



Biotempo (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

ANALYTICAL DESCRIPTION OF ACIDS FOR CHEMICAL
DIGESTION IN BIOLOGICAL SAMPLES EXPOSED TO METALS
DESCRIPCIÓN ANALÍTICA DE LOS ÁCIDOS PARA LA DIGESTIÓN
QUÍMICA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS EXPUESTAS A METALES

George Argota-Pérez^{1,*} & José Iannacone^{2,3}

¹ Centro de Investigaciones Avanzadas y Formación Superior en Educación, Salud y Medio Ambiente "AMTAWT". Puno, Perú. george.argota@gmail.com

² Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP). Lima, Perú. joseiannacone@gmail.com

³ Escuela Universitaria de Postgrado. Grupo de Investigación Sostenibilidad Ambiental (GISA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM), Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA), Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV). Lima, Perú.

* Corresponding author: george.argota@gmail.com

ABSTRACT

The aim of the study was to describe the analytical concentration of acids for chemical digestion in biological samples exposed to metals. Hydrochloric acid (HCl), nitric acid (HNO₃), perchloric acid (HClO₄), sulfuric acid (H₂SO₄), boric acid (H₃BO₃), phosphoric acid (H₃PO₄) and hydroiodic acid (HI) were analyzed. Experimentally the acids were applied to the gills of the *Gambusia punctata* biomonitor (Poey, 1854) for the bioextraction of cadmium metal. The certified reference sample, DOLT-3 (Dogfish Liver), was used for the analytical reliability of the results. Statistically significant differences were found in the results of acid concentrations and the certified reference value. The order of concentration was: HNO₃ > H₂SO₄ > HClO₄ > HCl > HI > H₃PO₄ > H₃BO₃. It is concluded that acids allow to extract bioaccumulated metals in biological tissues, but their application, not combined with other acids, will differ significantly with the true bioaccumulated value. The highest odds for metal extraction are with HNO₃, H₂SO₄ and HClO₄.

Keywords: acids – digestion – metals – biological tissues – procedure

RESUMEN

El objetivo del estudio fue describir la concentración analítica de los ácidos para la digestión química en muestras biológicas expuestas a metales. Se analizó el ácido clorhídrico (HCl), ácido nítrico (HNO₃), ácido perclórico (HClO₄), ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido bórico (H₃BO₃), ácido fosfórico (H₃PO₄) y el ácido yodhídrico (HI). De forma experimental los ácidos se aplicaron en las branquias del biomonitor *Gambusia punctata* (Poey, 1854) para la bioextracción del metal cadmio. Se usó la muestra de referencia certificada: DOLT-3: (Dogfish Liver) para la confiabilidad analítica de los resultados. Se encontró diferencias estadísticamente significativas en los resultados de las concentraciones de los ácidos

y el valor de referencia certificado. El orden de concentración fue: $\text{HNO}_3 > \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{HClO}_4 > \text{HCl} > \text{HI} > \text{H}_3\text{PO}_4 > \text{H}_3\text{BO}_3$. Se concluye que, los ácidos permiten extraer metales bioacumulados en los tejidos biológicos pero su aplicación no combinada con otros ácidos diferirá significativamente con el verdadero valor bioacumulado. Las mayores probabilidades para la extracción de metales están con el HNO_3 , H_2SO_4 y el HClO_4 .

Palabras clave: ácidos – digestión – metales – tejidos biológicos – procedimiento

INTRODUCCIÓN

Una de las preocupaciones sobre los metales pesados (MP) es su rápida acumulación en los tejidos biológicos (Dalzochio & Gehlen, 2016; Alegre *et al.*, 2018). Ante la biodisponibilidad de los MP (Moreno *et al.*, 2018) y su ecotoxicidad (Huang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020) existe la tendencia en los estudios ambientales que éstos puedan basarse en las fracciones extraíbles y reducibles por ser las secuenciales de relevancia potencialmente tóxicas (Tessier *et al.*, 1979; Huang *et al.*, 2007; Zhai *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2018).

Diversos autores recomiendan para el tratamiento y para la bioextracción de los MP la digestión ácida (Ahmed *et al.*, 2015; Lo *et al.*, 2017; Binder *et al.*, 2018), aunque en múltiples ocasiones se genera la incertidumbre analítica para reconocer, cuál podría resultar más favorable según el tipo de ácido y quizás, exista un conocimiento limitado sobre las características de los ácidos que influya en la toma de decisiones (Argota *et al.*, 2018).

El objetivo del estudio fue describir la analítica de los ácidos para la digestión química en muestras biológicas expuestas a metales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó el ácido clorhídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3), ácido perclórico (HClO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido bórico (H_3BO_3), ácido fosfórico (H_3PO_4) y el ácido yodhídrico (HI). De forma experimental los ácidos se aplicaron en las branquias del biomonitor *Gambusia punctata* (Poey, 1854) (Poey, 1854; Argota *et al.*, 2013) para la bioextracción del cadmio (Akinyele & Shokunbi, 2015).

Se usó la muestra de referencia certificada: DOLT-3: Dogfish Liver (Tabla 1) para la confiabilidad analítica de los resultados (Lavilla *et al.*, 2008).

Tabla 1. Valor certificado / muestra de referencia ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

DOLT-3 (Dogfish Liver)	
Réplicas	11
Valor de referencia	19,04±0,6

Las cuantificación se realizó mediante la técnica Espectrometría de Emisión Atómica por Plasma Inductivamente Acoplado con vista axial (ICP-AES) dada sus bondades analíticas (Galvao *et al.*, 2016).

Se utilizó el programa estadístico profesional Statgraphics Centurion 18 para el tratamiento de los datos. La prueba de normalidad (distribución normal de Gauss) para cada concentración de ácido (mediciones por triplicado) fue mediante el test de bondad de ajuste (distribución del estadístico de Kolmogorov-Smirnov). Para diferenciar los promedios de grupos se utilizó la prueba de contraste múltiple de rango a través del Test de Bonferroni (Montgomery, 2004). Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

Aspectos éticos

Se consideró para la bioética del estudio, aplicar la eutanasia mediante hipotermia inmediata, inhibiéndose la función biológica, para luego, realizarse la disección y extracción de las branquias.

RESULTADOS

La tabla 2 muestra los resultados de las concentraciones de cadmio en las branquias de la especie *G. punctata* para los diferentes ácidos de forma comparada con el valor de referencia certificada donde hubo diferencias estadísticamente significativas ($F = 15,93 / P = 0,000$).

Tabla 2. Concentraciones (mg.kg⁻¹) / cadmio / ácidos / valor referencial.

Nº	Ácido	DOLT-3 (Dogfish Liver)	Valor de referencia certificada
1	HCl	11,54±1,17	
2	HNO ₃	15,48±1,19	
3	HClO ₄	14,94±0,92	
4	H ₂ SO ₄	15,14±0,73	19,04±0,6
5	H ₃ BO ₃	11,17±1,48	
6	H ₃ PO ₄	11,23±0,26	
7	HI	11,27±1,42	

La tabla 3 muestra la prueba de contraste múltiple de rango donde fueron homogéneas las concentraciones del

HClO₄, H₂SO₄ y el HNO₃ siendo sus valores próximos a la referencia.

Tabla 3. Prueba de contraste múltiple de rango (Bonferroni) / homogeneidad / letras = homogeneidad entre grupos.

Ácido	Media	Grupos Homogéneos
H ₃ BO ₃	11,17	a
H ₃ PO ₄	11,23	a
HI	11,27	a
HCl	11,54	a
HClO ₄	14,94	b
H ₂ SO ₄	15,47	b
HNO ₃	15,48	b
Valor de referencia certificada	19,16	c

DISCUSIÓN

La biodisponibilidad, es la interacción entre elementos disponibles y el sistema biológico (Marcato *et al.*, 2009) siendo muy difícil considerar una biodisponibilidad precisa por la variación de los oligoelementos dentro de un sistema de digestión y el tipo de tecnología que se dispone (Cai *et al.*, 2018). Como resultado, se observa inconsistencia histórica en los protocolos de digestión y la cuantificación de los metales para las muestras biológicas (Frame & Uzgiris, 1998; Chamberlain & Adams, 2000; Moor & Lymberopoulou, 2001; Gaudino *et al.*, 2007; Begum *et al.*, 2007; Ashoka *et al.*, 2009; Binder *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2019; Qui *et al.*, 2020; Mohamed *et al.*, 2020).

En este estudio se observó que, el orden de concentración para la extracción del cadmio fue: HNO₃ > H₂SO₄ > HClO₄ > HCl > HI > H₃PO₄ > H₃BO₃, donde la digestión de las muestras con ácidos de forma individual, no muestra seguridad para la cuantificación biodisponible del metal, pues sus concentraciones fueron significativa-

mente diferentes con el valor de la muestra de referencia certificada (Lavilla *et al.*, 2008).

Lachas *et al.*, (1999), Hseu (2004) y Mina *et al.*, (2019) señalan que el HNO₃ ofrece una digestión completa aunque no se corroboró en este estudio. Otros autores indicaron para una mejor digestión que se utilice el HNO₃ con H₂O₂, HNO₃-HCl y el HF (Sastre *et al.*, 2002; Xua *et al.*, 2005).

El uso de ácidos garantiza para la rapidez y recuperación de los metales, además, de buscarse su precisión de concentración analítica (Pontes *et al.*, 2010) donde se emplea incluso con reactivos químicos en varias etapas o pasos de extracción secuencial intentando aumentarse el potencial de oxidación-reducción sobre la materia (Ramanathan & Ting, 2015).

En un estudio sobre la composición macro-elemental de plantas de lechuga estresadas con cadmio que se cultivó en condiciones de nutrición intensiva de azufre la diges-

ción ácida que se utilizó fue el $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (Matraszek *et al.*, 2016). En otro estudio que refirió al silicio como regulador transcripcional de azufre y ácido ascórbico para el retraso de la senescencia de la hoja en cebada bajo deficiencia combinada de azufre y estrés osmótico, la combinación de ácido que se usó fue el HNO_3 y H_2O_2 (Maillard *et al.*, 2018).

Durante un reporte en el año 1959 sobre la oxidación húmeda del hueso la digestión que se utilizó fue H_2SO_4 con adición de perclorato de dioxonio (Smith & Diehl, 1959). Finalmente, un estudio que se realizó antes de la determinación de mercurio en alimentos y materiales biológicos mediante la técnica de absorción atómica de vapor frío se evaluaron diez métodos de digestión donde las mezclas fueron las siguientes: $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$, $\text{HNO}_3\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$, $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$, $\text{HNO}_3\text{-H}_3\text{PO}_4$, persulfato- HNO_3 , $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3\text{-H}_3\text{PO}_4$, dicromato- $\text{HNO}_3\text{-H}_3\text{PO}_4$, $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$ -permanganato de sodio e hidroxilamina y dos condiciones de adición de HNO_3 concentrado (Burguera & Burguera, 1998).

Muy escasos son los reportes en la literatura científica que refieren el uso de ácido bórico (H_3BO_3), ácido perclórico (H_3PO_4) y el ácido yodhídrico (HI) para la extracción de metales en tejidos biológicos (Kerlin *et al.*, 2015; Aldgini *et al.*, 2019, Cuia *et al.*, 2019; Safi *et al.*, 2020) siendo en este estudio sus concentraciones muy dispersas con relación al valor de referencia certificado ($19,04 \pm 0,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Lavilla *et al.*, 2008).

La principal limitación del estudio fue no evaluar la concentración de otros metales mediante la comparación con otras muestras de referencias certificadas.

Se concluye que, los ácidos permiten extraer metales bioacumulados en los tejidos biológicos pero su aplicación no combinada con otros ácidos diferirá significativamente con el verdadero valor bioacumulado. Las mayores probabilidades para la extracción de metales están con el ácido nítrico, ácido sulfúrico y el ácido perclórico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, M.K.; Shaheen, N.; Islam, M.S.; Habibullah Mamun, M.; Islam, S.; Mohiduzzaman, M. & Bhattacharjee, L. 2015. Dietary intake of trace elements from highly consumed cultured fish (*Labeo rohita*, *Pangasius pangasius* and *Oreochromis mossambicus*) and human health risk implications in Bangladesh. *Chemosphere*, 128: 284-292.
- Akinyele, I.O. & Shokunbi, O.S. 2015. Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for the determination of trace and heavy metals in food samples. *Food Chemistry*, 173: 682-684.
- Aldgini, H.M.M.; Al-Abbadi, A.A.; Abu-Nameh, E.S.M. & Alghazeer, R.O. 2019. Determination of metals as bio indicators in some selected bee pollen samples from Jordan. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26: 1418-1422.
- Alegre, A.; Bonifaz, E.; Lee, S.E.S.; Alvarino, L. & José Iannacone. 2018. Monitoreo ecotoxicológico de una cuenca en Huancavélica, Perú afectada por metales pesados. *Revista electrónica de Veterinaria*, 19: 1-14.
- Argota, P.G., Iannacone, O.J. & Fimia, D.R. 2013. Características de *Gambusia punctata* (Poeciliidae) para su selección como biomonitor en ecotoxicología acuática en Cuba. *The Biologist* (Lima), 11: 229-236.
- Argota, C.H.; Argota, P.G.; Iannacone, O. & Fimia, D.R. 2018. Optimización ácida para la bioextracción ecotoxicológica de metales en órganos diana. *Biotempo*, 15: 133-137.
- Ashoka, S.; Peake, B.M.; Bremner, G.; Hageman, K.J. & Reid, M.R. 2009. Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues. *Analytica Chimica Acta*, 653: 191-199.
- Begum, Z.; Balaram, V.; Ahmad, S.M. Satyanarayanan, M. 2007. Determination of trace and rare earth elements in marine sediment reference materials by ICP-MS: comparison of open and closed acid digestion methods. *Atomic Spectroscopy - Norwalk Connecticut*, 28: 41.
- Binder, G.A.; Metcalf, R.; Atlas, Z. & Daniel, H.G. 2018. Evaluation of digestion methods for analysis of trace metals in mammalian tissues and NIST 1577c. *Analytical Biochemistry*, 543: 37-42.
- Burguera, J.L. & Burguera, M. 1988. Evaluation of ten digestion methods for use prior to mercury determination. *Journal of Food Composition Analysis*, 1: 159-165.
- Cai, Y.; Wang, J.; Zhao, Y.; Zhao, X.; Zheng, Z.; Wen, B.; Ciu, Z. & Wang, X. 2018. A new perspective

- of using sequential extraction: To predict the deficiency of trace elements during anaerobic digestion. *Water Research*, 140: 335-343.
- Chamberlain, K.I. & Adams, S.L. 2000. ICP-MS determination of trace elements in fish, *Atomic Spectroscopy - Norwalk Connecticut*, 21: 118-122.
- Cuia, Y.; Chena, F. & Yin, X.B. 2019. A ratiometric fluorescence platform based on boric-acid-functional Eu-MOF for sensitive detection of H₂O₂ and glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, 135: 208-215.
- Dalzochio, T. & Gehlen, G. 2016. Confounding factors in biomonitoring using fish. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 11: 53-61.
- Frame, E.M. & Uzgiris, E.E. 1998. Gadolinium determination in tissue samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in evaluation of the action of magnetic resonance imaging contrast agents. *Analyst*, 123: 675-679.
- Galvao, N.C.; Almeida, B.M.; Galvao, P.E.; Pinto dos Santos, A.M.; Lago da Silva, R.I. & Neto, J.H.S. 2016. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). *Microchemical Journal*, 128: 331-346.
- Gaudino, S.; Galas, C.; Belli, M.; Barbizzi, S., de Zorzi, P.; Jaćimović, R.; Jeran, Z. & Sansone, U. 2007. The role of different soil sample digestion methods on trace elements analysis: a comparison of ICP-MS and INAA measurement results. *Accreditation and Quality Assurance*, 12: 84-93.
- Hseu, Z.Y. 2004. Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. *Bioresource Technology*, 95: 53-59.
- Huang, S.J.; Chang, C.Y.; do Mui, T.; Chang, F.C.; Lee, M.Y. & Wang, C.F. 2007. Sequential extraction for evaluating the leaching behavior of selected elements in municipal solid waste incineration fly ash. *Journal of Hazardous Materials*. 149: 180-188.
- Huang, R.; Zhang, B.; Saad, E.M.; Ingall, E.D. & Tang, Y. 2018. Speciation evolution of zinc and copper during pyrolysis and hydrothermal carbonization treatments of sewage sludges. *Water Research*, 132: 260-269.
- Jin, J.; Li, Y.; Zhang, J.; Wu, S.; Cao, Y.; Liang, P.; Zhang, J.; Wong, M.; Wang, M.; Shan, S. & Christie, P. 2016. Influence of pyrolysis temperature on properties and environmental safety of heavy metals in biochars derived from municipal sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 320: 417-426.
- Kerlin, W.M.; Poineau, F.; Forster, P.M.; Czerwinski, K.R. & Sattelberger, A.P. 2015. Hydrothermal synthesis and solid-state structures of polynuclear technetium iodide compounds. *Inorganica Chimica Acta*, 424: 329-335.
- Lachas, H.; Richaud, R.; Herodees, A.A.; Dugwell, D.R.; Kandiyoti, R. & Jarvis, K.E. 1999. Determination of 17 trace elements in coal and ash reference materials by ICP-MS applied to milligram sample sizes. *Analyst*, 124: 177.
- Lavilla, I.; Vilas, P. & Bendicho, C. 2008. Fast determination of arsenic, selenium, nickel and vanadium in fish and shellfish by electrothermal atomic absorption spectrometry following ultrasound-assisted extraction. *Food Chemistry*, 106: 403-409.
- Li, S.; Zou, D.; Li, L.; Wu, L.; Liu, F.; Zeng, X.; Wang, H.; Zhu, Y. & Xiao, Z. 2020. Evolution of heavy metals during thermal treatment of manure: A critical review and outlooks. *Chemosphere*, 247: 1-13.
- Lo, D.Ma.G.; Galvano, E.; Dugo, G.; D'ascenzi, C.; Macaluso, A.; Vella, A.; Giangrosso, G.; Cammilleri, G. & Ferrantelli, V. 2018. Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food Chemistry*, 245: 1163-1168.
- Maillard, A.; Ali, N.; Schwarzenberg, A.; Jamois, F.; Yvin, J.C. & Hosseini, S.A. 2018. Silicon transcriptionally regulates sulfur and ABA metabolism and delays leaf senescence in barley under combined sulfur deficiency and osmotic stress. *Environmental and Experimental Botany*, 155: 394-410.

- Marcato, C.; Pinelli, E.; Cecchi, M.; Winterton, P. & Guiresse, M. 2009. Bioavailability of Cu and Zn in raw and anaerobically digested pig slurry. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 72: 1538-1544.
- Matraszek, R.; Hawrylak, N.B.; Chwil, S. & Chwil, M. 2016. Composición macroelemental de plantas de lechuga estresadas con cadmio cultivadas en condiciones de nutrición intensiva con azufre. *Journal of Environmental Management*, 180: 24-34.
- Mina, R.; Alves, J.; Alves da Silva, A.; Natal da Luz, T.; Cabral, J.A.; Barros, P.; Topping, C.J. & Sousa, J.P. 2019. Wing membrane and fur samples as reliable biological matrices to measure bioaccumulation of metals and metalloids in bats. *Environmental Pollution*, 253: 199-206.
- Mohamed, R.; Zainudin, B.H. & Syukor, Y.S. 2020. Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 303: 1-6.
- Montgomery, D.C. 2004. *Diseño y análisis de experimentos*. 3^{ra} ed. Ed. Félix Varela. La Habana, Cuba.
- Moor, T.C. & Lymberopoulou, V.J. 2001. Dietrich, Determination of heavy metals in soils, sediments and geological materials by ICP-AES and ICP-MS. *Microchimica Acta*, 136: 123-128.
- Moreno, A.S.A.; Gomes, C.P. & Bianchini, A. 2018. Metal accumulation and expression of genes encoding for metallothionein and copper transporters in a chronically exposed wild population of the fish *Hyphessobrycon luetkenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 211: 25-31.
- Pereira, S.B.; Bitobrovec, A.; Mendes, H.A.C.; Picada, P.R.; Los Weinert, P.; Egéa dos Anjos, V. 2019. In vitro bioaccessibility of Al, Cu, Cd, and Pb following simulated gastrointestinal digestion and total content of these metals in different Brazilian brands of yerba mate tea. *Food Chemistry*, 281: 285-293.
- Poey, F. 1854. Los guajacones, pececillos de agua dulce. *Memorias de la Historia Natural de la Isla de Cuba*, 1: 374-390.
- Pontes, F.V.; Mendes, B.A.; de Souza, E.M.; Ferreira, F.N.; da Silva, L.I.; Carneiro, M.C.; Monteiro, M.I.; de Almeida, M.D.; Neto, A.A.; & Vaitsman, D.S. 2010. Determination of metals in coal fly ashes using ultrasound-assisted digestion followed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analytical Chemical Acta*, 659: 55-59.
- Qiu, Y.; Frear, C.; Chen, S.; Ndegwa, P.; Harrison, J.; Yao, Y. & Ma, J. 2020. Accumulation of long-chain fatty acids from *Nannochloropsis salina* enhanced by breaking microalgae cell wall under alkaline digestion. *Renewable Energy*, 149: 691-700.
- Ramanathan, T. & Ting, Y.P. 2015. Selección de métodos de digestión húmeda para la cuantificación de metales en desechos sólidos peligrosos. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3: 1459-1467.
- Safi, K.; Kant, K.; Bramhecha, I.; Mathur, P. & Sheikh, J. 2020. Multifunctional modification of cotton using layer-by-layer finishing with chitosan, sodium lignin sulphonate and boric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158: 903-910.
- Sastre, J.; Sauquillo, A.; Vidal, M. & Rauret, M. 2002. Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Analytical Chemical Acta*, 462: 59-72.
- Smith, G. & Diehl, H. 1959. The wet oxidation of bone: Digestion with 100 per cent sulphuric acid followed by the addition of dioxonium perchlorate. *Talanta*, 3: 41-46.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C. & Bisson, M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51: 844-851.
- Xua, Y.H.; Iwashitab, A.; Nakajimab, T.; Yamashitab, H.; Takanashib, H. & Ohki, A. 2005. Effect of HF addition on the microwave-assisted acid-digestion for the determination of metals in coal by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Talanta*, 66: 58-64.
- Zeng, X.; Xiao, Z.; Zhang, G.; Wang, A.; Li, Z.; Liu,

- Y.; Whuan, H.; Zeng, Q.; Liang, Y. & Zou, D. 2018. Speciation and bioavailability of heavy metals in pyrolytic biochar of swine and goat manures. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 132: 82-93.
- Zhai, Y.; Chen, H.; Xu, B.; Xiang, B.; Chen, Z.; Li, C. & Zeng, G. 2014. Influence of sewage sludge-based activated carbon and temperature on the liquefaction of sewage sludge: yield and composition of bio-oil, immobilization and risk assessment of heavy metals. *Bioresource Technology*, 159: 72-79.
- Zhang, L.; Shang, Z.; Guo, K.; Chang, Z.; Liu, H. & Li, D. 2019. Speciation analysis and speciation transformation of heavy metal ions in passivation process with thiol-functionalized nano-silica. *Chemical Engineering Journal*, 369: 979-987.
- Received, April 22, 2020.
Accepted, May 25, 2020.