

DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO EM AMOSTRAS DE URINA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VÍSEL

LUANA FERREIRA DE LIMA¹; TAINA FERNANDA BARBOSA NUNES²; MILENE MARQUES FREITAS³; CARLA DE ANDRADE HARTWIG⁴; DIOGO LA ROSA NOVO⁵.

¹Universidade Federal de Pelotas - luanaferreira33@live.com

²Universidade Federal de Pelotas – tainafnunes@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – milene.freitas-@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – carlahartwig@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas - diogo.la.rosa@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O fósforo urinário é um importante indicador da função renal e do equilíbrio de fósforo no organismo (MCCLURE et al., 2019), visto que a quantidade excretada na urina pode refletir tanto a ingestão dietética quanto na eficiência da sua reabsorção renal. Em condições normais, os rins reabsorvem a maior parte do fósforo filtrado, mas em situações como insuficiência renal ou desregulação hormonal (por exemplo, no hiperparatireodismo), a excreção de fósforo na urina pode aumentar significativamente (MCCLURE et al., 2019). Além disso, essa excreção também é usada para avaliar o risco de doenças ósseas e cardiovasculares, especialmente em pacientes com doença renal crônica (DRC), e a deficiência na quantidade de fósforo é chamada de hipofosfatemia (GOLD ANALISA, 2022). Na literatura encontram-se como valores de referência de fósforo na urina a faixa de 26,15 mg/dL a 76,9 mg/dL (GOLD ANALISA, 2022). Os Métodos analíticos visando na quantificação de fósforo na urina vêm ganhando bastante espaço e importância nas áreas das ciências.

Dentre as estratégias analíticas, destaca-se a espectrofotometria UV-Vis, por sua versatilidade, adequação a diversas aplicações, baixo custo e robustez (MENDONÇA, 2013). Outras técnicas espectrométricas com plasma e cromatográficas possuem elevado custo de aquisição e manutenção para laboratórios de rotina (SHYLA et al., 2011). A determinação de fósforo por espectrofotometria UV-Vis pode ser realizada pela utilização de molibdovanadato e molibdato de amônio, além de agentes redutores, como o cloreto de estanho (II), ácido ascórbico, sulfato de hidrazina e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico (GANESH et al., 2012). O ácido ascórbico é frequentemente utilizado para reduzir íons de molibdênio [Mo (VI)] a molibdênio azul [Mo (V)], que forma um complexo colorido com o fosfato para ser quantificado em comprimento de onda adequado pela absorção da molécula e intensidade da cor proporcional à concentração de fosfato disponível (GANESH et al., 2012). Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a determinação do fósforo na forma de fosfato utilizando a espectrofotometria UV/Vis.

2. METODOLOGIA

Primeiramente, os reagentes necessários para formar o complexo com o fosfato foram preparados utilizando molibdato de amônio-tartarato de antimônio e potássio a partir de 0,8 g de molibdato de amônio e 0,2 g de tartarato de antimônio e potássio que foram diluídos em 1000 mL de água destilada. O ácido sulfúrico foi preparado adicionando lentamente em 600 mL de água destilada à quantidade de

310 mL de H_2SO_4 concentrado diluído em 1000 mL. Por fim, o ácido ascórbico foi preparado em menor volume devido à sua instabilidade de apenas duas semanas, utilizando 3 g de ácido ascórbico dissolvido em 40 mL de água destilada; adição de 0,1 mL de acetona, diluídos em 50 mL. A solução padrão de fósforo de 100 mg/L foi preparada dissolvendo 0,0451 g de fosfato de potássio (KH_2PO_4) em 20 mL de água destilada, adição de 0,3 mL de ácido sulfúrico concentrado, diluídos em 100 mL.

As soluções padrão e urina foram analisadas adicionando 200 μL de ácido sulfúrico na concentração de 11 mol/L, 800 μL da solução de molibdato de amônia ($6,85 \cdot 10^{-4}$ mol/L)-tartarato de antimônio e potássio ($3,26 \cdot 10^{-4}$ mol/L), e 400 μL de ácido ascórbico na concentração de 0,34 mol/L, em tubos Falcon de 10 mL. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis (UV-M51, BEL Photonics, Itália). Inicialmente, uma varredura foi realizada para determinar o comprimento de onda de maior absorção para o complexo de fosfato, variando de 200 nm até 1000 nm em intervalos de 1 nm. O estudo de linearidade e faixa de trabalho foi realizado com as soluções padrão de 0,01 mg/L até 10 mg/L em tubos Falcon de 10 mL. A exatidão foi avaliada através de ensaios de diluição, ensaios de recuperação e comparação dos resultados de uma curva de calibração externa e uma curva de calibração interna. O método foi aplicado para amostras de urinas, coletadas voluntariamente, por 30 doadores residentes na cidade de Pelotas-RS. A doação foi realizada com a coleta da primeira urina da manhã, descartando o primeiro jato. As amostras foram armazenadas em geladeira e as atividades realizadas estão de acordo com o projeto aprovado pelo conselho de ética em pesquisa da faculdade de medicina da UFPel sobre o parecer de número 6.586.309.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A varredura, conforme pode ser observado na Figura 1, revelou o comprimento de 890 nm com o pico de maior absorbância para a determinação de fósforo. A absorbância foi proporcional ao aumento da concentração de fósforo e não apresentou interferências da matriz da urina. A linearidade foi avaliada pela construção da curva de calibração variando de 0,01 mg/L até 10 mg/L, conforme apresentado na Figura 2. Concentrações de fósforo inferiores a 0,01 mg/L resultaram em absorbâncias negativas para o complexo de fósforo. Sete pontos foram considerados para a calibração na menor faixa de concentração (coeficiente linear maior que 0,9953) para a faixa de trabalho foi de 0,01 mg/L até 0,5 mg/L.

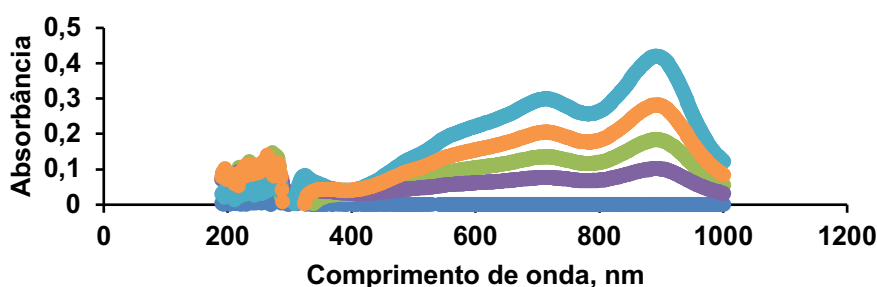


Figura 1. Varredura para solução padrão (—) 0,1 mg L⁻¹, (—) 0,5 mg L⁻¹, (—) amostra urina, (—) amostra de urina com adição de 0,5 mg L⁻¹ e (—) apenas água.

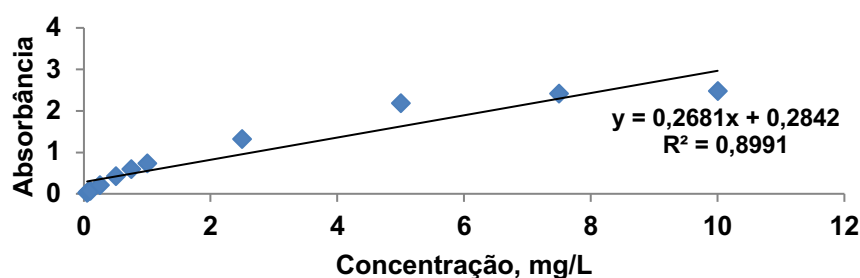


Figura 2. Linearidade variando de 0,01 mg/L até 10 mg/L.

O passo seguinte foi a determinação do fator de diluição necessário para a determinação da concentração de fósforo em urina. A concentração determinada deve seguir a faixa intermediária da curva de calibração previamente estabelecida (0,01 mg/L até 0,5 mg/L). As diluições adequadas foram entre 2000 e 10000 vezes. Os valores de absorbância foram comparados a curva de calibração, permitindo a determinação da concentração de fósforo em cada urina. As concentrações para uma amostra selecionada aleatoriamente foram concordantes em diferentes fatores de diluição 729 ± 5 mg/L (2000 vezes), 772 ± 8 mg/L (4000 vezes) e 776 ± 15 mg/L (10000 vezes) e a curva de diluição pode ser considerada linear (coeficiente linear próximo de 1), conforme apresentado na Figura 3.

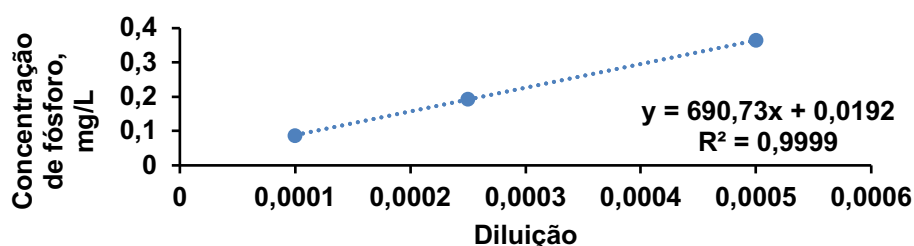


Figura 3. Curva de diluição 2000 até 10000 vezes.

A exatidão também foi avaliada pela comparação dos resultados de curvas de calibração externa e interna. A Figura 4, apresenta a comparação do coeficiente linear (0,9992 versus 0,9995) e *slope* (0,8115 versus 0,9256) referente a esta avaliação, e a proximidade entre as curvas indicam que a matriz da urina não interfere nas análises. A exatidão dos resultados também foi avaliada por meio de um teste de recuperação, no qual concentrações conhecidas do analito foram adicionadas na amostra em três níveis de concentração: 100%, 50%, 25%. Os resultados mostraram recuperações entre 89 e 91% para os três níveis de adição.

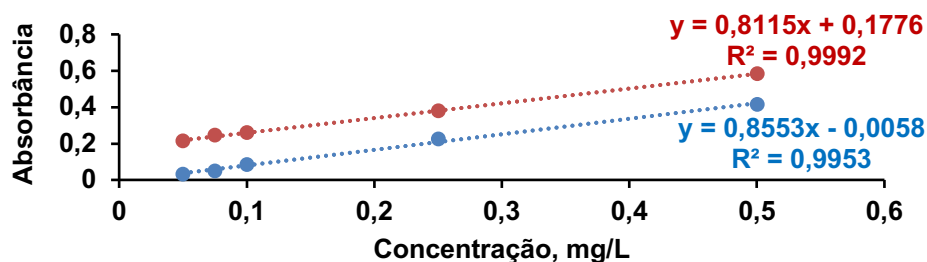


Figura 4. Curva de calibração (—) externa e (—) interna.

Após as avaliações, 30 urinas de doadores voluntários foram analisadas. A concentração de fósforo variou de 21,8 até 181,8 mg/dL (9 amostras entre 20 e 50 mg/dL, 11 amostras entre 50 e 100 mg/dL, 4 amostras entre 100 e 150 mg/dL e 6 amostras entre 150 e 200 mg/dL). O desvio padrão relativo para a concentração de fósforo nas amostras foi sempre inferior a 12%. Vale mencionar que esses resultados podem estar relacionados com diferentes motivos como hábitos alimentares ou até mesmo alguma patologia, mas o estado clínico dos voluntários não foi considerado (MCCLURE et al., 2019). Vale destacar que o método proposto foi adequado para a quantificação de fósforo em todas as amostras analisadas.

4. CONCLUSÕES

A espectrofotometria UV-Vis foi adequado para a determinação de fósforo em urina, sendo alternativa viável para o controle da concentração deste elemento em amostras de urina com precisão e exatidão. A determinação de fósforo na urina é importante como indicador da função renal e do seu equilíbrio no organismo. Vale mencionar que a iniciação científica é de extrema importância para a formação acadêmica e profissional, oferecendo oportunidades para desenvolver habilidades críticas, metodológicas e criativas, além de aprofundar o conhecimento e preparar para a pós-graduação, carreira acadêmica e mercado de trabalho. Os autores expressam sua gratidão à CAPES, CNPQ e FAPERGS (EDITAL 14/2022 ARD) pelo apoio financeiro para execução do projeto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GANESH S.; KHAN F.; AHMED M.K.; VELAVENDAN P.; PANDEY N.K.; KAMACHI MUDALI U.; Spectrophotometric determination of trace amounts of phosphate in water and soil. **a Journal of the International Association on Water Pollution Research**, Índia, v.66, n.12, p-2653-2658, 2012.

GOLD ANALISA. **Kit para determinação de fosfato inorgânico por metodologia ultravioleta – Catálogo nº 412**. São Paulo, maio, 2022. Especiais. Acessado em 02 de setembro de 2024. Online. Disponível em <https://www.goldanalisa.com.br/images/upload/f8f629780c736ca24464108bab8ea29a024c44bc46d7cbb60f8522cdb9c1ce33.pdf>

MENDONÇA, F. **Avaliação dos métodos colorimétrico e espectrométrico (ICP-OES) na determinação de fósforo total em amostras ambientais**. 2013. 20f. Tese de trabalho de conclusão de curso – Curso Bacharelado em Química, Universidade Federal do ABC.

MCCLURE S.T.; REBHOLZ C.M.; PHILLIPS K.M.; CHAMPAGNE C.M.; SELVIN E.; APPEL L.J. The percentage of dietary phosphorus excreted in the urine varies by dietary pattern in a randomized feeding study in adults. **The Journal of Nutrition**, v.149, n.5, p.816-823, 2019.

SHYLA B.; MAHADEVIAIAH, G.; NAGENDRAPPA. A simple spectrophotometric method for the determination of phosphate in soil, detergents, water, bone and food samples through the formation of phosphomolybdate complex followed by its reduction with thiourea. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy (SAA)**, Índia, v. 78, n.1, p.497-502, 2011.