

GARANTIA DE QUALIDADE EM METABOLÔMICA NÃO-ALVO

Andrew M. Teixeira^a, Julia Maia Galvão de Queiroz^a, Bruno C. Garrido^b, Antônio Jorge R. Silva^{a,*}, Anelize Bauermeister^c e Ricardo M. Borges^a

^aInstituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-903 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

^bDivisão de Metrologia Química, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 25250-020 Duque de Caxias – RJ, Brasil

^cInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo – SP, Brasil

Recebido: 26/02/2024; aceito: 26/06/2024; publicado online: 14/08/2024

QUALITY ASSURANCE IN UNTARGETED METABOLOMICS. Over the last two decades, metabolomics has emerged as a pivotal tool in multidisciplinary research, providing invaluable insights into metabolome modulations and finding applications across various scientific domains, including medicine and agronomy. Nonetheless, the absence of standardized procedures in sample preparation, data acquisition, and documentation of data quality presents a significant challenge. This review underscores the critical importance of quality assurance and quality control (QA/QC) in untargeted metabolomics, advocating for the establishment of agreed-upon QA/QC reporting standards within the scientific community. We discuss the requisite quality controls at various stages of untargeted metabolomics studies, encompassing blank samples, pooled samples, and the utilization of external quality control samples. Methods for assessing accuracy, reproducibility, and identifying/correcting batch effects are addressed. Furthermore, emphasis is placed on standardizing the description of QA/QC data in scientific publications and repositories to foster reproducibility and transparency. We recommend the publication of QC data alongside studies in appropriate databases to facilitate data comparison and sharing among researchers, thereby enhancing the quality of untargeted metabolomics research. In summary, implementing standardized QA/QC data reporting, along with promoting best practices within the untargeted metabolomics community, is crucial for improving result quality and credibility and advancing research utilizing this powerful technique.

Keywords: standardization; batch effect; reproducibility; quality control.

INTRODUÇÃO

Os seres vivos, incluindo plantas, animais e microrganismos, respondem a fatores genéticos e ambientais por meio de mecanismos bioquímicos específicos. Nas últimas décadas, a comunidade científica tem se esforçado para compreender e identificar os produtos resultantes dessas interações. As ciências ômicas, como genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e outras, oferecem uma análise integrativa abrangente dos sistemas biológicos.¹⁻⁴ O metaboloma abrange metabólitos endógenos e produtos de interações exógenas em indivíduos ao longo do tempo, incluindo metabólitos primários (como ácidos graxos, aminoácidos e carboidratos) e metabólitos secundários ou especializados.⁵⁻⁸

A metabolômica foi definida inicialmente por Fiehn⁹ como a “Análise abrangente na qual todos os metabólitos de um sistema biológico são identificados e quantificados”. Dentro da metabolômica há duas grandes abordagens: (i) a metabolômica alvo (do inglês *targeted metabolomics*) e a (ii) metabolômica não-alvo (do inglês *untargeted metabolomics*). A primeira refere-se a abordagem na qual metabólitos (ou classes metabólicas) específicas são investigados como resposta a um dado estímulo. A segunda é referente a avaliação de todo o conjunto de substâncias em uma determinada condição de modo indiscriminado.¹⁰

Um ponto importante reside na etapa inicial do planejamento do estudo. Como as matrizes de dados geradas em ensaios de metabolômica devem ser passíveis de validação estatística, há a demanda por um número considerável de amostras para realizar análises estatísticas que forneçam resultados significativos, o que

acaba gerando em um grande volume de dados. Portanto, questões relacionadas à precisão, exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade tornam-se essenciais.^{11,12} Estudos comparativos precisam ser submetidos a avaliações estatísticas para distinguir diferenças reais e significativas de variações biológicas aleatórias para um conjunto de dados específico.¹³ Por exemplo, o número de réplicas considerado ideal para avaliação das variações biológicas para um determinado tipo de amostra, não é necessariamente o mesmo número para um outro tipo de amostra. A definição do número de amostras em um estudo de metabolômica é uma importante etapa e deve ser baseada nas possíveis variáveis que as amostras são susceptíveis. Nesse contexto, os métodos empregados na etapa analítica devem ser submetidos a um rigoroso processo de validação analítica para demonstrar a adequação do método proposto.¹⁴⁻¹⁶

A pesquisa em metabolômica consiste em uma abordagem integrativa e pluridisciplinar em busca da compreensão abrangente dos mecanismos bioquímicos em resposta aos mais diversos fatores introduzidos pelas interações entre os organismos e seu meio e/ou entre organismos diferentes.¹⁷ Neste documento enfatizamos as questões relacionadas às etapas de aquisição de dados analíticos. Tratamos aqui as técnicas predominantes para a aquisição de dados, que são a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (MS do inglês *mass spectrometry*), cada uma com suas respectivas vantagens e desvantagens.¹⁸⁻²¹ Inerente às suas especificidades, a comunidade de metabolômica debate a criação de protocolos de garantia de qualidade (do inglês *quality assurance* - QA) e controle de qualidade (do inglês *quality control* - QC), com foco particular em estudos não-alvo. Este foi o caso da conferência “Think Tank on Quality Assurance and Quality Control for Untargeted Metabolomics Studies” que ocorreu em 2017 e foi organizada pelo *National Institutes of Health* (NIH) dos

*e-mail: ajorge@ippn.ufrj.br

Editor responsável pelo artigo: Jorge M. David

Estados Unidos, reunindo especialistas no assunto para discutir sobre padronização em análises de metabolômica não-alvo,²² o que é o foco deste documento, um debate direcionado para estudos não-alvo. Estudos alvo já possuem critérios bem estabelecidos para QA e QC, incluindo orientações de relatórios de qualidade de dados. Por exemplo, a *Food and Drug Administration*²³ e a resolução RDC No. 301 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária,²⁴ que oferecem diretrizes para ingredientes farmacêuticos, o DOQ-CGCRE-008 do Inmetro²⁵ e o guia de validação da *Eurachem*²⁶ que podem ser facilmente adaptadas para análises alvo.

No caso de métodos analíticos, parâmetros como seletividade, linearidade, exatidão, precisão, faixa de concentrações, limite de detecção, limite de quantificação e robustez são essenciais para avaliar a adequação do método. Esses parâmetros fornecem informações valiosas sobre a incerteza associada ao método, uma vez que, do ponto de vista da química analítica, todo experimento está sujeito a erros, sejam eles sistemáticos ou aleatórios. Os materiais de referência certificados (MRCs) desempenham um papel fundamental no processo de validação, pois oferecem valores bem documentados que podem ser usados para comparação com as amostras biológicas. Os MRCs possuem valores de propriedade devidamente estabelecidos e documentados. As propriedades especificadas em MRC podem ser diversas, desde pureza química, fração em massa do composto em uma determinada matriz, razão isotópica, entre outros. Qualquer falta de concordância entre os resultados obtidos com MRCs e as amostras biológicas pode indicar problemas no método analítico.²⁷ A Figura 1 mostra como exemplo o MRC 1950 desenvolvido pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Este foi o primeiro material de referência desenvolvido para pesquisas em metabolômica não-alvo. Foram analisados os plasmas sanguíneos de 100 pessoas adultas dos Estados Unidos, representando ao máximo a distribuição étnica da população estudada. No total foram identificados e quantificados 100 metabólitos (dentre vitaminas, hormônios, carotenóides, colesterol, etc.).²⁸

Considerando o exposto e devido à falta de documentos em língua portuguesa que discutam sobre esse assunto, o objetivo deste trabalho é revisar as principais abordagens usando amostras de QC e sua aplicação na exatidão, precisão e reprodutibilidade para QA em metabolômica não-alvo. Este é parte de um esforço que visa desenvolver documentos em língua portuguesa sobre debates atuais relacionados à metabolômica, bem como promover debates sadios entre pesquisadores nacionais, que de alguma forma, contribuem para o desenvolvimento da área no Brasil.



Figura 1. MRC 1950 de plasma humano desenvolvido pelo NIST em parceria com o NIH. É possível encontrar no certificado de análises as frações mássicas de todos os 100 metabólitos identificados e quantificados. Na figura é possível visualizar a embalagem na qual os frascos são armazenados, o cabeçalho do certificado de análises e uma tabela representativa da concentração de aminoácidos identificados

CONFIABILIDADE EM ANÁLISES DE METABOLÔMICA NÃO-ALVO

A pesquisa em metabolômica não-alvo é orientada por duas metas essenciais: (i) maximizar o número e a diversidade de metabólitos medidos; (ii) assegurar a precisão, repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Isso representa um desafio significativo, uma vez que as abordagens não-alvo não permitem a seleção prévia dos metabólitos de interesse. Os metabólitos detectados são inicialmente registrados como “sinais” e, posteriormente, submetidos a um algoritmo computacional complexo e matematicamente extenso para processamento.^{11,29} Inúmeros erros podem estar embutidos nessas etapas, por exemplo, o solvente empregado pode extrair parcialmente ou simplesmente não extrair algumas classes de metabólitos, a ferramenta analítica empregada, assim como os parâmetros selecionados podem não estar favorecendo a detecção majoritária dos metabólitos, etc. E, no caso dos exemplos citados, o emprego de padrões nas análises poderia minimizar os erros. Consequentemente, é imperativo manter um rigor bem definido em todas as etapas da pesquisa, uma vez que erros analíticos podem comprometer a qualidade dos dados e, consequentemente, a interpretação dos resultados. O resultado pode ser a falha na formulação de uma hipótese válida ou, no pior dos casos, a formulação de uma hipótese falsa ou tendenciosa, que não contribui de forma significativa para o avanço científico.^{30,31} Portanto, o primeiro passo crucial em qualquer análise é estabelecer uma definição clara e abrangente dos objetivos do estudo, se certificando dos possíveis erros que podem ocorrer no estudo e incluir controles para minimizar seus efeitos. Essa definição orientará a escolha do tipo e número de amostras, grupos a serem comparados, amostras de controle de qualidade e outros fatores que garantirão um rigor analítico adequado à pesquisa ainda na etapa de planejamento do estudo.³

GARANTIA DE QUALIDADE (QA) E CONTROLE DE QUALIDADE (QC) EM METABOLÔMICA NÃO-ALVO

A realização de medições com qualidade em análises químicas é fundamental para garantir que os métodos sejam desenvolvidos de forma a alcançar resultados precisos e acurados, essenciais para os objetivos da pesquisa.³² Isso implica que o método proposto deve atender a padrões rigorosos de precisão e exatidão, fornecendo uma base sólida para futuras decisões.

A garantia de qualidade (QA) abrange o processo que assegura a obtenção de resultados de qualidade antes que as medições reais sejam



National Institute of
Standards and Technology
U.S. Department of Commerce

Date of Issue:
12 October 2023

Standard Reference Material® 1950

Metabolites in Frozen Human Plasma

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Table 2. Certified Values for Amino Acids^(a,b)

	Mass Fraction (mg/kg)	Amount-of-substance Concentration (µmol/L)
Alanine	26.2 ± 2.2	300 ± 26
Glycine	18.0 ± 1.2	245 ± 16
Isoleucine	7.13 ± 0.42	55.5 ± 3.4
Leucine	12.90 ± 0.82	100.4 ± 6.3
Lysine	20.0 ± 1.9	140 ± 14
Methionine	3.26 ± 0.26	22.3 ± 1.8
Proline	19.9 ± 1.1	177 ± 9
Serine	9.87 ± 0.44	95.9 ± 4.3
Tyrosine	10.17 ± 0.53	57.3 ± 3.0
Valine	20.9 ± 1.2	182.2 ± 10.4

realizadas. Isso inclui a elaboração e utilização de procedimentos operacionais padrão (POP), o treinamento de pessoal e outros processos relacionados ao estudo.

O controle de qualidade (QC) refere-se às operações rotineiras que envolvem a avaliação da qualidade dos resultados e o desempenho geral do laboratório em todos os processos inerentes ao estudo.³³

A necessidade de padronização em estudos de metabolômica não-alvo resultou na formação do *Metabolomics Quality Assurance and Quality Control Consortium* (mQACC) por pesquisadores financiados pelo NIH. Este consórcio tem como objetivo estabelecer padrões para relatar resultados em metabolômica não-alvo, visando aprimorar a exatidão, precisão e reprodutibilidade analítica.¹⁶

Vários relatórios têm discutido diferentes etapas para assegurar a QA em metabolômica não-alvo.^{11,12,30,33-38} Além disso, vale ressaltar que os conceitos e práticas de QA/QC discutidos nesses relatórios podem e devem ser aplicados em outras abordagens dentro da Química de Produtos Naturais visando assegurar a confiabilidade e a precisão dos resultados obtidos. Abaixo, destacamos e analisamos as principais etapas dessas discussões.

Amostras de controle na extração (QC-branco-analítico)

Conhecidas como branco analítico (QC-branco-analítico) ou de processo, desempenham um papel crítico na análise. Essas amostras devem ser preparadas e incluídas em todas as etapas experimentais, desde o início até a última etapa, além de serem posicionadas estrategicamente no meio dos lotes e entre diferentes lotes. Essas amostras são submetidas sistematicamente a todas as etapas de extração usadas com as amostras biológicas reais. Isso significa que os mesmos solventes, produtos químicos, consumíveis e procedimentos operacionais padrão são aplicados, mas sem a presença de qualquer amostra biológica real, incluindo meios de cultura sem o organismo em estudo. Em se tratando de amostras cultivadas em laboratório utilizando meios de cultura, essa amostra QC-branco-analítico deverá ser preparada como branco desde a etapa de cultivo, incluindo o meio de cultura se a extração incluir o meio de cultura. No caso de amostras biológicas sólidas ou pastosas, como tecidos ou fezes, no preparo de brancos de extração, a recomendação seria utilizar um material que imite a matriz da amostra biológica em termos de composição e comportamento durante a extração, mas que seja isento dos analitos de interesse. Isso pode incluir o uso de matrizes inertes ou de materiais de referência que tenham sido certificados como livres dos componentes a serem medidos.

Um exemplo da aplicação dessa estratégia está no trabalho desenvolvido por Kuligowski *et al.*³⁹ para analisar amostras de plasma humano por LC-TOF-MS (do inglês *liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry*). Os resultados mostraram uma inflação nos dados oriundos de contaminação de diversas fontes. O processamento inicial dos dados resultou em um total de 4.294, 4.534 e 3.815 sinais (*features*) detectadas nas mesmas amostras divididas em alíquotas em 3 lotes. Porém, neste caso, os sinais oriundos das amostras QC-branco-analítico foram desconsiderados quando sua intensidade média foi maior do que 10% da média dos sinais das amostras. Após esta filtragem, se verificou as quantidades de 2.600, 2.745 e 2.582 sinais, respectivamente.³⁹ Outros exemplos de aplicações desta natureza podem ser encontrados na literatura.^{40,41} Sinais detectados nas amostras QC-branco-analítico devem ser racionalmente excluídos da interpretação dos resultados, mas nunca devem ser ignorados pela etapa analítica.

Amostras QC-branco-analítico têm o propósito de detectar possíveis contaminantes que podem ser introduzidos nas amostras biológicas durante o preparo, como impurezas nos solventes, resíduos de vidrarias utilizados no armazenamento e processamento das

amostras, ou contaminação por transferência (*carryover*). É importante ressaltar que as amostras branco devem sempre ser preparadas antes das amostras biológicas para evitar qualquer tipo de contaminação no branco referente a substâncias presentes nas amostras, uma vez que os sinais detectados nos brancos serão posteriormente descartados das análises. Qualquer sinal detectado nas amostras de controle permite a identificação segura de contaminantes residuais nas amostras de teste, que podem ser tratados adequadamente durante as análises estatísticas. *Carryover* é um fenômeno no qual resíduos de substâncias analisadas em um evento anteriormente são transportados ou arrastados para análises subsequentes, afetando a precisão e a qualidade dos resultados. Isso pode ocorrer devido à contaminação residual no sistema cromatográfico, como na coluna cromatográfica, nas conexões ou na instrumentação. Para minimizar esse fenômeno, algumas medidas são adotadas tais como a lavagem apropriada do sistema entre análises, a utilização de amostras de branco de limpeza para eliminar resíduos do sistema, a escolha adequada do gradiente de solventes, e a manutenção regular do equipamento.⁴²

Branco da fase móvel (QC-branco-instrumental)

A amostra branco da fase móvel (QC-branco-instrumental), também conhecido como branco de sistema ou branco instrumental, envolve o uso exclusivo da fase móvel que é empregada na corrida analítica. Essa prática visa identificar impurezas presentes no solvente, bem como realizar a limpeza de vidrarias, equipamentos e detectar qualquer contaminação no sistema de separações, incluindo as colunas, sejam elas de cromatografia líquida, à gás ou de exclusão por tamanho. É importante ressaltar que as amostras branco e outros controles devem ser injetados antes das amostras biológicas para evitar contaminação no sistema, sendo a amostra branco da fase móvel a primeira amostra da sequência a ser analisada, e deve ser injetada antes mesmo do branco analítico.

O branco instrumental também é empregado como controle das análises. Ele é injetado periodicamente entre amostras biológicas (a cada 5-10 amostras, depende do tipo de amostra, concentração, etc). Essas amostras servem para acompanhamento durante a aquisição dos dados para verificar se não está havendo contaminação entre amostras, ou se as amostras não estão contaminando/sujando a coluna cromatográfica ou outra parte do sistema. É importante o acompanhamento dessas análises, pois, uma vez detectado a contaminação, deve-se diluir as amostras e criar um novo lote de injeção (reinjetado todas as amostras novamente) ou deve-se empregar brancos de limpeza entre as amostras para garantir a limpeza do sistema antes de que uma nova amostra seja injetada. Essas amostras de branco-instrumental controles servem apenas para acompanhamento da etapa instrumental e não devem ser considerados como brancos e serem empregados na análise final dos dados, pois pode haver sinais de contaminação das amostras.

A análise da composição do branco da fase móvel permite a identificação e eliminação de possíveis contaminantes que possam estar presentes na instrumentação analítica. Esses contaminantes podem ser reconhecidos quando a área e altura do pico não diferem substancialmente das características do branco. Isso contribui diretamente para a melhoria da qualidade da triagem, particularmente em técnicas não-direcionadas, como LC-MS (do inglês *liquid chromatography coupled with mass spectrometry*).

No caso de análises por RMN, esta amostra QC-branco-instrumental é executada com o solvente deuterado utilizado na etapa final de preparo dos tubos de RMN. Em geral, este fenômeno de contaminação no instrumento de RMN é menos comum devido ao fato da amostra não entrar em contato direto com a sonda onde ocorre a detecção.

Quando uma amostra QC-branco-instrumental revela sinais de contaminação, é essencial tomar medidas adequadas para resolver o problema e garantir que as análises subsequentes não sejam afetadas. A contaminação em uma amostra de branco instrumental pode ser decorrente de vários fatores, como impurezas no solvente, contaminação no processo de preparação de amostras, ou problemas no manuseio de equipamentos e vidrarias.

Branco de limpeza (QC-branco-limpeza)

Em ensaios de HPLC (do inglês *high performance liquid chromatography*) com fase reversa, o branco de limpeza (QC-branco-limpeza) é preparado utilizando um solvente de eluição forte, geralmente metanol 100%, e é introduzido no sistema (coluna e porta de injeção) com o propósito de limpeza, minimizando o *carryover*. Em alguns casos pode ser necessário uma limpeza mais forte da coluna cromatográfica e isopropanol pode ser empregado, no entanto esse solvente deve ser injetado apenas no sistema cromatográfico e não no espectrômetro de massas, pois não é desejável introduzir esta 'contaminação' no espectrômetro. Isso é particularmente relevante devido ao fato de que alguns compostos, como ácidos graxos, tendem a aderir mais fortemente à fase estacionária da coluna. Nesse contexto, a passagem de um solvente apropriado serve como uma etapa de lavagem, reduzindo a contaminação.

É importante que o pesquisador esteja ciente de que, após a injeção, o sistema cromatográfico precisará ser recondicionado com outras amostras de QC. A omissão desse recondicionamento da instrumentação analítica pode afetar diretamente a reprodutibilidade do método, comprometendo os resultados. Outro ponto importante a ser mencionado é que essas amostras QC-branco-limpeza não devem ser consideradas na análise de dados, uma vez que são amostras para limpeza. Apenas o QC-branco-instrumental deve ser incluído nas análises.

Controle de qualidade - amostras combinadas (QC-pool)

Após a fase inicial de QA, onde as amostras de QC-branco produzem informações valiosas sobre a contaminação, surge a

necessidade de assegurar a confiabilidade dos dados provenientes das amostras biológicas reais. Estas são a verdadeira matriz de interesse para avaliar a variação dos metabólitos entre os grupos de controle e teste.

Na metabolômica não-alvo, que pode detectar centenas de sinais e cuja identidade química da maior parte dos metabólitos não é conhecida antes de sua aquisição, a utilização abrangente de padrões internos se torna inviável. É impraticável criar curvas analíticas específicas para metabólitos desconhecidos, tornando a quantificação absoluta, estimativas absolutas de exatidão e precisão, limites de detecção, limites de quantificação e quantificadores de linearidade inalcançáveis.^{43,44}

Ainda assim, é crucial incorporar amostras de QC ao longo do processo analítico na metabolômica não-alvo. Entre os diversos critérios que os QCs devem atender, o mais importante, é que eles sejam homogêneos e representativos da composição qualitativa e quantitativa média do estudo. Uma solução prática para enfrentar esse desafio é criar uma amostra global que contenha pequenas porções de cada amostra biológica real de modo a representar todas as amostras do estudo. Posteriormente, várias alíquotas dessa amostra geral, com volumes equivalentes aos das amostras do estudo (controle e/ou teste), são produzidas e distribuídas de forma aleatória e uniforme em cada lote (conforme mostrado na Figura 2). Essas amostras são conhecidas como amostras QC agrupadas ou QC-pool.^{11,12,45}

É relevante observar que, uma vez que a amostra QC-pool representa de maneira abrangente todas as amostras do estudo, ela desempenha um papel crucial em diversas etapas do processo analítico. Essas amostras devem ser empregadas na otimização das condições cromatográficas, na definição dos parâmetros de detecção por MS ou RMN, bem como na determinação dos parâmetros a serem empregados no processamento dos dados provenientes das amostras do estudo. Além disso, essas amostras distribuídas aleatoriamente no meio do lote de análise podem auxiliar no controle do método analítico pela comparação do tempo de retenção, intensidade do íon, erro de massas, etc. de picos específicos. Dessa forma, o uso desta classe de amostras desempenha um papel central na QA e na obtenção de resultados robustos e confiáveis ao longo do estudo de metabolômica não-alvo.

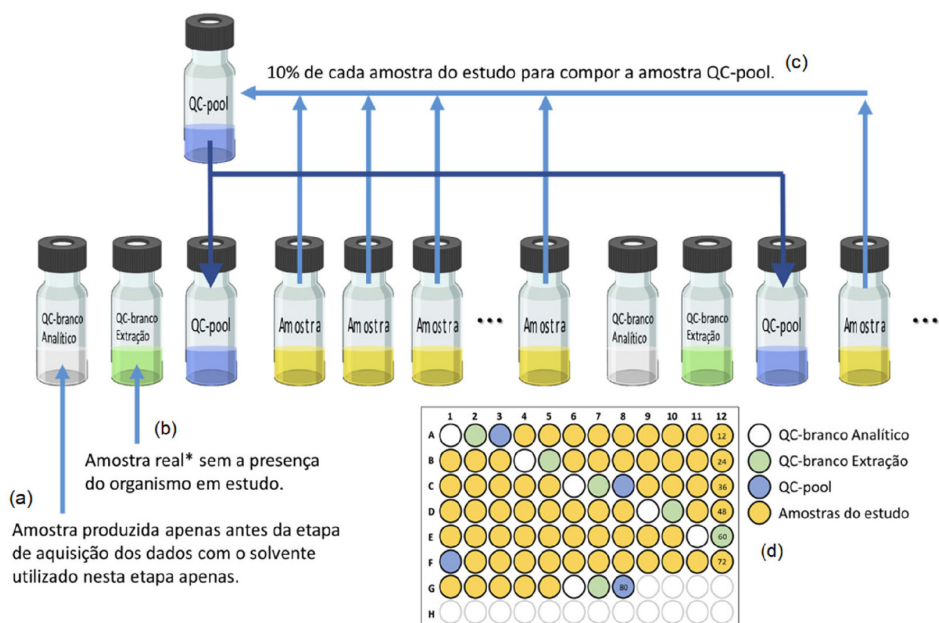


Figura 2. Fluxo de preparação de amostras de QC agrupadas. (a) Indicação da amostra QC-branco-instrumental; (b) indicação da amostra QC-branco-analítico; (c) indicação da amostra QC-pool com a combinação de alíquotas a partir de todas as amostras do estudo e alíquotadas em diferentes frascos; (d) sequência analítica

É importante destacar que o uso desse tipo de QC é recomendado em conjuntos amostrais que consistam em algumas dezenas de amostras, e que essas amostras tenham um volume suficiente para que a remoção de alíquotas (aproximadamente 10% do volume global de cada amostra teste), destinadas ao QC, não tenha um impacto significativo na sensibilidade, detecção, concentração e volume das amostras individuais. Além disso, esse método é adequado para experimentos de curto prazo nos quais todas as amostras possam ser analisadas sequencialmente, sem longas pausas que possam levar à degradação química dos metabólitos. Caso o número de amostras seja muito grande, uma alternativa seria o preparo de um QC-*pool* com algumas amostras representativas de subgrupos de amostras, quando possível, discutiremos outra alternativa no próximo tópico.

O uso de QC-*pools* de subgrupos tem como objetivo principal monitorar e garantir a qualidade e a consistência dos dados dentro de categorias específicas de amostras. Os dados provenientes desses QC-*pools* também podem ser usados para realizar ajustes na normalização e calibração específicos para cada subgrupo, garantindo que as comparações entre eles sejam precisas e reflitam diferenças reais, não apenas variações metodológicas ou instrumentais. Além disso, essas amostras podem ser utilizadas para aprofundar a aquisição de dados, facilitando a anotação e identificação de sinais relevantes para o estudo.

Um exemplo do uso desta técnica é descrito por Torres *et al.*,⁴⁶ onde buscaram identificar possíveis biomarcadores que auxiliem no diagnóstico da doença de mucopolissacaridoses bem como entender possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos distúrbios desta doença. Das 75 amostras de urina coletadas (38 amostras controle e 37 amostras teste), após extração, foi alíquotado, de cada uma destas, 5 µL para a amostra QC-*pool*. Além desta, uma solução com 15 padrões analíticos foi preparada como amostra de adequação do sistema. Todas as amostras teste bem como as amostras de QC foram organizadas aleatoriamente em um lote e injetadas em um LC-HRMS (*liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*). A solução de padrões, injetada no início e no fim do lote, mostrou que não houve mudança significativa no perfil cromatográfico destas soluções, refletindo a estabilidade e adequação do sistema durante as análises do lote. O agrupamento das amostras de QC-*pool* no gráfico de análise de componentes principais (PCA do inglês *principal components analysis*) com variância visivelmente inferior àquelas observadas nas amostras indicou a estabilidade da plataforma analítica durante a sequência experimental. As amostras de QC-*pool* agrupadas demonstraram repetibilidade e ausência de tendência ao longo das 31 h de aquisição de dados do lote analítico.⁴⁶

Controle de qualidade externo (QC-externo)

Em situações em que se lida com um grupo amostral demasiadamente grande, com disponibilidade limitada e que será coletado e analisado de forma escalonada ao longo de um período de tempo prolongado, a criação de amostras de QC-*pool* pode ser inviável. Nesses casos, o pesquisador pode recorrer ao uso de um QC-externo, onde normalmente é empregado um conjunto de substâncias conhecidas, geralmente sintéticas e que não possam estar presentes no conjunto de amostras, porém que contenham propriedades físico-químicas semelhantes aos grupos de metabólitos possivelmente presentes na matriz biológica para garantir detecção e análise semelhantes. Quando um estudo necessita possuir muitas amostras (tipicamente maior do que 80 amostras, dado de referência da experiência dos autores), não é indicado realizar todas as análises de uma única vez (principalmente no caso de cromatografia), mas dividir as amostras em diferentes lotes. Assim, será possível que o técnico responsável pelas análises possa realizar a rotina de limpeza

e condicionamento do sistema analítico. Este caso também justifica a necessidade de uma amostra de QC-externo para correção de possíveis desvios inter-lote.

Gouveia *et al.*⁴⁵ desenvolveram uma metodologia robusta para a produção de amostras de QC estáveis para serem usadas em diferentes lotes para estudos com intervalos de tempo longos. O método *iterative batch averaging* (IBAT), tal como sugerido, demonstra um procedimento de combinação de alíquotas de uma cepa de referência (neste caso a cepa PD1074: *Caenorhabditis elegans*) cultivada nos diferentes lotes para a produção do material de referência específico ao longo do tempo e permitir a comparação entre cepas de *C. elegans*.⁴⁵ Essas alíquotas são combinadas e alíquotadas para produzir um material de referência único, estável e específico para o estudo. A estratégia permite a mitigação da variabilidade técnica e biológica para serem adaptados para estudos em larga escala e de longo prazo em diferentes lotes.

Outra possibilidade, com maior descrição na literatura, é o uso de materiais de referência certificados (MRCs), que possuem níveis de pureza e incerteza determinados e desempenham um papel crucial na garantia da precisão. Também podem incluir materiais de referência (MRs), conhecidos como materiais de referência baseados em matriz ou secundários, que, embora não sejam certificados, são fundamentais para estudos interlaboratoriais, testes de proficiência e outros processos, tornando-se um padrão de controle de qualidade diário.^{47,48}

Em muitos casos, o custo financeiro de adquirir uma variedade de MRCs para estudos não-direcionados pode ser proibitivo. Portanto, os laboratórios podem desenvolver seus próprios MRs (*in-house reference materials*) para análises internas, seguindo as diretrizes do ISO Guia 80.⁴⁹ Esse documento estabelece os requisitos essenciais que uma substância ou conjunto de substâncias (como um extrato vegetal, por exemplo) deve cumprir para ser utilizado como MR.

A técnica de ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq) é altamente recomendada durante o processo de criação desses MRs, pois supera outras ferramentas nesse contexto. Isso ocorre porque, sob certas condições, a RMNq é um método primário de quantificação que requer apenas solubilidade completa e a presença de núcleos detectáveis (como é o caso dos núcleos de ¹H) na amostra candidata.⁵⁰⁻⁵²

Apesar dos desafios na escolha de padrões internos (PI) para estudos não-alvo, essas substâncias podem ser selecionadas de diferentes classes químicas, garantindo uma cobertura abrangente ao longo da corrida analítica. Quando existe uma lista de substâncias de interesse, o uso de padrões marcados isotopicamente proporciona uma referência quantitativa precisa, crucial em misturas complexas de amostras. A implementação de padrões internos em reações de derivatização, particularmente para análises por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS, do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*), pode melhorar a detectabilidade e a quantificação de compostos que de outra forma seriam desafiadores devido à sua volatilidade ou estabilidade térmica. Essas técnicas, ainda não comuns em estudos metabolômicos não-alvo, podem aumentar significativamente a exatidão e a reprodutibilidade dos dados analíticos.

Organização da sequência de análise (ordem aleatória)

Uma consideração de maior importância durante a aquisição dos dados em estudos de metabolômica não-alvo é a organização da sequência de análise das amostras do estudo. A escolha da ordem em que as amostras serão analisadas pode ter um impacto significativo nos resultados e na minimização de possíveis efeitos de *carryover*,

lote ou outras fontes de variação. Uma abordagem eficaz para mitigar tais efeitos é a organização das amostras em uma ordem aleatória, ou seja, sem um padrão predefinido que possa influenciar os resultados. Observe que não é necessário incluir as amostras de QC nesse processo de organização das amostras em ordem aleatória.

A ordem aleatória na sequência de análise ajuda a evitar qualquer viés potencial na análise, uma vez que não há um padrão específico na ordem em que as amostras são processadas diminuindo assim os efeitos de erros analíticos. Assim, todas as amostras terão a mesma probabilidade de serem escolhidas em cada evento do preparo de amostras para aquisição dos dados analíticos. Isso é particularmente importante quando se trabalha com um grande número de amostras, como em estudos de longo prazo, nos quais as condições experimentais podem variar ao longo do tempo. Essa ordenação aleatória das amostras também contribui para a robustez do estudo, pois os resultados obtidos a partir das amostras não serão influenciados pela sequência em que são analisadas. Portanto, ao planejar a aquisição de dados em um estudo de metabolômica não-alvo, é altamente recomendável considerar a organização das amostras em ordem aleatória como parte das estratégias de garantia de qualidade. De forma prática, é indicado que não se ignore a ordem aleatória das amostras por qualquer que seja o motivo, mesmo que isso leve a situações desagradáveis como ter que modificar a posição de frascos com amostras de grupos semelhantes ou na etapa de trituração a fim de evitar contaminação cruzada entre os diferentes grupos de amostras a serem comparadas. Evitando também que a variação biológica seja confundida com viés sistemático oriundo de desvios de aquisição do aparelho.⁵³⁻⁵⁵ Um exemplo de organização aleatória de amostras já incluindo amostras de controle de qualidade e brancos está mostrado na Figura 2d.

VANTAGENS ANALÍTICAS DE USO DE AMOSTRAS QC NA METABOLÔMICA NÃO-ALVO

Mitigação de erros sistemático e aleatório na metabolômica não-alvo

As etapas de aquisição (analítica) e de processamento dos dados em metabolômica não-alvo, têm como objetivo realizar comparações estatísticas da variação do metaboloma influenciada por perturbações genéticas, tratamentos medicamentosos, fatores ambientais, etc. Essa abordagem tem se mostrado uma ferramenta poderosa na descoberta de biomarcadores e tem um grande potencial na medicina de precisão.^{18,56} No entanto, à medida que o número de amostras aumenta, os desafios relacionados à precisão, exatidão e reprodutibilidade precisam ser abordados adequadamente para evitar erros sistemáticos e reduzir os erros aleatórios.

O conceito de erro sistemático, refere-se a variações que afetam o resultado de uma medição de maneira consistente e direcionada, levando a um viés (do inglês *bias*) ou desvio sistemático do valor verdadeiro da grandeza medida. Este tipo de erro pode surgir devido a falhas ou vieses inerentes ao método de medição, instrumentação, calibração, ou outros fatores que introduzem uma tendência consistente para que as medições se afastem do valor verdadeiro. O erro sistemático é expresso pela característica de desempenho “veracidade” (do inglês *trueness*), que se refere à proximidade de concordância entre o valor médio obtido a partir de uma grande série de resultados de testes e um valor de referência aceito. Em termos mais técnicos, o erro sistemático pode ser quantificado como a tendência, que é a diferença entre a média dos resultados de várias medições em uma mesma amostra (por exemplo, um material de referência certificado) e seu valor (convencionalmente) verdadeiro. Portanto, esta é uma fonte de incerteza que deve ser cuidadosamente avaliada e corrigida, pois pode levar a conclusões incorretas e afetar

a confiabilidade dos resultados de medição. A compreensão e a minimização do erro sistemático são fundamentais para garantir a qualidade e a confiabilidade das medições em contextos analíticos.⁵⁷ A calibração instrumental é, então, uma etapa crucial na eliminação ou na minimização de erros sistemáticos em processos de medição. Durante a calibração, os instrumentos de medição são ajustados ou verificados para assegurar que suas leituras estejam tão próximas quanto possível dos valores verdadeiros das grandezas que estão sendo medidas. Este processo ajuda a identificar e corrigir vieses nos instrumentos, garantindo que os erros sistemáticos sejam reduzidos.

O erro aleatório é descrito como uma das fontes de incerteza que afetam a qualidade das medições analíticas, a precisão dos resultados adquiridos. Sua compreensão é fundamental para minimizar o erro aleatório visando garantir a confiabilidade e a precisão das medições analíticas. Além disso, esse tipo de erro é descrito como a variação imprevisível e não direcionada que leva a uma dispersão dos valores medidos em torno do valor médio da grandeza medida. No contexto de um fluxo de trabalho analítico, o erro aleatório pode surgir de diversas fontes, como diferenças nas leituras de um mesmo resultado realizadas várias vezes por diferentes analistas. Embora essas fontes de erro possam ser reduzidas por meio de um sólido planejamento experimental, otimização de métodos analíticos, instrumentação e processamento de dados, é importante ressaltar que elas não podem ser eliminadas completamente. O objetivo é minimizar o erro aleatório na quantificação a ponto de torná-lo insignificante em comparação com a variação biológica, contribuindo assim para a melhoria da precisão e confiabilidade das medições analíticas.^{11,12,57}

O esquema apresentado na Figura 3 ilustra as relações entre o tipo de erro que afeta uma medição analítica, os conceitos qualitativos correspondentes (características de desempenho) e sua expressão quantitativa. A matriz mostra que o erro sistemático é expresso como “veracidade”, enquanto o erro aleatório é expresso como “precisão”.

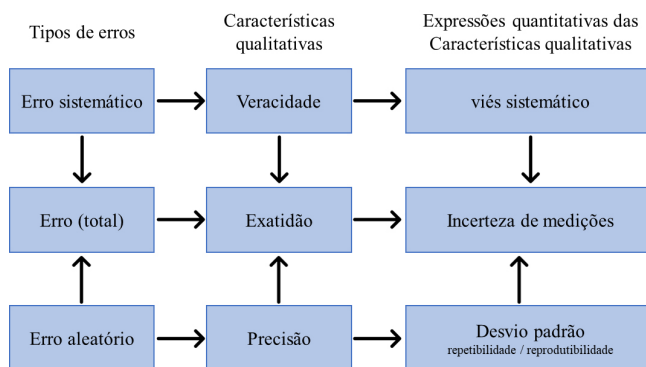


Figura 3. Relações entre tipo de erro, características qualitativas de desempenho e sua expressão quantitativa. As etapas apresentadas consistem: (i) tipos de erro: erros sistemáticos e aleatórios; (ii) características de desempenho: influência qualitativa do erro aleatório na precisão, e a expressão qualitativa do erro sistemático na exatidão; e (iii) expressão quantitativa das características de desempenho: a quantificação da precisão pode ser feita pela análise do desvio padrão de medições repetidas de uma mesma amostra, e a veracidade como a diferença entre a média das medições e o valor verdadeiro, levando a uma tendência quantitativa. Esse esquema fornece uma representação visual das relações entre os tipos de erro, as características de desempenho e suas expressões quantitativas, auxiliando na compreensão dos conceitos fundamentais relacionados à qualidade das medições analíticas. Imagem adaptada de Mendiito et al.⁵⁷ A exatidão de uma medição consiste em uma característica qualitativa da medição, pois de acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia, não se pode atribuir a ela um valor numérico. A exatidão se relaciona com a precisão e a veracidade da medição resultando no componente de erro total que é estimado pela incerteza de medição

Nesse sentido, a distribuição aleatória e quantidade de réplicas de amostras biológicas são de importância fundamental para os cálculos dos parâmetros estatísticos. A precisão dos dados aumenta à medida que o número de réplicas biológicas aumenta. Por isso que estudos com muitas variáveis necessitam de um grande número de amostras para obtenção de resultados mais acurados. O cálculo da média, desvio padrão e variância (desvio padrão relativo) fornece informações sobre a precisão dos resultados. O desvio padrão é particularmente importante, pois quanto menor ele for, mais próximos os dados estão da média e, portanto, mais próximos dos valores “verdadeiros”. O desvio padrão da média fornece um intervalo de confiança no qual se espera que a média da população esteja contida.

Portanto, o planejamento do estudo deve ser discutido em conjunto com todo o grupo de pesquisadores antes das etapas de execução do projeto serem iniciadas. Além disso, é importante observar que, embora as amostras (réplicas) apresentem uma pequena variação biológica entre si devido à coleta de indivíduos diferentes em um mesmo grupo (por exemplo, controle e teste), essa variação não deve ser considerada da mesma forma que os erros aleatórios. Afinal, este é um dos motivos pelo qual a etapa de planejamento do estudo é importante e deve incluir todo o grupo pluridisciplinar responsável por ele. O planejamento cuidadoso do estudo permite a resolução de metas claras, a seleção das técnicas analíticas apropriadas, a escolha das amostras representativas e a organização das sequências de análise. Além disso, a pluridisciplinaridade do grupo de pesquisa facilita a avaliação de fatores que podem afetar os resultados, como efeitos de lote, contaminações, variações biológicas e outros. As discussões entre os membros da equipe ajudam a estabelecer critérios de qualidade, padrões de relatórios, e a desenvolver protocolos de QA adequados para o estudo. Dessa forma, a colaboração pluridisciplinar é essencial para a criação de um ambiente de pesquisa robusto e confiável.

Condicionamento do sistema na metabolômica não-alvo

Antes de iniciar a análise das amostras biológicas, é crucial garantir que o sistema instrumental esteja devidamente condicionado para garantir o desempenho analítico. Esse processo envolve a realização de atividades com amostras destinadas a verificar a adequação do sistema (por exemplo, QC-*pool*) e amostras QC-branco, projetadas para testar as métricas de desempenho analítico que qualificarão o instrumento como “adequado ao propósito” antes de analisar as amostras biológicas de teste.

Uma abordagem simples para verificar a adequação do sistema é iniciar com um gradiente “em branco” (sem qualquer amostra) o que revelará problemas relacionados a impurezas nos solventes ou contaminação do sistema cromatográfico. Se o resultado for positivo, a análise de uma solução contendo um pequeno número de materiais de referência certificados (MRCs) para calibração dissolvidos no diluente cromatograficamente adequado pode ser realizada.³⁹ Os dados adquiridos dessas amostras podem ser avaliados quanto à exatidão e precisão por meio de uma abordagem computacional automatizada.³³

Se os critérios de aceitação (resolução de picos cromatográficos, intensidade de íons conhecidos, calibração de sistemas de alta e ultra resolução, não observação de contaminantes no sistema, etc.) forem atendidos, o processamento da amostra e a aquisição de dados podem ser iniciados. Caso contrário, é necessário realizar manutenção corretiva no sistema analítico e reanalisar a solução de verificação de adequação do sistema. No caso de sistemas como LC-MS ou GC-MS, os resultados das amostras são avaliados com base na razão massa-carga (m/z) e características cromatográficas, incluindo tempo de retenção, área de pico, e comparados com critérios de aceitação

predefinidos.^{7,8} Em RMN, alguns resultados podem ser analisados através de associações lineares entre intensidades médias das amostras de QC, supressão do sinal de água e deslocamento químico.^{58,59} Os critérios de aceitação podem ser adaptados aos requisitos específicos do laboratório para cada ensaio analítico, uma vez que atualmente não existe um critério de aceitação universalmente aceito pela comunidade de metabolômica não-alvo.^{11,12,60,61}

Controle de desempenho do sistema

Após a verificação de que a plataforma analítica está adequadamente condicionada para a análise das amostras biológicas, é prática comum injetar e analisar amostras QC no início e no final de um lote, bem como em intervalos regulares durante a análise. Isso é feito para monitorar a estabilidade e a reprodutibilidade do processo analítico, o que é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados. Esse monitoramento ajuda a entender até que ponto o sistema permanece estável e em que ponto a intervenção de manutenção do aparelho se torna necessária.¹²

Por exemplo, em um estudo realizado por Gika *et al.*,⁶² a variabilidade diária de um método de LC-MS foi estimada para avaliar a robustez de um sistema analítico. Os autores analisaram repetidamente um conjunto de 60 amostras de urina durante cinco dias para determinar a reprodutibilidade dos dados. Os resultados mostraram que foi possível executar as análises por 3 dias consecutivos sem a necessidade de manutenção do sistema, o que é um dado interessante para o planejamento das análises em metabolômica. Outro estudo realizado por Zelena *et al.*⁶³ determinou que após a injeção de 100 amostras de plasma humano, o sistema perderia eficiência levando a discrepâncias na precisão dos dados intra-lote. Nesse estudo específico, concluiu-se que o tamanho ideal do lote era de 60 amostras, incluindo as amostras de QC variados. No entanto, esse ponto deve ser cautelosamente abordado e discutido pelo grupo de pesquisa, pois a robustez de um sistema analítico pode depender do tipo de sistema e da manutenção do mesmo. Por exemplo, para um sistema de LC-MS de alta resolução é recomendado que seja feita a calibração do sistema diariamente. Sendo assim, o emprego de amostras de QC é fundamental para identificar quando a intervenção é necessária e para garantir a robustez analítica.

Efeito de lote (*batch effect*) em metabolômica não-alvo e suas etapas de identificação e correção

O efeito de lote (do inglês *batch effect*) é um fenômeno que pode ocorrer em estudos de metabolômica não-alvo, especialmente quando há um grande número de amostras que demanda longo tempo de aquisição, onde se faz necessário a divisão em lotes de amostras para análise. O efeito de lote resulta de erros sistemáticos e aleatórios que podem interferir na observação da variância biológica, tornando a interpretação dos dados desafiadora.⁶⁴ A identificação e correção do efeito de lote envolvem várias etapas de processamento de dados, como:⁶⁵⁻⁶⁷

1. Avaliação inicial

Nesta etapa, a magnitude e intensidade dos dados são determinadas. Gráficos, como a PCA (Figura 4) e os *box plots*, são usados para verificar a variância e a presença de outliers nas amostras. Além disso, correlações entre amostras do mesmo lote e entre amostras de lotes diferentes são examinadas. Se as amostras do mesmo lote apresentarem correlações mais altas entre si do que com amostras de outros lotes, isso pode ser uma forte indicação de efeito de lote. Essa variação geralmente é visualizada com bases nos resultados das amostras de QC.

2. Normalização

A normalização é uma etapa crítica para corrigir o efeito de lote. Ela envolve a aplicação de métodos estatísticos para ajustar os dados e remover o viés introduzido pelo efeito de lote. Esses métodos procuram tornar os dados comparáveis entre diferentes lotes, permitindo uma análise mais precisa da variabilidade biológica. A normalização é aplicada nos lotes e guiada com base nos resultados de QC. Isso devido ao fato de que se os dados são oriundos da mesma fonte biológica, todos os devem apresentar as mesmas características, ou seja, devem ser iguais. E como estas amostras estão distribuídas aleatoriamente dentro dos lotes, todas as manipulações analíticas e pós-analíticas visualizadas nas amostras de QC devem ser expandidas para as amostras teste devido ambas estarem sob o mesmo “ambiente” de pesquisa.

3. Diagnóstico

Nesta etapa, são realizadas análises e gráficos para verificar se a normalização foi eficaz na remoção do efeito de lote, as mesmas utilizadas na etapa de avaliação inicial. As mesmas análises estatísticas citadas acima podem ser empregadas novamente para visualizar se o efeito de lote foi adequadamente corrigido.

4. Correção de efeito de lote

Se for identificado que o efeito de lote não foi completamente corrigido na etapa de normalização, podem ser aplicadas técnicas estatísticas avançadas para reduzir ainda mais esse efeito. Alguns métodos comuns incluem o uso de modelos lineares mistos e análise de variância (ANOVA) para remover o efeito de lote residual.

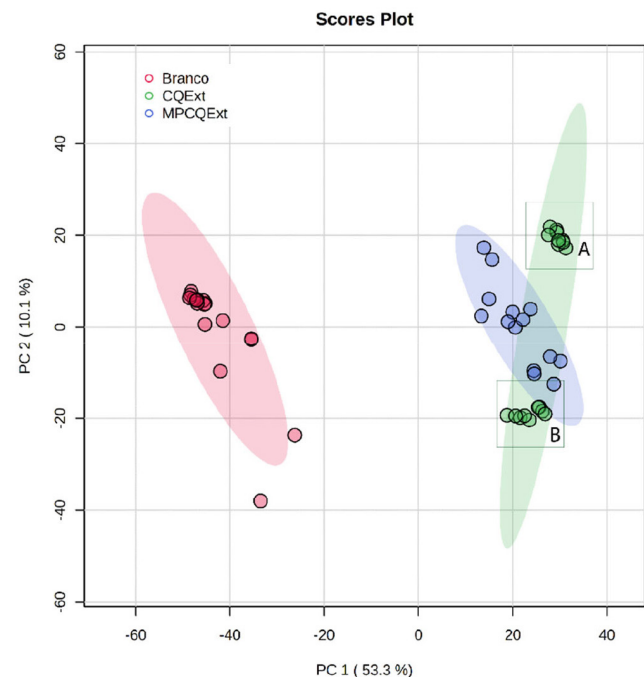


Figura 4. Exemplo de um gráfico que apresenta os scores obtidos de uma análise de componentes principais (PCA) realizada em amostras de controle de qualidade. Três tipos de amostras são representados: amostras branco, amostras de controle de qualidade externo (QCExt), e amostras obtidas a partir da matéria-prima das QCExt (MPCQExt). A separação das amostras QCExt em subgrupos ‘A’ e ‘B’ indicam a presença de um efeito de lote. Idealmente, não deveria haver agrupamento das amostras QCExt se não existisse o efeito de lote

O objetivo final dessas etapas é garantir que a variabilidade observada nos dados seja predominantemente de natureza biológica,

permitindo uma interpretação precisa e confiável dos resultados da pesquisa. A identificação e correção adequada do efeito de lote são essenciais para evitar conclusões errôneas e garantir a validade dos resultados em estudos de metabolômica não-direcionada.

Os métodos de normalização estatística são amplamente utilizados na metabolômica, e alguns destes envolvem o uso de amostras de QC-pool como referência. Teoricamente, todas as amostras de QC-pool devem ter a mesma concentração das amostras de um estudo e estas concentrações devem ser as mesmas para as diferentes alíquotas. Portanto, qualquer variação entre as amostras de QC reflete a variabilidade analítica induzida durante a aquisição de dados. Quando a variabilidade entre lotes é significativa, as variações entre as amostras de QC também aumentam, o que é um indicador do impacto do efeito de lote.^{66,68,69}

Para diagnosticar os dados normalizados, várias abordagens podem ser usadas como os gráficos de PCA e agrupamento hierárquico (HCA do inglês *hierarchical cluster analysis*), por exemplo. O PCA é uma técnica matemática que identifica as principais direções de variação nos dados, representadas como componentes principais. Em análises comparativas como em metabolômica, ele permite visualizar a proximidade das amostras em um espaço multidimensional e identificar se há padrões de agrupamento por fatores técnicos ou biológicos, nesse caso é importante ter os metadados bem-organizados, o que facilita a identificação de agrupamentos conforme o estudo em questão. Vale ressaltar que metadados bem-organizados também podem ser aliados no controle de qualidade dos dados, por exemplo para identificação de outliers, entre outros. O HCA é um algoritmo que agrupa amostras semelhantes em um dendrograma, uma estrutura semelhante a uma árvore. Esse dendrograma revela como as amostras se agrupam com base em semelhanças, o que pode ser colorido para destacar fatores técnicos e biológicos que influenciam o agrupamento.⁶⁵

A correção de efeito de lote, frequentemente baseada em amostras de QC,⁶⁶ é uma abordagem recomendada devido à facilidade de controle e visualização das mudanças no desempenho instrumental. As amostras de QC refletem a mudança gradual da sensibilidade do instrumento, o que é útil para corrigir variações dentro do lote. Além disso, as amostras de QC fornecem um critério quantitativo para avaliar a eficácia da remoção do efeito de lote, ajudando a reduzir o desvio padrão relativo entre essas amostras.

A remoção do efeito de lote é considerada bem-sucedida quando a semelhança entre as amostras não é mais influenciada por fatores técnicos. Isso significa que não há agrupamento por lote visível no PCA ou no HCA, e a correlação entre amostras do mesmo lote não é mais significativamente maior do que a correlação entre amostras não relacionadas dentro do mesmo lote.⁶⁵

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metabolômica não-alvo é uma ferramenta poderosa que é aplicada em uma variedade de pesquisas multidisciplinares em todo o mundo. No entanto, a falta de padronização nos fluxos de trabalho e na documentação da qualidade dos dados é um desafio significativo que afeta a reprodutibilidade, a troca de dados experimentais e a credibilidade do conhecimento científico. Ora, se um estudo não é reprodutivo, não é científico.

A padronização da descrição dos dados de QA/QC e sua respectiva implementação nos trabalhos científicos é fundamental para superar essas deficiências. Esses padrões podem ajudar a estabelecer diretrizes claras para documentar e relatar a qualidade dos dados em publicações científicas e repositórios de dados. Isso incluiria a descrição de todos os passos do processo de análise, desde a coleta de amostras até a interpretação dos resultados, garantindo a transparência

e a rastreabilidade dos procedimentos. A publicação dos dados de QC, juntamente com o estudo, em bancos de dados ou repositórios apropriados é uma prática recomendada. Isso não apenas permite a verificação independente dos resultados, mas também promove a colaboração científica e facilita a comparação e o compartilhamento de dados entre diferentes pesquisadores e laboratórios. A disponibilidade de dados de QC públicos e padronizados pode ser um recurso valioso para a comunidade científica, ajudando a melhorar a qualidade e a reprodutibilidade das pesquisas em metabolômica não-alvo.

Em última análise, a adoção de fluxos de trabalho padronizados e a implementação de normas para a documentação da qualidade dos dados são essenciais para o avanço da metabolômica não-alvo e para garantir que os resultados sejam confiáveis, verificáveis e amplamente aceitos pela comunidade científica.

E, finalmente, o planejamento do estudo em metabolômica não-alvo é de extrema importância e requer uma abordagem pluridisciplinar. A colaboração de especialistas de diversas áreas, como química analítica, biologia, estatística, bioinformática e outras disciplinas, é fundamental na definição de estratégias que garantam a qualidade dos dados e a interpretação adequada dos resultados. Assim, este documento convida a comunidade brasileira de metabolômica a debates saudáveis sobre QA/QC bem como adoção de boas práticas laboratoriais, contribuindo para o seu desenvolvimento nacional.

AGRADECIMENTOS

A. M. Teixeira é grato ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo: 130696/2022-6, modalidade: bolsa de mestrado, cotas do Programa de Pós-Graduação, e ao Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors (IPPN-UFRJ) pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Borges, R. M.; Resende, J. V. M.; *Quim. Nova* **2021**, *44*, 1392. [Crossref]
- Borges, R. M.; Colby, S. M.; Das, S.; Edison, A. S.; Fiehn, O.; Kind, T.; Lee, J.; Merrill, A. T.; Merz Jr., K. M.; Metz, T. O.; Nunez, J. R.; Tantillo, D. J.; Wang, L.-P.; Wang, S.; Renslow, R. S.; *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 5633. [Crossref]
- González-Riano, C.; Dudzik, D.; Garcia, A.; Gil-de-la-Fuente, A.; Gradillas, A.; Godzien, J.; López-González, Á.; Rey-Stolle, F.; Rojo, D.; Ruperez, F. J.; Saiz, J.; Barbas, C.; *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 203. [Crossref]
- Pilon, A. C.; Selegato, D. M.; Fernandes, R. P.; Bueno, P. C. P.; Pinho, D. R.; Carnevale Neto, F.; Freire, R. T.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova* **2020**, *43*, 329. [Crossref]
- Marchev, A. S.; Vasileva, L. V.; Amirova, K. M.; Savova, M. S.; Balcheva-Sivenova, Z. P.; Georgiev, M. I.; *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 6487. [Crossref]
- Uppal, K.; Walker, D. I.; Liu, K.; Li, S.; Go, Y.-M.; Jones, D. P.; *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 1956. [Crossref]
- Boufridi, A.; Quinn, R. J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 1334. [Crossref]
- Belinato, J. R.; Bazioli, J. M.; Sussulini, A.; Augusto, F.; Fill, T. P.; *Quim. Nova* **2019**, *42*, 546. [Crossref]
- Fiehn, O.; *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155. [Crossref]
- Maimone, N. M.; Pereira, A. K.; Gimenes, L.; Fernandes, H. P.; Fill, T. P.; Borges, R. M.; Lira, S. P.; Fernandes, J. B.; Bauermeister, A.; *Rev. Virtual Quim.* **2024**, *16*, 248. [Crossref]
- Broadhurst, D.; Goodacre, R.; Reinke, S. N.; Kuligowski, J.; Wilson, I. D.; Lewis, M. R.; Dunn, W. B.; *Metabolomics* **2018**, *14*, 72. [Crossref]
- Dudzik, D.; Barbas-Bernardos, C.; García, A.; Barbas, C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *147*, 149. [Crossref]
- Baddini, A. L. Q.; Pereira Netto, A. D.; Teixeira, V. L.; *Rev. Virtual Quim.* **2014**, *6*, 396. [Crossref]
- Bijlsma, S.; Bobeldijk, I.; Verheij, E. R.; Ramaker, R.; Kochhar, S.; Macdonald, I. A.; van Ommen, B.; Smilde, A. K.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 567. [Crossref]
- Harada, S.; Hirayama, A.; Chan, Q.; Kurihara, A.; Fukai, K.; Iida, M.; Kato, S.; Sugiyama, D.; Kuwabara, K.; Takeuchi, A.; Akiyama, M.; Okamura, T.; Ebbels, T. M. D.; Elliott, P.; Tomita, M.; Sato, A.; Suzuki, C.; Sugimoto, M.; Soga, T.; Takebayashi, T.; *PLoS One* **2018**, *13*, e0191230. [Crossref]
- Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M. H.; Beger, R.; Daykin, C. A.; Fan, T. W.-M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J. L.; Hankemeier, T.; Hardy, N.; Harnly, J.; Higashi, R.; Kopka, J.; Lane, A. N.; Lindon, J. C.; Marriott, P.; Nicholls, A. W.; Reilly, M. D.; Thaden, J. J.; Viant, M. R.; *Metabolomics* **2007**, *3*, 211. [Crossref]
- Funari, C. S.; Castro-Gamboa, I.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. D. S.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 1605. [Crossref]
- Misra, B. B.; *Metabolomics* **2021**, *17*, 49. [Crossref]
- Mannochio-Russo, H.; Nunes, W. D. G.; Almeida, R. F.; Albernaz, L. C.; Espindola, L. S.; Bolzani, V. S.; *J. Nat. Prod.* **2023**, *86*, 621. [Crossref]
- Robinette, S. L.; Brüscheweiler, R.; Schroeder, F. C.; Edison, A. S.; *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 288. [Crossref]
- Kuhn, S.; Colreavy-Donnelly, S.; de Souza, J. S.; Borges, R. M.; *Faraday Discuss.* **2019**, *218*, 339. [Crossref]
- Beger, R. D.; Dunn, W. B.; Bandukwala, A.; Bethan, B.; Broadhurst, D.; Clish, C. B.; Dasari, S.; Derr, L.; Evans, A.; Fischer, S.; Flynn, T.; Hartung, T.; Herrington, D.; Higashi, R.; Hsu, P.-C.; Jones, C.; Kachman, M.; Karuso, H.; Kruppa, G.; Lippa, K.; Maruvada, P.; Mosley, J.; Ntai, I.; O'Donovan, C.; Playdon, M.; Raftery, D.; Shaughnessy, D.; Souza, A.; Spaeder, T.; Spalholz, B.; Tayyari, F.; Ubhi, B.; Verma, M.; Walk, T.; Wilson, I.; Witkin, K.; Bearden, D. W.; Zanetti, K. A.; *Metabolomics* **2019**, *15*, 4. [Crossref]
- FDA-2013-D-1020: *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*; U. S. Food and Drug Administration/Center for Drug Evaluation and Research, Silver Spring, USA, 2018. [Link] acessado em Agosto 2024
- Resolução RDC No. 301, de 21 de agosto de 2019, *Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos*; Ministério da Saúde, Brasil, 2019. [Link] acessado em Agosto 2024
- Documentos Aplicáveis aos Inspectores Segundo as Boas Práticas de Laboratório – BPL, http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?Organismo=Inspectores-BPL, acessado em Agosto 2024
- Magnusson, B.; Örnemark, U., eds.; *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed.; Eurachem: Gembloux, Belgium, 2014. [Link] acessado em Agosto 2024
- Borges, R. M.; Ferreira, G. A.; Campos, M. M.; Teixeira, A. M.; Costa, F. N.; das Chagas, F. O.; Colonna, M.; *Phytochem. Anal.* **2023**, *34*, 385. [Crossref]
- Phinney, K. W.; Ballihaut, G.; Bedner, M.; Benford, B. S.; Camara, J. E.; Christopher, S. J.; Davis, W. C.; Dodder, N. G.; Eppe, G.; Lang, B. E.; Long, S. E.; Lowenthal, M. S.; McGaw, E. A.; Murphy, K. E.; Nelson, B. C.; Prendergast, J. L.; Reiner, J. L.; Rimmer, C. A.; Sander, L. C.; Schantz, M. M.; Sharpless, K. E.; Sniegoski, L. T.; Tai, S. S.-C.; Thomas, J. B.; Vetter, T. W.; Welch, M. J.; Wise, S. A.; Wood, L. J.; Guthrie, W. F.; Hagwood, C. R.; Leigh, S. D.; Yen, J. H.; Zhang, N.-F.; Chaudhary-Webb, M.; Chen, H.; Fazili, Z.; LaVoie, D. J.; McCoy, L. F.; Momin, S. S.; Paladugula, N.; Pendergrast, E. C.; Pfeiffer, C. M.; Powers, C. D.; Rabinowitz, D.; Rybak, M. E.; Schleicher, R. L.; Toombs, B. M. H.; Xu, M.; Zhang, M.; Castle, A. L.; *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 11732. [Crossref]
- Borges, R. M.; Resende, J. V. M.; de Moraes, A. O.; Pereira, A. K.;

- Garrett, R.; Bauermeister, A.; da Silva, A. J. R.; *Quim. Nova* **2022**, *45*, 608. [Crossref]
30. Engskog, M. K. R.; Haglöf, J.; Arvidsson, T.; Pettersson, C.; *Metabolomics* **2016**, *12*, 114. [Crossref]
31. Hunter, P.; *EMBO Rep.* **2017**, *18*, 1493. [Crossref]
32. Andersen, J. E. T.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2014**, *60*, 16. [Crossref]
33. Lippa, K. A.; Aristizabal-Henao, J. J.; Beger, R. D.; Bowden, J. A.; Broeckling, C.; Beecher, C.; Davis, W. C.; Dunn, W. B.; Flores, R.; Goodacre, R.; Gouveia, G. J.; Harms, A. C.; Hartung, T.; Jones, C. M.; Lewis, M. R.; Ntai, I.; Percy, A. J.; Raftery, D.; Schock, T. B.; Sun, J.; Theodoridis, G.; Tayyari, F.; Torta, F.; Ulmer, C. Z.; Wilson, I.; Ubhi, B. K.; *Metabolomics* **2022**, *18*, 24. [Crossref]
34. Beisken, S.; Eiden, M.; Salek, R. M.; *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15*, 97. [Crossref]
35. Evans, A. M.; O'Donovan, C.; Playdon, M.; Beecher, C.; Beger, R. D.; Bowden, J. A.; Broadhurst, D.; Clish, C. B.; Dasari, S.; Dunn, W. B.; Griffin, J. L.; Hartung, T.; Hsu, P.-C.; Huan, T.; Jans, J.; Jones, C. M.; Kachman, M.; Kleensang, A.; Lewis, M. R.; Monge, M. E.; Mosley, J. D.; Taylor, E.; Tayyari, F.; Theodoridis, G.; Torta, F.; Ubhi, B. K.; Vuckovic, D.; on behalf of the Metabolomics Quality Assurance and Quality Control Consortium (mQACC); *Metabolomics* **2020**, *16*, 113. [Crossref]
36. Godzien, J.; Alonso-Herranz, V.; Barbas, C.; Armitage, E. G.; *Metabolomics* **2015**, *11*, 518. [Crossref]
37. Kirwan, J. A.; Gika, H.; Beger, R. D.; Bearden, D.; Dunn, W. B.; Goodacre, R.; Theodoridis, G.; Witting, M.; Yu, L.-R.; Wilson, I. D.; on behalf of the metabolomics Quality Assurance and Quality Control Consortium (mQACC); *Metabolomics* **2022**, *18*, 70. [Crossref]
38. Sangster, T.; Major, H.; Plumb, R.; Wilson, A. J.; Wilson, I. D.; *Analyst* **2006**, *131*, 1075. [Crossref]
39. Kuligowski, J.; Pérez-Guaita, D.; Lliso, I.; Escobar, J.; León, Z.; Gombau, L.; Solberg, R.; Saugstad, O. D.; Vento, M.; Quintás, G.; *Talanta* **2014**, *130*, 442. [Crossref]
40. Yanes, O.; Tautenhahn, R.; Patti, G. J.; Siuzdak, G.; *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2152. [Crossref]
41. Yao, C.-H.; Liu, G.-Y.; Yang, K.; Gross, R. W.; Patti, G. J.; *Metabolomics* **2016**, *12*, 143. [Crossref]
42. Mitulović, G.; Stingl, C.; Steinmacher, I.; Hudecz, O.; Hutchins, J. R. A.; Peters, J.-M.; Mechtler, K.; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5955. [Crossref]
43. Naz, S.; Vallejo, M.; García, A.; Barbas, C.; *J. Chromatogr. A* **2014**, *1353*, 99. [Crossref]
44. Yin, P.; Xu, G.; *J. Chromatogr. A* **2014**, *1374*, 1. [Crossref]
45. Gouveia, G. J.; Shaver, A. O.; Garcia, B. M.; Morse, A. M.; Andersen, E. C.; Edison, A. S.; McIntyre, L. M.; *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 9193. [Crossref]
46. Torres, C. L.; Scalco, F. B.; de Oliveira, M. L. C.; Peake, R. W. A.; Garrett, R.; *Clin. Chim. Acta* **2023**, *541*, 117250. [Crossref]
47. Bunk, D. M.; *Clin. Biochem. Rev.* **2007**, *28*, 131. [Link] acessado em Agosto 2024
48. Quevauviller, P.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 76. [Crossref]
49. ABNT ISO GUIA 80: *Guia para a Preparação Interna (in-house) de Materiais de Controle da Qualidade (MCQ)*; ABNT: São Paulo, Brazil, 2023. [Link] acessado em Fevereiro 2024
50. Bharti, S. K.; Roy, R.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2012**, *35*, 5. [Crossref]
51. Chauthe, S. K.; Sharma, R. J.; Aqil, F.; Gupta, R. C.; Singh, I. P.; *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 689. [Crossref]
52. Jaki, B. U.; Bzhelyansky, A.; Pauli, G. F.; *Magn. Reson. Chem.* **2021**, *59*, 7. [Crossref]
53. Dunn, W. B.; Wilson, I. D.; Nicholls, A. W.; Broadhurst, D.; *Bioanalysis* **2012**, *4*, 2249. [Crossref]
54. Gika, H. G.; Zisi, C.; Theodoridis, G.; Wilson, I. D.; *J. Chromatogr. B* **2016**, *1008*, 15. [Crossref]
55. Jonsson, P.; Wuolikainen, A.; Thysell, E.; Chorell, E.; Stattin, P.; Wikström, P.; Antti, H.; *Metabolomics* **2015**, *11*, 1667. [Crossref]
56. Shaver, A. O.; Garcia, B. M.; Gouveia, G. J.; Morse, A. M.; Liu, Z.; Asef, C. K.; Borges, R. M.; Leach, F. E.; Andersen, E. C.; Amster, I. J.; Fernández, F. M.; Edison, A. S.; McIntyre, L. M.; *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 930204. [Crossref]
57. Menditto, A.; Patriarca, M.; Magnusson, B.; *Accredit. Qual. Assur.* **2007**, *12*, 45. [Crossref]
58. Maroli, A. S.; Powers, R.; *NMR Biomed.* **2023**, *36*, e4594. [Crossref]
59. Muti, I. H.; Sanchez-Dahl, M. G.; Zhong, A. B.; Weng, J.; Füzesi, M. V.; Kivisäkk, P.; Hyman, B. T.; Arnold, S. E.; Feldman, A. S.; Mercaldo, N. D.; Cheng, L. L.; *NMR Biomed.* **2023**, *36*, e4868. [Crossref]
60. Bose, A.; *Austin Chromatography* **2014**, *1*, 4. [Link] acessado em Agosto 2024
61. Want, E. J.; Wilson, I. D.; Gika, H.; Theodoridis, G.; Plumb, R. S.; Shockcor, J.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1005. [Crossref]
62. Gika, H. G.; Theodoridis, G. A.; Earll, M.; Wilson, I. D.; *Bioanalysis* **2012**, *4*, 2239. [Crossref]
63. Zelena, E.; Dunn, W. B.; Broadhurst, D.; Francis-McIntyre, S.; Carroll, K. M.; Begley, P.; O'Hagan, S.; Knowles, J. D.; Halsall, A.; HUSERMET Consortium; Wilson, I. D.; Kell, D. B.; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1357. [Crossref]
64. De Livera, A. M.; Sysi-Aho, M.; Jacob, L.; Gagnon-Bartsch, J. A.; Castillo, S.; Simpson, J. A.; Speed, T. P.; *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3606. [Crossref]
65. Čuklina, J.; Lee, C. H.; Williams, E. G.; Sajic, T.; Collins, B. C.; Rodríguez Martínez, M.; Sharma, V. S.; Wendt, F.; Goetze, S.; Keele, G. R.; Wollscheid, B.; Aebersold, R.; Pedrioli, P. G. A.; *Mol. Syst. Biol.* **2021**, *17*, e10240. [Crossref]
66. Han, W.; Li, L.; *Mass Spectrom. Rev.* **2022**, *41*, 421. [Crossref]
67. Mizuno, H.; Ueda, K.; Kobayashi, Y.; Tsuyama, N.; Todoroki, K.; Min, J. Z.; Toyo'oka, T.; *Biomed. Chromatogr.* **2017**, *31*, e3864. [Crossref]
68. Goh, W. W. B.; Wang, W.; Wong, L.; *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 498. [Crossref]
69. Dunn, W. B.; Broadhurst, D.; Begley, P.; Zelena, E.; Francis-McIntyre, S.; Anderson, N.; Brown, M.; Knowles, J. D.; Halsall, A.; Haselden, J. N.; Nicholls, A. W.; Wilson, I. D.; Kell, D. B.; Goodacre, R.; The Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium; *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1060. [Crossref]