundidas e negras). Nesse caso, adicionam-se 2–5 mL de HNO_3 a 65 % sobre a amostra seca até a cobrir e aquece-se em placa a **100 °C** até à evaporação completa do ácido. Nas restantes amostras passa-se diretamente à incineração.

C. Incineração

5. As cápsulas são introduzidas na mufla fria, com a porta fechada.
6. A temperatura eleva-se gradualmente até **450 °C**, com uma rampa de ≈ 50 °C/h ou repartindo a subida por ≈ 24 h, de modo que a amostra carbonize sem chama.
7. Mantêm-se **450 °C durante 24 h** (ou até à obtenção de cinzas brancas), o que corresponde a ≈ 48 h de permanência na mufla.
8. Desliga-se o forno e deixa-se arrefecer no seu interior até < 100 °C; as cápsulas são transferidas para o exsicador com pinças.

D. Verificação da cinza

9. Se a cinza for **branca ou cinzenta muito clara**, prossegue-se com a dissolução. Se for **cinzenta escura ou apresentar pontos negros**, reincinera-se de acordo com a secção 8.

E. Dissolução e aferição

10. Adicionam-se à cápsula alguns mililitros de **HNO_3 a 1,5 %** e as cinzas dissolvem-se raspando suavemente com uma vareta de plástico.
11. A solução é filtrada para um balão volumétrico de **25 mL**; a cápsula e o filtro são lavados com HNO_3 a 1,5 % e afere-se.
12. A solução é transferida para um frasco de **polipropileno** e conservada à temperatura ambiente até à análise.

7. Programa térmico

O programa térmico é o mesmo para todas as amostras: rampa lenta até **450 °C** e patamar de **24 h**, com uma permanência total de **≈ 48 h** na mufla.

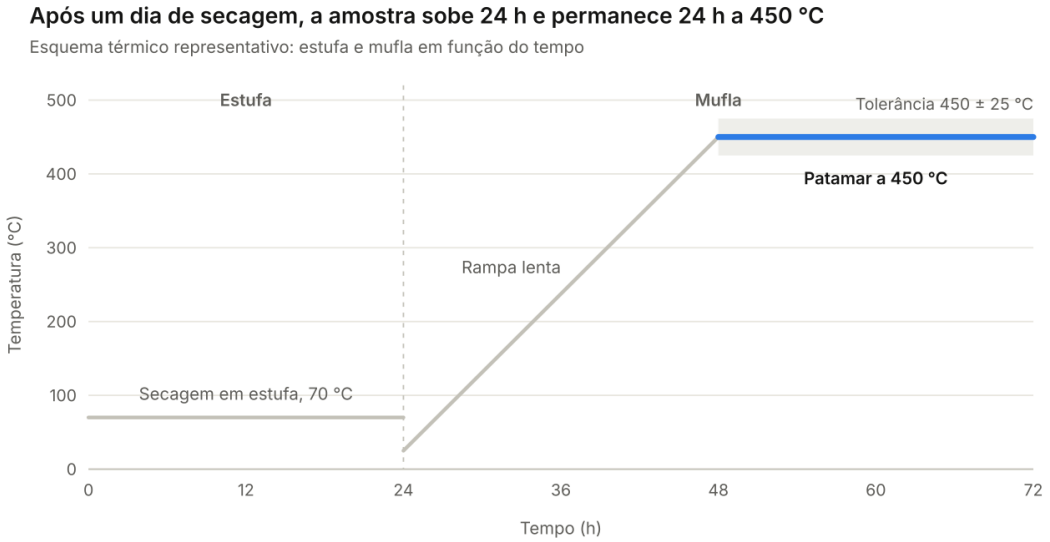

Figura 2. Esquema térmico (subida representada como linear; temperatura inicial da mufla assumida de 25 °C).

Etapa	Condições
Secagem (estufa)	70 °C, 24 h
Subida (mufla)	≈ 50 °C/h até 450 °C (≈ 24 h)
Patamar	450 °C ± 25 °C, 24 h
Arrefecimento	Livre, dentro do forno, até < 100 °C

Se uma amostra fumegar ou se inflamar durante a subida, pode acrescentar-se um patamar intermédio de 2–4 h a 200–250 °C para completar a carbonização antes de continuar o aquecimento. Não se deve ultrapassar 500 °C, pois acima desta temperatura aumentam as perdas de Cd e Pb e formam-se óxidos de Cr, Fe e Ni difíceis de redissolver.

8. Procedimento de reincineração

A reincineração aplica-se quando, após o patamar de 24 h a 450 °C, a cinza não é branca. A temperatura **não é aumentada**: a oxidação do carbono residual é favorecida com algumas gotas de HNO_3 e a amostra volta a 450 °C durante algumas horas.

Casos em que é necessária

- Cinza cinzenta escura ou negra, ou com pontos ou núcleos negros.
- Crosta branca à superfície que, ao ser partida com uma vareta, revela material negro por baixo.
- Cinza fundida ou vitrificada com carbono retido.

É mais frequente em amostras com elevado teor de gordura ou de açúcares.

Procedimento

1. **Arrefecimento.** As cápsulas arrefecem no exsicador até à temperatura ambiente. Não se deve adicionar ácido sobre uma cinza quente, pois produzem-se salpicos.
2. **Humedecimento e desagregação.** Na hotte, a cinza é humedecida com 0,5–1 mL de água ultrapura e os grumos e a crosta são desagregados com uma vareta de plástico, sem retirar material da cápsula. A vareta é enxaguada dentro da cápsula com algumas gotas de água.
3. **Adição de ácido.** Adicionam-se gota a gota **1–2 mL de HNO_3 a 65 %** até embeber toda a cinza.
4. **Evaporação.** As cápsulas são aquecidas em placa a **≈ 100 °C** até secura completa, evitando a ebulição violenta. Não deve ficar líquido, pois o ácido não evaporado corrói a mufla.
5. **Regresso à mufla.** As cápsulas são introduzidas com a mufla fria ou abaixo de 200 °C e a temperatura é elevada até **450 °C** a 50–100 °C/h.
6. **Patamar.** Mantêm-se **450 °C entre 4 e 12 h** (habitualmente, durante a noite).
7. **Arrefecimento e inspeção.** Após arrefecerem dentro da mufla, as cápsulas são transferidas para o exsicador e examina-se a cor da cinza.
8. **Repetição.** Se a cinza continuar cinzenta, repetem-se os passos 1–7. Se após **três ciclos** não se obtiver cinza branca, repete-se a análise aplicando o tratamento prévio com HNO_3 (secção 6.B) ou recorre-se à digestão em micro-ondas.

Precauções

- Não se deve ultrapassar 450 °C para acelerar o processo, pois aumentam as perdas de Cd e Pb e formam-se óxidos de difícil dissolução.
- Todas as réplicas de uma mesma amostra são reincineradas com o mesmo esquema, ainda que apenas uma apresente cinza cinzenta.
- O número de reincinerações necessárias é registado na folha de cada cápsula.
- Uma cinza branca com algum ponto cinzento isolado considera-se aceitável se se dissolver completamente em HNO_3 a 1,5 %.

9. Segurança

- A carga e descarga da mufla realizam-se com pinças compridas, luvas térmicas e óculos; a porta não deve ser aberta acima de ≈ 200 °C.
- A primeira fase da incineração liberta fumo, pelo que a mufla deve dispor de extração ou situar-se sob hotte.
- Não devem ser introduzidas na mufla cápsulas com ácido por evaporar: os vapores nítricos corroem a câmara e as resistências.
- O HNO_3 a 65 % é corrosivo e oxidante; manipula-se na hotte com luvas de nitrilo.

- As cápsulas arrefecem no exsicador sobre uma superfície resistente ao calor.

10. Referências

[1] Bethencourt-Barbuzano E, de Lima Brum R, Martín-León V, Paz-Montelongo S, Gutiérrez-Fernández ÁJ, da Silva Júnior FMR, Hardisson A, Cámara M, Rubio-Armendáriz C. Quantifying lead and cadmium in protein supplements: Insights into dietary exposure and health risks. *J Food Compos Anal*, dezembro de 2025.

[2] García CE, Paz-Montelongo S, Hardisson A, Rubio C, Gutiérrez ÁJ, González-Weller D, Darias-Rosales J, et al. Macroelement Content (Na, K, Ca, and Mg) in Microwave Foods. *Nutrients* 2025; 17(10): 1678.

[3] Jaúdenes-Marrero JR, Giannantonio G, Paz-Montelongo S, Hardisson A, Alejandro-Vega S, et al. Analysis of Toxic Element Levels and Health Risks in Different Soybean Species (*Glycine max*, *Vigna radiata*, *Vigna angularis*, *Vigna mungo*). *Nutrients* 2024; 16(24): 4290.

[4] Lozano-Bilbao E, Paz-Montelongo S, Gutiérrez ÁJ, et al. Environmental Factors Influencing Metal Concentrations in *Scomber colias* Along the Canary Islands. *Biol Trace Elem Res* 2024.

[5] Lozano-Bilbao E, Hardisson A, Paz S, et al. Invertebrados intertidais de Punta del Hidalgo (Tenerife). *Revista Ceres*. DOI 10.5281/zenodo.18479107.

[6] Jaúdenes-Marrero JR, Gutiérrez-Fernández A, Rubio C, Paz-Montelongo S, et al. Metal Content in *Valeriana officinalis* L. Root Commercialized in a Spanish Region (Tenerife, Canary Islands). *Foods* 2026; 15(5): 958.