

## AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATO EM URINA VIA ANÁLISE DIRETA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VÍSIVEL

**TAINA FERNANDA BARBOSA NUNES<sup>1</sup>; LUANA FERREIRA DE LIMA<sup>2</sup>; MILENE MARQUES FREITAS<sup>3</sup>; CARLA DE ANDRADE HARTWIG<sup>4</sup>;  
DIOGO LA ROSA NOVO<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – tainafnunes@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – luanaferreira33@live.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – milene.freitas-@hotmail.com*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas – carlahartwig@yahoo.com.br*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – diogo.la.rosa@hotmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

Amostras biológicas coletadas de organismos vivos podem indicar a presença ou ausência de elementos químicos no organismo (Lomba *et al*, 2023). A urina é uma amostra biológica com uma grande janela de detecção e permanência de metabólitos, menos complexa, e, quando obtida por coleta, visa ser menos invasiva que o sangue (Pelição; Pissinate; Martinis, 2018). Dentre os elementos que podem ser monitorados na urina, o fósforo é um mineral essencial, presente em elevadas proporções no esqueleto (Widmaier; Raff; Strang, 2024). Desempenha funções intra e extracelulares, essencial na contratilidade muscular, função neurológica, transporte de eletrólitos e transporte de oxigênio pela hemoglobina (Mcpherson; Pincus, 2012).

Além disso, o fósforo é eliminado na urina na forma de fosfato urinário e varia de acordo com idade, massa muscular, função renal, atividade do hormônio da paratireoide, hora do dia, ingestão dietética e outros fatores. O intervalo de referência para o fósforo na forma de fosfato urinário em uma dieta não restrita é de 0,4 até 1,3 g/dia. A hipofosfatemia refere-se à deficiência de fósforo no organismo em concentrações inferiores ao valor de referência e prejudica a formação de adenosina trifosfato, glicólise e função celular. A hiperfosfatemia refere-se ao excesso de fósforo no organismo correlacionada a incapacidade de excreção dos rins, relacionando hipoparatireoidismo, rabdomiólise ou doença renal crônica (Burtis; Bruns, 2016).

A espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) pode ser uma alternativa para a determinação de fosfato em urina, baseada na absorção da luz emitida por um complexo de fosfomolibdato formado pela reação do fosfato com o molibdato em meio ácido sendo reduzido com adição de agentes redutores, como o cloreto de estanho (II), ácido ascórbico, sulfato de hidrazina e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico para o azul de molibdênio medido no comprimento de onda entre 600 e 900 nm ou ainda pela reação do fosfato com molibdato e vanadato formando ácido vanadomolibdofosfórico medido diretamente no comprimento de onda entre 350 e 400 nm (Burtis; Bruns, 2016). A espectrofotometria UV-Vis merece destaque pela robustez, aplicabilidade, baixo custo, confiabilidade e rapidez, comparada com outras técnicas de determinação (Burtis; Bruns, 2016).

Assim, diante do apresentado, o objetivo desta pesquisa é avaliar a determinação de fosfato em urina via análise direta por espectrofotometria UV-Vis pela formação do ácido vanadomolibdofosfórico. Nesta avaliação foram considerados fatores de sensibilidade, exatidão e precisão, para posteriormente

aplicar esses métodos na quantificação de fósforo em amostras de urina utilizando a técnica de espectrofotometria UV-Vis.

## 2. METODOLOGIA

Inicialmente, a estratégia mais adequada para a quantificação de fosfato por espectrofotometria UV-Vis via ácido vanadomolibdofosfórico foi avaliada com os seguintes reagentes: padrão de fósforo 100 mg/L dissolvendo 0,0451 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 20 mL de água destilada no volume final de 100 mL com adição de 0,3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p.a.; molibdato de amônio 5% dissolvendo 5,0008 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  em 30 mL de água destilada quente, filtrando na temperatura ambiente a volume final de 100 mL; vanadato de sódio 0,25% ou metavanadato de amônio 0,25% dissolvendo 0,4004 g  $\text{NaVO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ou 0,2505 g de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  em 50 mL de água destilada quente, aferido a volume final de 100 mL com adição de 35 mL de  $\text{HNO}_3$  p.a. As análises foram realizadas adicionando à amostra ou ao padrão 0,2 mL de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  5% e 0,2 mL de  $\text{NaVO}_3$  0,25% ou  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  0,25% em 10 mL. A quantificação foi realizada 5 min após homogeneização em espectrofotômetro UV-Vis (UV-M51, BEL Photonics, Itália). As varreduras foram realizadas para determinar o comprimento de onda de maior absorção e após a determinação do comprimento de onda mais adequado, um estudo de linearidade e faixa de trabalho foi realizado com as concentrações de 0,01 mg/L a 10,0 mg/L de fósforo. A existência de interferência de matriz foi avaliada através da varredura dos reagentes. As amostras de urina 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, parecer de número 6.586.309.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a varredura para o ácido vanadomolibdofosfórico formado pela mistura de fósforo com  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  5% e a)  $\text{NaVO}_3$  0,25% ou b)  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  0,25%. Ambos apresentaram pico máximo de absorbância em comprimento de onda entre 320-330 nm. Entretanto, a utilização de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  resultou em maior intensidade de sinal, impactando na sensibilidade do método.

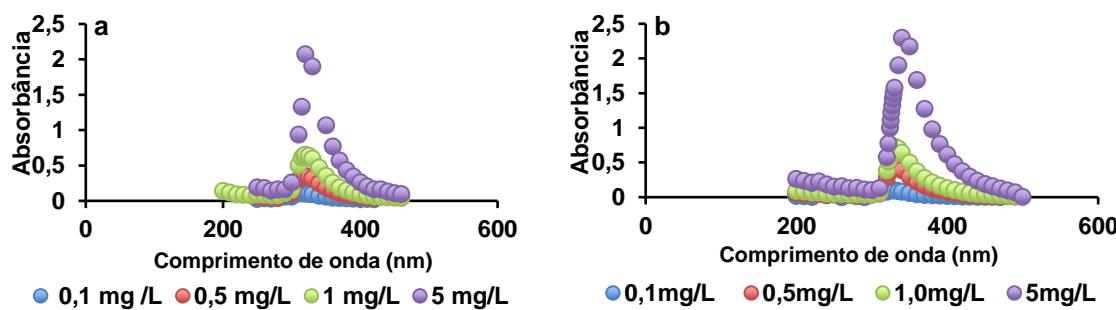


Figura 1. Varredura do ácido vanadomolibdofosfórico com a)  $\text{NaVO}_3$  e b)  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ .

Na Figura 2 é apresentada a linearidade utilizando ambos os reagentes após selecionar os comprimentos de onda de maior absorção. As curvas de linearidade variaram de 0,01 mg/L a 10 mg/L de fósforo, e para estabelecer uma faixa de trabalho adequada foram considerados critérios de sensibilidade e linearidade.

Ainda é possível observar que concentrações superiores a 1,0 mg/L de fósforo para ambas as estratégias se aproximam do limite da saturação, indicando perda de linearidade pela elevada concentração do analito.

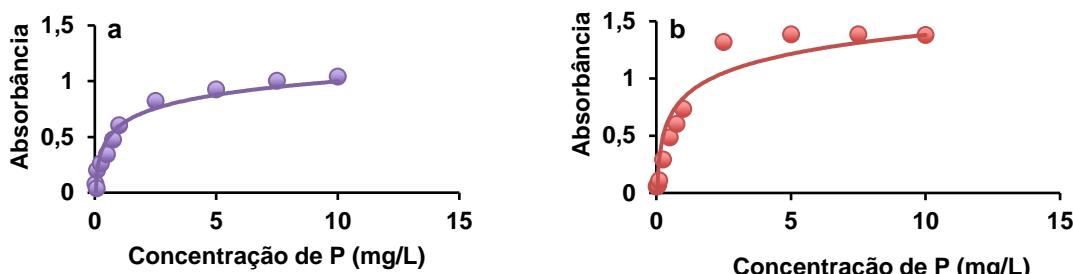


Figura 2. Curva de linearidade para fósforo utilizando  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  e a)  $\text{NaVO}_3$  ou b)  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ .

Na Figura 3, é apresentada a faixa de trabalho escolhida para cada reagente com base nos resultados apresentados. A faixa de trabalho ideal considerando a menor concentração de fósforo detectada, utilizando  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  e  $\text{NaVO}_3$  foi de 0,1 mg/L até 1,0 mg/L; visto o coeficiente de correlação linear de 0,9577 e o coeficiente angular de 0,4188, enquanto, utilizando  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  e  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  obteve 0,01 mg/L até 1,0 mg/L com o coeficiente de correlação linear de 0,9788 e o coeficiente angular de 0,7273. Assim, considerando o objetivo da presente pesquisa em buscar um método com a melhor sensibilidade e linearidade, a segunda alternativa foi considerada a mais adequada.

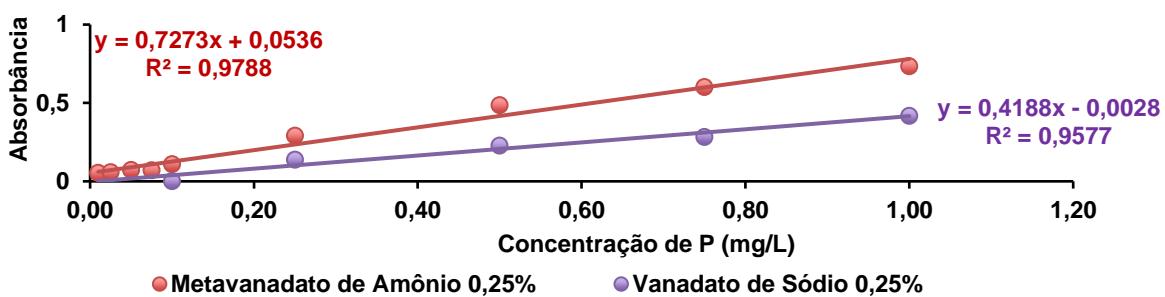


Figura 3. Curva de calibração utilizando  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  e  $\text{NaVO}_3$  ou  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ .

Por fim, a avaliação da interferência de matriz foi realizada para verificar se uma substância/material pode reagir com o reagente da formação do complexo e alterar a reação entre o analito/reagente ou absorver no mesmo comprimento de onda do analito (Bispo; Fody; Schoeff, 2010). A avaliação da possível interferência de matriz foi realizada com a varredura do padrão de fósforo nas concentrações de 0,1 mg/L, 0,5 mg/L e 1,0 mg/L, o branco dos reagentes, uma urina diluída 2000 vezes com e sem a adição de 0,5 mg/L de fósforo, utilizando a segunda estratégia com a mistura de 0,2 mL de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  5% e 0,2 mL de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  0,25% para um volume final de 10 mL. Como pode ser observado na Figura 4, o comportamento para as varreduras se manteve semelhante indicando a ausência de interferência de matriz.

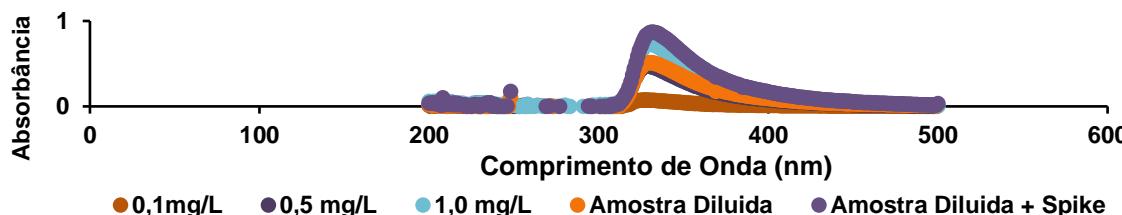


Figura 4: Avaliação de interferência de matriz.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, é possível concluir que a determinação de fósforo na forma de fosfato em urina via análise direta por espectrofotometria UV-Vis através da formação do ácido vanadomolibdofosfórico é viável. A utilização de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  e  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  permitiu a construção de uma curva de calibração na faixa de 0,01 mg/L até 0,1 mg/L, sensibilidade adequada para amostras com concentrações baixas de fósforo. A utilização de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  e  $\text{NaVO}_3$  permitiu a calibração em uma faixa de trabalho de 0,1 mg/L até 1,0 mg/L, adequada para concentrações moderadas de fósforo. As perspectivas futuras para a presente metodologia, incluem realizar os parâmetros analíticos para verificar a exatidão do método que apresenta a maior sensibilidade podendo tornar-se uma ferramenta confiável em análises laboratoriais com aplicabilidade em diferentes contextos biológicos e de saúde. Os autores expressam sua gratidão à CAPES, CNPQ e FAPERGS (EDITAL 14/2022 ARD) pelo apoio financeiro para execução do projeto.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISPO, M.L.; FODY, E.P.; SCHOEFF, L.E. **Química Clínica: Princípios, Procedimentos, Correlações**. 5. ed. Barueri, SP: Manole, 2010. 777 p.
- BURTIS, C.A.; BRUNS, D.E. **Tietz - Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2016. 1106 p.
- LOMBA, M.R.S.; PINC, M.M.; COGO, J.; ALEXANDRE, M.M.; QUEMEL, F.S.; ALBERTON, O.; LOURENÇO, E.L.B.; BOLETA-CERANTO, D.C.F.; RODRIGUES, A.A.; BRAGA, C.C.; ZARDETTO, G. **O uso de matrizes biológicas e testes analíticos presentes na Toxicologia Forense**. Revista Brasileira de Criminalística, v. 12, n. 4, p. 88-102, 2023.
- MCPHERSON, R.A.; PINCUS, M.R. **Diagnóstico Clínico e Tratamento por Métodos Laboratoriais de Henry**. 21. ed. Barueri, SP: Manole, 2012. 1669 p.
- PELIÇÃO, F.S.; PISSINATE, J.F.; DE MARTINIS, B.S. **Amostras biológicas em análises forenses: matrizes usuais (urina e sangue)**. In: DORTA, D.J. (org.); YONAMINE, M. (org.); COSTA, J.L.D. (org.); MARTINIS, B.S,D (org.). **Toxicologia Forense**. São Paulo: Blucher, 2018. v. 750, cap. 20, p. 382-393.
- WIDMAIER, E.; RAFF, H.; STRANG, K. **Vander: fisiologia humana: os mecanismos das funções corporais**. 16. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2024.