

QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATO EM URINA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL COM MONITORAMENTO SIMULTÂNEO DE MÚLTIPLOS COMPRIMENTOS DE ONDA

TAINA FERNANDA BARBOSA NUNES¹; LUANA FERREIRA LIMA²; JHULYANA CAMPOS CARDOSO³; MILENE MARQUES FREITAS⁴; CARLA DE ANDRADE HARTWIG⁵; DIOGO LA ROSA NOVO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – tainafnunes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – luanaferreira33@live.com

³Universidade Federal de Pelotas – jucampx@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – milene.freitas-@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – carlahartwig@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – diogo.la.rosa@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O fósforo é um dos minerais essenciais ao organismo humano, desempenhando funções intracelular e extracelulares, como a contratilidade muscular, funções neurológicas e transporte de eletrólitos. (Widmaier; Raff; Strang, 2024). Nesse sentido, o controle da concentração de fósforo no organismo é extremamente importante.

Dentre as matrizes biológicas utilizadas em análises laboratoriais, a urina é uma das mais tradicionais, pois consiste em um ultrafiltrado do sangue resultante do processamento destes pelos rins. Nesse processo, partes das substâncias essenciais ao metabolismo são reabsorvidas. Por ser a principal via de eliminação de diversas substâncias, a urina é amplamente utilizada na investigação de metabólitos, e o seu volume pode variar em função de fatores como a quantidade de líquido ingerido, a perda de fluidos por outras vias e as alterações na secreção do hormônio antidiurético (Bordin *et al*, 2015). Essa matriz apresenta coleta simples e não invasiva, disponibilidade de grandes volumes para análise e menor número de interferentes quando comparada a outras matrizes (Martins; Providello, 2023).

O método espectrofotométrico baseado na medida do complexo amarelo formado pelo ácido vanadomolibdofosfórico em meio ácido é amplamente utilizado para determinar o fosfato em diversos tipos de amostras. Entre suas vantagens, pode-se ressaltar sua extrema simplicidade, estabilidade da coloração formada e a possibilidade de execução com recursos laboratoriais básicos (Kibria, 2019). Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a determinação de fósforo em urina via análise direta pela determinação de fosfato por espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-Vis) baseada na formação do ácido vanadomolibdofosfórico.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho é uma continuidade da estratégia previamente descrita por Nunes *et al*. (2024) para a quantificação de fósforo em urina utilizando o reagente molibdato de amônio e metavanadato de amônio através da determinação por espectrofotometria na região do UV-Vis. No trabalho anterior foi descrita a avaliação dos reagentes para a formação do reagente de cor. No presente trabalho são apresentados os resultados através do monitoramento do sinal para os comprimentos de onda 329 nm, 415 nm e 420 nm, a fim de avaliar possíveis interferências. Uma curva de calibração foi preparada nas concentrações de 0,10 a 2,00 mg/L a partir de KH_2PO_4 em meio ácido, contendo 200 μL de NH_4VO_3 0,25%

e 200µL de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 5% em um volume final de 10 mL. As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis modelo UV-M51 (BEL Photonics, Brasil), com cubeta de quartzo e software interno para aquisição do sinal para os três diferentes comprimentos de onda em uma única análise. A exatidão foi avaliada através de um ensaio de diluição e ensaios de recuperação com adição de 50% e 100% da concentração de fósforo previamente estimada para a amostra-teste. O efeito de matriz foi avaliado pela comparação das curvas de calibração externa e de adição de padrão. Por fim, nove amostras coletadas voluntariamente foram analisadas. A coleta foi realizada com a primeira urina da manhã, descartando-se o primeiro jato. As amostras foram armazenadas sob refrigeração e todas as etapas seguiram o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPel (Parecer nº 6.586.309).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, realizou-se a avaliação de linearidade nos comprimentos de onda de 329 nm, 415 nm e 420 nm, utilizando uma faixa de concentração de 0,1 – 2,0 mg/L de fosfato. Na Figura 1, é possível observar coeficientes lineares superiores a 0,99 para todos os comprimentos de onda avaliados, indicando que a curva é adequada para as análises. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, à medida que se aumenta o comprimento de onda em relação ao pico máximo de absorção, ocorre a redução no coeficiente de absorção molar, ocasionando a diminuição de valores de absorbância para as mesmas concentrações do analito, reduzindo, portanto, a inclinação da curva analítica e a sensibilidade do método. Dentre as curvas, a que utilizou o comprimento de onda de 329 nm apresentou uma maior sensibilidade (0,5744 versus 0,0649 e 0,0575). Entretanto, a região do ultravioleta pode ser suscetível a interferências. Huckel (1950) *apud* Carrasquero e Adams (1995), indicou que a energia necessária para a transição eletrônica origina a máxima absorção encontrada na zona ultravioleta, enquanto Lin *et al* (2022), indica que há um risco elevado de interferências devido aos muitos constituintes da urina absorverem nesta faixa, como o ácido úrico, compostos orgânicos, componentes aromáticos, purinas e proteínas, dificultando a seletividade do método. Enquanto as curvas utilizando os comprimentos de onda de 415 nm e de 420 nm exibiram menor sensibilidade, podem ser menos suscetíveis a interferências. Os três comprimentos de onda foram sempre monitorados.

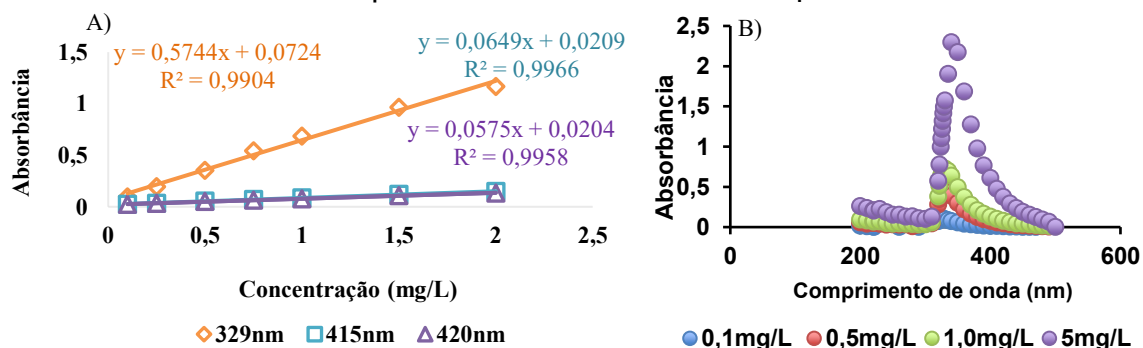


Figura 1 – A) Curvas de Linearidade/Calibração: UV e Visível e B) Varredura Ác. Vanadomolibdofosfórico.

A amostra-teste foi diluída para manter as determinações no intervalo da faixa da curva de calibração. Diluições mínimas, intermediárias e máximas foram avaliadas a partir da comparação entre as concentrações obtidas. Para cada par

de diluições, a concordância percentual foi calculada pela razão entre o menor e o maior valor médio de concentração, multiplicada por 100. Dessa forma, obteve-se um intervalo de concordância entre 86 e 99%, indicando assim, que os resultados mantiveram proporcionalidade entre as diferentes diluições. A diluição intermediária (1:2000) foi selecionada como o mais adequado por estar na zona intermediária da curva de calibração. Os coeficientes de variação obtidos foram sempre inferiores a 6%. As recuperações obtidas utilizando os comprimentos de onda de 415 nm e 420 nm variaram de 102% a 104%, enquanto utilizando o comprimento de onda de 329 nm variaram de 81% a 94%. O coeficiente de variação utilizando os comprimentos de onda de 415 nm e 420 nm foram inferiores a 5%, enquanto utilizando 329 nm foram até 12%.

A fim de avaliar o efeito de matriz, foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos para curvas de calibração externa e curvas de adição de analito. As inclinações e interceptos das duas abordagens foram bastante semelhantes e os coeficientes de linearidade permaneceram próximos de 1, como pode ser observado na Figura 2. A ausência de interferências de matriz permitiu adotar a curva externa como referência para quantificação, simplificando o processo analítico e reduzindo o tempo de execução sem prejuízo da confiabilidade.

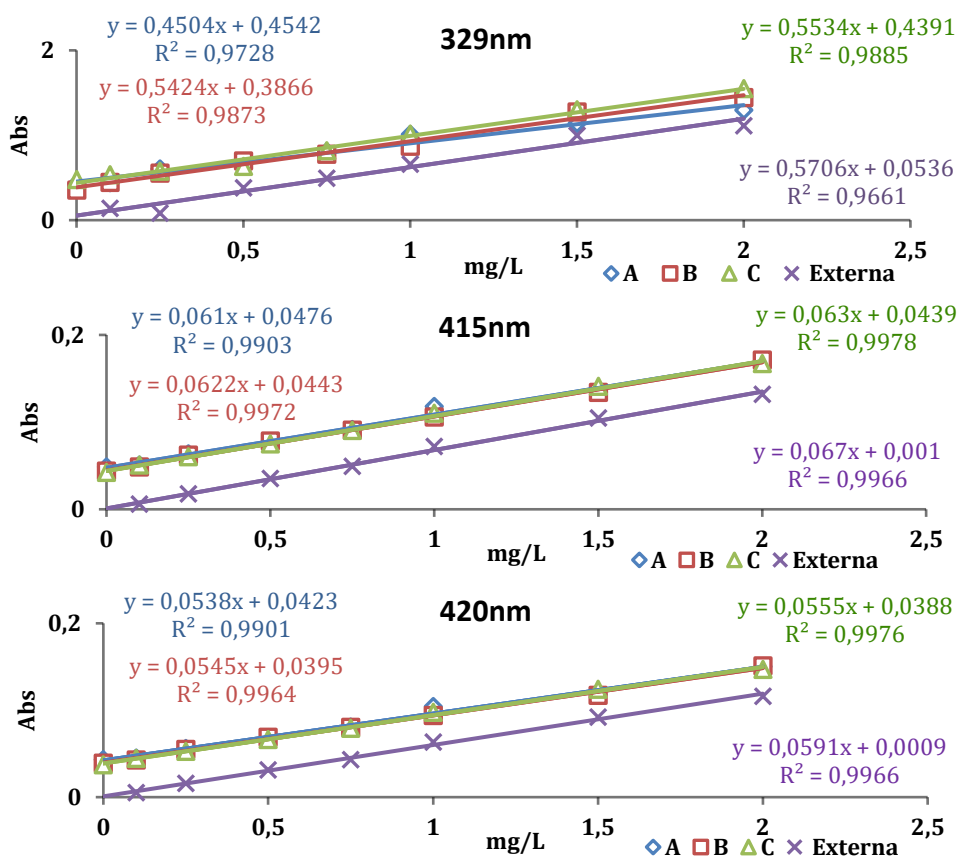


Figura 2 - Triplicata da Curva de Adição versus Curva Externa em diferentes comprimentos de onda.

Após as otimizações, dez amostras de urina foram analisadas e as concentrações de fósforo variaram entre 25 e 145 mg/dL. As médias obtidas nos comprimentos de 415 nm e 420 nm apresentaram excelente concordância entre si, com coeficientes de variação inferiores a 10%. Os resultados obtidos estão de acordo com intervalos reportados na literatura para fósforo urinário em indivíduos saudáveis, que variam entre 5 e 148mg/dL (DB Diagnósticos do Brasil, 2020). Vale mencionar que o estado de saúde dos voluntários não foi avaliado. A coerência dos

resultados e a reprodutibilidade indicaram que os comprimentos de onda avaliados podem ser utilizados para a estratégia proposta, permitindo ao analista maior flexibilidade na escolha do comprimento de onda.

4. CONCLUSÕES

Por fim, a estratégia analítica mostrou-se adequada para a quantificação de fósforo em amostras de urina, atendendo aos requisitos de linearidade, precisão e exatidão. A utilização da curva externa, aliada à confirmação da ausência de efeito de matriz, simplificou o procedimento sem comprometer a confiabilidade. Apesar da menor sensibilidade da região visível em comparação a região do ultravioleta, a redução das interferências espectrais e a estabilidade dos resultados justificam sua aplicação em análises rotineiras. O método apresenta potencial para uso em monitoramentos clínicos ou forenses, especialmente em situações que demandem análises reprodutíveis e de execução simplificada. Os autores expressam sua gratidão à CAPES, CNPQ e FAPERGS (EDITAL 14/2022 ARD) pelo apoio financeiro para execução do projeto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORDIN, D. *et al.* Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125-143, 2015.

CARRASQUERO, A.; ADAMS, M. Estudio del complejo amarillo vanadomolibdofosfórico para el análisis de fósforo en suelos. **Venesuelos**, v. 3, n. 2, p. 83-88, 1995.

DB DIAGNÓSTICOS DO BRASIL. **FOSU - FÓSFORO URINÁRIO - AMOSTRA ISOLADA**. Paraná, 2020. Acessado em 27 de agosto de 2025. Disponível em: <https://gde.diagnosticosdobrasil.com.br/GDE_Home/DetalheDoExame.aspx?Exa Meld=FOSU>

KIBRIA, K. *et al.* Calibration of yellow colour spectroscopic method of phosphorus determination for wavelength, working range and time. **Environmental Science**, v.16(1&2), p. 41-46, 2019.

LIN, T. *et al.* Label-Free Uric Acid Estimation of Spot Urine Using Portable Device Based on UV Spectrophotometry. **Sensors**, v. 22, n. 3009, p. 1-8, 2022.

MARTINS, A.; PROVIDELLO, M. Amostras biológicas usadas na detecção do doping químico e matrizes alternativas: um estudo comparativo. **Revinter**, v. 16, n. 2, p. 5-25, 2023.

NUNES, T. F. B *et al.* Avaliação de estratégia analítica para quantificação de fosfato em urina via análise direta por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível. In: **XXXIII CIC – CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, Pelotas, 2024

WIDMAIER, E.; RAFF, H.; STRANG, K. **Vander: fisiologia humana: os mecanismos das funções corporais**. 16. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2024.