alsemac

PROTOCOLO DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS

# Incineración en horno mufla 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. Objeto

El presente protocolo describe la eliminación de la materia orgánica de muestras de origen animal y vegetal por vía seca. Se pesan **15 g** de muestra, se secan a **70 °C durante 24 h**, se incineran en horno mufla a **450 °C ± 25 °C** hasta la obtención de **cenizas blancas** (≈ 48 h) y las cenizas se disuelven en **$HNO_3$ al 1,5 %** hasta un volumen final de **25 mL**.

- **Ámbito de aplicación:** el procedimiento es común a todas las matrices alimentarias, tanto de origen animal (pescado, invertebrados, carne, platos preparados) como vegetal (legumbres, cereales, plantas medicinales, suplementos).
- **Analitos:** Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V, Zn y Na, K, Ca, Mg.
- **Limitaciones:** el método no es adecuado para Hg, As, Se ni otros elementos volátiles a 450 °C, para los que se emplea la digestión ácida en microondas.
- **Criterio de elección:** se recomienda cuando se dispone de muestra abundante y se determinan elementos a nivel traza en matrices con alto contenido orgánico. La elevada masa de muestra compensa las bajas concentraciones y, al emplearse una cantidad mínima de reactivos, los blancos son muy bajos.

## 2. Fundamento

A 450 °C y en presencia de aire, la materia orgánica se oxida a $CO_2$ y $H_2O$, y los metales permanecen en las cenizas en forma de óxidos, carbonatos y sales, que posteriormente se disuelven en ácido nítrico diluido. El calentamiento gradual evita la combustión con llama y la proyección de partículas, mientras que no superar ≈ 450 °C limita las pérdidas por volatilización y la formación de óxidos refractarios de difícil disolución.

| Aspecto | Incineración en mufla (este protocolo) | Digestión en microondas (protocolo complementario) |
|---|---|---|
| Sistema | Abierto, seco (450 °C, aire) | Cerrado, húmedo ($HNO_3$ + $H_2O_2$, 180 °C) |
| Masa de muestra | 15 g | 1 g |
| Duración | 24 h de secado + ≈ 48 h de incineración | ≈ 1 h 30 min |
| Reactivos | $HNO_3$ diluido ($HNO_3$ concentrado solo en muestras muy grasas) | 4 mL $HNO_3$ 65 % + 2 mL $H_2O_2$ 30 % |
| Volumen final | 25 mL | 10 mL |
| Hg, As, Se | Se pierden | Se retienen |
| Capacidad | Decenas de cápsulas por tanda | 12 vasos por tanda |

## 3. Equipos, material y reactivos

| Equipo | Función / requisito |
|---|---|
| Horno mufla | Programable en rampa y meseta; 450 °C ± 25 °C |

| Equipo | Función / requisito |
|---|---|
| Estufa de secado | 70 °C, 24 h |
| Placa calefactora | 100 °C, para el tratamiento previo con $HNO_3$ y la reincineración |
| Cápsulas o crisoles de porcelana | Con tapa o identificados en la base |
| Balanza analítica | Resolución 0,1 mg |

**Material**

- Matraces aforados de 25 mL (clase A) y frascos de polipropileno con tapón.
- Embudos y papel de filtro sin cenizas, o filtros de jeringa de 0,45 µm.
- Pinzas de crisol largas, guantes térmicos y desecador.

**Reactivos**

- Ácido nítrico 65 %, calidad para análisis de trazas.
- **$HNO_3$ al 1,5 %:** se prepara diluyendo 15 mL de $HNO_3$ 65 % hasta 1 L con agua ultrapura (1,5 % v/v). Se recomienda prepararlo semanalmente.
- Agua ultrapura (18,2 MΩ·cm).

## 4. Limpieza de crisoles y control de la contaminación

Los crisoles de porcelana se reutilizan, por lo que su limpieza condiciona el valor del blanco. Se procede del siguiente modo:

1. Se retiran los restos de ceniza con agua y un cepillo suave, sin estropajos metálicos.
2. Se sumergen en un baño de $HNO_3$ al 10 % durante al menos 24 h.
3. Se aclaran tres veces con agua ultrapura y se secan en estufa.
4. Antes del primer uso, o tras una incineración los crisoles deberán de ser sometidos a un tratamiento de limpieza en los que se someten a 800º C durante 8 horas (la rampa con la que se llega a esta temperatura conviene que sea de al menos 8h con el fin de no someter a estrés innecesario el material.
5. Se conservan en desecador y se manipulan exclusivamente con pinzas.

## 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 pesan **15 g** en fresco en cápsula de porcelana previamente tarada e identificada, por triplicado. Los resultados se expresan en **peso fresco** (mg/kg p.f.), base habitual para la estimación de la ingesta.

**Peso fresco y humedad.** Si se registra la masa de la cápsula vacía, con la muestra fresca y tras el secado, se obtiene el porcentaje de humedad y el resultado puede expresarse también en peso seco.

## 6. Procedimiento

El ciclo completo tiene una duración aproximada de 72 h: 24 h de secado y ≈ 48 h en la mufla. El punto de control es el color de la ceniza: únicamente una ceniza blanca indica la ausencia de carbono residual que pueda retener metales o interferir en el análisis posterior.

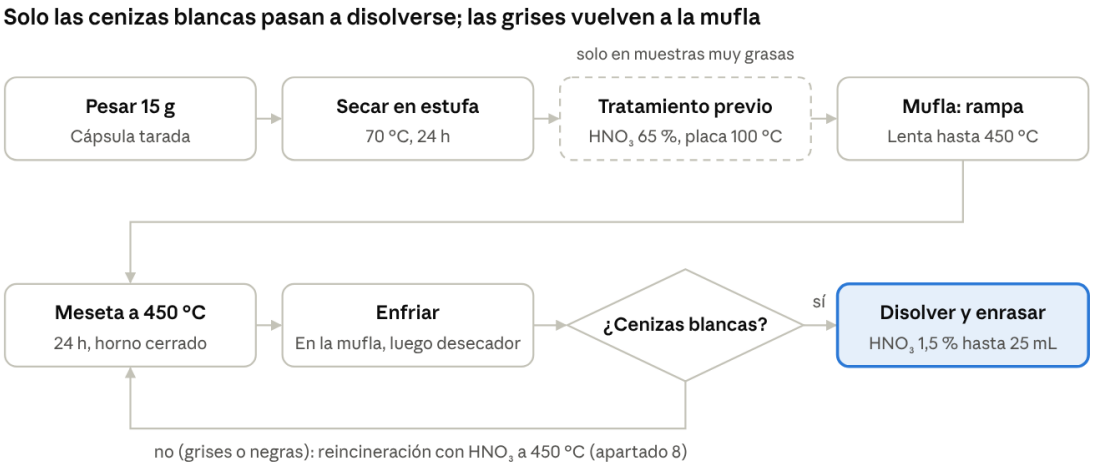


*Figura 1. Secuencia de la incineración y criterio de aceptación de las cenizas.*

**A. Secado**

1. Se pesa la cápsula vacía ($m_0$), se añaden 15 g de muestra y se vuelve a pesar ($m_1$). Cada muestra se analiza por triplicado.
2. Las cápsulas se secan en estufa a **70 °C** durante **24 h**.
3. Se dejan enfriar en desecador y se pesan ($m_2$) para determinar la humedad.

**B. Tratamiento previo con ácido nítrico (solo en muestras muy grasas)**

4. Este paso solo se plantea en muestras con un contenido graso muy elevado que presenten dificultades durante la incineración (combustión con llama, proyecciones o cenizas fundidas y negras). En ese caso, se añaden 2–5 mL de $HNO_3$ 65 % sobre la muestra seca hasta cubrirla y se calienta en placa a **100 °C** hasta la evaporación completa del ácido. En el resto de muestras se pasa directamente a la incineración.

**C. Incineración**

5. Las cápsulas se introducen en la mufla fría, con la puerta cerrada.
6. La temperatura se eleva gradualmente hasta **450 °C**, con una rampa de ≈ 50 °C/h o repartiendo el ascenso en ≈ 24 h, de modo que la muestra se carbonice sin llama.
7. Se mantienen **450 °C durante 24 h** (o hasta la obtención de cenizas blancas), lo que supone ≈ 48 h de permanencia en la mufla.
8. Se apaga el horno y se deja enfriar en su interior hasta < 100 °C; las cápsulas se trasladan al desecador con pinzas.

**D. Comprobación de la ceniza**

9. Si la ceniza es **blanca o gris muy clara**, se continúa con la disolución. Si es **gris oscura o presenta puntos negros**, se reincinera según el apartado 8.

**E. Disolución y enrase**

10. Se añaden a la cápsula unos mililitros de **$HNO_3$ al 1,5 %** y las cenizas se disuelven raspando suavemente con una varilla de plástico.
11. La disolución se filtra a un matraz aforado de **25 mL**; la cápsula y el filtro se lavan con $HNO_3$ 1,5 % y se enrasa.
12. La disolución se transfiere a un frasco de **polipropileno** y se conserva a temperatura ambiente hasta su análisis.

## 7. Programa térmico

El programa térmico es el mismo para todas las muestras: rampa lenta hasta **450 °C** y meseta de **24 h**, con una permanencia total de **≈ 48 h** en la mufla.

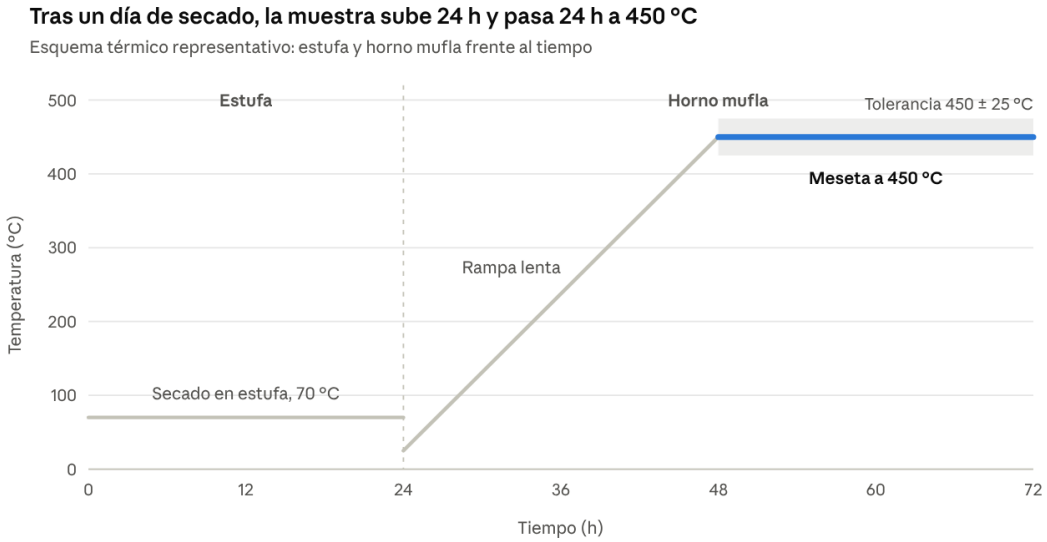


*Figura 2. Esquema térmico (subida dibujada lineal; temperatura inicial de la mufla supuesta 25 °C).*

| Etapa | Condiciones |
|---|---|
| Secado (estufa) | 70 °C, 24 h |
| Subida (mufla) | ≈ 50 °C/h hasta 450 °C (≈ 24 h) |
| Meseta | 450 °C ± 25 °C, 24 h |
| Enfriamiento | Libre, dentro del horno, hasta < 100 °C |

Si una muestra humea o se inflama durante la subida, puede añadirse una meseta intermedia de 2–4 h a 200–250 °C para completar la carbonización antes de continuar el calentamiento. No debe superarse 500 °C, ya que por encima aumentan las pérdidas de Cd y Pb y se forman óxidos de Cr, Fe y Ni difíciles de redisolver.

## 8. Procedimiento de reincineración

La reincineración se aplica cuando, tras la meseta de 24 h a 450 °C, la ceniza no es blanca. La temperatura **no se aumenta**: la oxidación del carbono residual se favorece con unas gotas de $HNO_3$ y la muestra se devuelve a 450 °C durante unas horas.

**Casos en que es necesaria**

- Ceniza gris oscura o negra, o con puntos o núcleos negros.
- Costra blanca en superficie que, al romperse con una varilla, muestra material negro debajo.
- Ceniza fundida o vitrificada con carbono atrapado.

Es más frecuente en muestras con alto contenido en grasa o en azúcares.

**Procedimiento**

1. **Enfriamiento.** Las cápsulas se enfrían en desecador hasta temperatura ambiente. No debe añadirse ácido sobre una ceniza caliente, ya que se producen salpicaduras.
2. **Humectación y disgregación.** En campana, la ceniza se humedece con 0,5–1 mL de agua ultrapura y los grumos y la costra se disgregan con una varilla de plástico, sin extraer material de la cápsula. La varilla se enjuaga dentro de la cápsula con unas gotas de agua.
3. **Adición de ácido.** Se añaden gota a gota **1–2 mL de $HNO_3$ 65 %** hasta empapar toda la ceniza.
4. **Evaporación.** Las cápsulas se calientan en placa a **≈ 100 °C** hasta sequedad completa, evitando la ebullición violenta. No debe quedar líquido, ya que el ácido sin evaporar corroe la mufla.
5. **Retorno a la mufla.** Las cápsulas se introducen con la mufla fría o por debajo de 200 °C y la temperatura se eleva hasta **450 °C** a 50–100 °C/h.
6. **Meseta.** Se mantienen **450 °C entre 4 y 12 h** (habitualmente, durante la noche).
7. **Enfriamiento e inspección.** Tras enfriar dentro de la mufla, las cápsulas se trasladan al desecador y se examina el color de la ceniza.
8. **Repetición.** Si la ceniza continúa gris, se repiten los pasos 1–7. Si tras **tres ciclos** no se obtiene ceniza blanca, se repite el análisis aplicando el tratamiento previo con $HNO_3$ (apartado 6.B) o se recurre a la digestión en microondas.

**Precauciones**

- No se debe superar 450 °C para acelerar el proceso, ya que aumentan las pérdidas de Cd y Pb y se forman óxidos de difícil disolución.
- Todas las réplicas de una misma muestra se reincineran con la misma pauta, aunque solo una presente ceniza gris.
- El número de reincineraciones necesarias se registra en la hoja de cada cápsula.
- Una ceniza blanca con algún punto gris aislado se considera aceptable si se disuelve por completo en $HNO_3$ 1,5 %.

## 9. Seguridad

- La carga y descarga de la mufla se realizan con pinzas largas, guantes térmicos y gafas; la puerta no debe abrirse por encima de ≈ 200 °C.
- La primera fase de la incineración desprende humo, por lo que la mufla debe disponer de extracción o situarse bajo campana.
- No deben introducirse en la mufla cápsulas con ácido sin evaporar: los vapores nítricos corroen la cámara y las resistencias.
- El $HNO_3$ 65 % es corrosivo y oxidante; se manipula en campana con guantes de nitrilo.

- Las cápsulas se enfrían en el desecador sobre una superficie resistente al calor.

## 10. Referencias

[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*, diciembre 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 intermareales 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.