

## AVALIAÇÃO DE A1C E GLICOSE POR DRIFTS: UMA NOVA ABORDAGEM ANALÍTICA PARA DIAGNÓSTICO DE *DIABETES MELLITUS*

Vitor Estevam Severo<sup>1</sup>  
Cynthia Caetano<sup>2</sup>  
Jorge Horta<sup>3</sup>  
Míriam Beatris Reckziegel<sup>4</sup>  
Hildegard Hedwig Pohl<sup>5</sup>  
Valeriano Antonio Corbellini<sup>6</sup>

### RESUMO

O *diabetes mellitus* (DM) inclui um grupo de doenças metabólicas resultante de disfunção na secreção e/ou ação da insulina. O diagnóstico de DM é definido com base na avaliação da glicemia de jejum (GJ) e hemoglobina glicada (A<sub>1C</sub>), que também informa a persistência da hiperglicemia. Entretanto, novas tecnologias analíticas estão sempre sob constante investigação. A espectroscopia de absorção molecular no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) associada à análise multivariada tem surgido como uma alternativa nesse contexto. O presente estudo buscou avaliar a FT-IR, através da técnica de reflectância difusa, para quantificar glicose e A<sub>1C</sub> em um grupo de indivíduos adultos. O estudo foi composto por 46 pacientes de 32 a 59 anos, com valores GJ de 71,67 a 135 mg/dL e de A<sub>1C</sub> de 5,3 a 7,2 %. O modelo PLS-DRIFTS para GJ apresentou RMSECV=1,37 mg/dL e R<sup>2</sup>=0,995 e para A<sub>1C</sub>, RMSECV=0,06% R<sup>2</sup>=0,993, sem exclusão de amostras e usando a faixa de 4000-2401, 2300-600 cm<sup>-1</sup>. Dessa forma foi possível concluir que FT-IR associada à análise multivariada se mostrou adequada para predizer os parâmetros bioquímicos de glicose e A<sub>1C</sub> de jejum com um erro mínimo, atendendo aos requisitos analíticos da ANVISA para quantificação destes parâmetros.

**Palavras-chave:** Hiperglicemia. Espectroscopia no Infravermelho. Metabolômica. Diabetes Mellitus.

### ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) includes a group of metabolic diseases resulting from dysfunction in the secretion and/or insulin action. The diagnosis of DM is defined based on the evaluation of fasting glucose (FPG) and glycosylated hemoglobin (A<sub>1C</sub>), which also shows the persistence of hyperglycemia. However, new analytical technologies are always under constant investigation. The molecular absorption infrared spectroscopy with Fourier-transformed (FT-IR) associated with multivariate analysis has emerged as an alternative in this context. The present study sought to evaluate the FT-IR, through the technique of diffuse reflectance, to quantify glucose and A<sub>1C</sub> in a group of adults. The study comprised 46 patients 32-59 years-

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Medicina da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC <[vitors@mx2.unisc.br](mailto:vitors@mx2.unisc.br)>

<sup>2</sup> Professora do Departamento de Biologia e Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. <[cynthiac.nefro@gmail.com](mailto:cynthiac.nefro@gmail.com)>

<sup>3</sup> Professor do Departamento de Biologia e Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. <[jhorta@unisc.br](mailto:jhorta@unisc.br)>

<sup>4</sup> Professora do Departamento de Educação Física e Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. <[miriam@unisc.br](mailto:miriam@unisc.br)>

<sup>5</sup> Professora do Departamento de Educação Física e Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. <[hpohl@unisc.br](mailto:hpohl@unisc.br)>

<sup>6</sup> Professor do Departamento de Química da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. <[valer@unisc.br](mailto:valer@unisc.br)>

old with FPG values 71,67 to 135 mg/dL and  $A_{1C}$  5,3 to 7,2 %. The model PLS- DRIFTS showed the RMSECV=1,37 mg/dL and  $R^2=0.995$  and  $A_{1C}$ , RMSECV=0,06 %  $R^2=0.993$  and without exclusion of samples using the range 4000-2401, 2300-600 $cm^{-1}$ . Thus, it was concluded that FT-IR associated with multivariate analysis was adequate for predicting biochemical parameters of glucose and  $A_{1C}$  fasting with minimal error, given the analytical requirements of ANVISA to quantify these parameters.

**Keywords:** Hyperglycemia. Infrared Spectroscopy. Metabolomics. Diabetes Mellitus.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o *diabetes mellitus* (DM) atinge milhões de pessoas em diferentes regiões no mundo, tornando-se uma epidemia mundial, aumentando drasticamente a morbimortalidade devido a suas complicações.

A maior parte das pessoas com diabetes encontram-se nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Devido a isso, deve-se investir em políticas de promoção da saúde para que essas pessoas possam ter uma melhora na sua expectativa de vida. Muitas prefeituras, além dos Estados no país, distribuem medicação grátis, assim como promovem palestras informativas.

Diariamente, o paciente diabético pode controlar sua glicemia através das fitas reagentes. Este teste, no entanto, não é aconselhado para fins de diagnóstico, pois a margem de erro é significativa. Para um primeiro diagnóstico pode ser feito um teste sanguíneo de glicemia em jejum. Existem outros exames complementares como o  $HbA_{1C}$  (hemoglobina glicada), que também pode ser utilizado para fins de diagnóstico apesar da sua maior eficiência no controle do diabetes.

Somando-se a isso, cada vez mais a espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) tem se mostrado eficaz na análise de parâmetros bioquímicos. Desta forma, criar modelos de correlação entre parâmetros como glicemia de jejum e hemoglobina glicada ( $A_{1C}$ ) e FT-IR aliada à análise multivariada seria um grande benefício para as pessoas que convivem com o diabetes, além de ser mais uma ferramenta em prol da saúde.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O *diabetes mellitus* (DM) inclui um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia, resultante de disfunção na secreção de insulina e/ou em sua ação. A hiperglicemia se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que podem levar a risco de vida. A hiperglicemia crônica está associada a dano, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (GROSS et al., 2002).

De forma geral, uma epidemia de *diabetes mellitus* (DM) está em curso. Em 1985 estimava-se haver 30 milhões de adultos com DM no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002 e com projeções de chegar a 300 milhões em 2030. Cerca de dois terços desses indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, coexistindo com o problema que as doenças infecciosas ainda representam (WILD et al., 2004).

O diagnóstico do DM, especificamente do tipo 2 (DM2), é precedido pela instalação de um conjunto de alterações nas vias do metabolismo da glicose e insulina que, na prática, representa um risco aumentado para o desenvolvimento de DM2. A alteração da glicose de jejum e/ou da tolerância à glicose, decorrentes da resistência periférica à ação da insulina e às mudanças no padrão do metabolismo das lipoproteínas, estão fortemente associadas ao estado pré-diabético (TABAK et al., 2009; VALCARCEL et al., 2011).

Considerando também que as alterações metabólicas relacionadas ao estado pré-diabético são potencialmente reversíveis com a inclusão de hábitos de vida mais saudáveis, como a redução da obesidade e incentivo à atividade física, é de fundamental importância que estejam à disposição dos profissionais da saúde ferramentas que possibilitem um diagnóstico precoce daqueles indivíduos em risco metabólico (TUOMILEHTO et al., 2001).

Somando-se a isso, o DM é um dos principais desafios aos sistemas de saúde e seu manejo implica, além das mudanças no estilo de vida, novas estratégias políticas de desenvolvimento na área de prevenção e promoção da saúde. Tem sido demonstrado que pessoas com diabetes têm uma redução da qualidade e expectativa de vida quando comparadas a indivíduos não diabéticos. Além disso, o diabetes e a tolerância à glicose diminuída estão aparecendo cada vez mais entre pessoas mais jovens, com súbito aumento na faixa etária abaixo de 30 anos. Esta incidência aumentada de DM2 resultou em crescentes taxas de complicações da doença, em especial com complicações cardiovasculares (SCHWARTZ et al., 2008).

Sendo assim, o critério diagnóstico foi modificado, em 1997, pela American Diabetes Association (ADA), posteriormente aceito pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) tendo em vista a prevenção de complicações na macro e microcirculação ocasionadas pelo DM. Atualmente, são três os critérios aceitos para o diagnóstico de DM: (1) sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual  $> 200$  mg/dL – compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições; (2) glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL (7 mmol) – em caso de pequenas elevações da glicemia, deve-se confirmar o diagnóstico pela repetição do teste em outro dia; e (3) glicemia de duas horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose acima de 200 mg/dL. Lembrando sempre que as fitas com reagentes não são tão precisas quanto as dosagens plasmáticas, podendo trazer consigo uma erro de aproximadamente 15% dependendo do fabricante, não devendo utilizá-las para o diagnóstico (ENGELGAU et al., 1997).

Como já foi visto, o diagnóstico de DM é rotineiramente definido com base na avaliação da glicemia de jejum que caracteriza os pacientes como euglicêmicos (70-99 mg/dL), pré-diabéticos (100-125 mg/dL) e diabéticos (maior que 126 mg/dL). No entanto, um segundo marcador utilizado é a hemoglobina glicada ( $A_{1c}$ ), que informa a persistência da hiperglicemia nos últimos 4 meses e a repercussão com possíveis complicações futuras.

A  $A_{1c}$ , também denominada hemoglobina glicosilada ou glico-hemoglobina, é conhecida ainda como  $HbA_{1c}$  e, mais recentemente, apenas como  $A_{1c}$ . Embora seja utilizada desde 1958 como uma ferramenta de diagnóstico na avaliação do controle glicêmico em pacientes diabéticos, a dosagem da  $A_{1c}$  passou a ser cada vez mais empregada e aceita pela comunidade científica após 1993. Esta mudança ocorreu depois de ter sido validada através de dois estudos clínicos mais importantes sobre a avaliação do impacto do controle glicêmico sobre as complicações crônicas do diabetes: os estudos DCCT - Diabetes Control and Complications Trial (1993) e o UKPDS - United Kingdom Prospective Diabetes Study (2003). Atualmente,  $A_{1c}$  abaixo de 7% é considerada como uma das principais metas no controle do diabetes. Os dois estudos acima citados indicaram que as complicações crônicas começam a se desenvolver quando os níveis de  $A_{1c}$  estão em níveis superiores a de 7%. No entanto, algumas sociedades médicas, dentre elas a Sociedade Brasileira de Diabetes, adotam metas terapêuticas mais rígidas de 6,5 % para os valores de  $A_{1c}$  (DCCT, 1993; MANLEY, 2003).

A espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) associada a programas de análise multivariada tem se tornado uma ferramenta de grande utilidade para

fins diagnósticos (WANG & MIZAIKOFF, 2008). Com esta metodologia, tem sido possível obter dados de quantificação simultânea, rápida e de baixo custo de componentes bioquímicos oriundos de fluidos biológicos e tecidos humanos em diversas condições fisiológicas e patológicas. Um exemplo é a determinação de glicose sanguínea, plasmática ou sérica usando técnicas como transmissão e reflexão total atenuada (ATR) nas regiões do infravermelho médio (MIR) ou próximo (NIR), visando à triagem e monitoramento de pacientes com diabetes (HEISE et al., 1989; JANATSCH et al., 1989; HEISE et al., 1994; HEISE & BITTNER, 1998; SHAW et al., 1998; VONACH et al., 1998; WERNER et al., 1998; PETRICH et al., 2000; LOW-YING et al., 2002; PETRICH et al., 2002).

Dessa forma, o presente estudo busca, através da espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) associada à análise multivariada, a obtenção de modelos de correlação entre os parâmetros bioquímicos de glicose e A<sub>1C</sub>. Justifica-se visto a importância destes no diagnóstico e manutenção da DM com espectro infravermelho, com objetivo de prever os valores encontrados a partir dos testes de referência.

### **3 METODOLOGIA**

Foi conduzido um experimento com pacientes ambulatoriais do departamento de Clínica Médica do Hospital Santa Cruz e encaminhados das unidades básicas de saúde (UBS) do município de Santa Cruz do Sul, no período de março a outubro de 2011.

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 18 a 59 anos, que apresentassem glicemia de jejum entre 100-126 mg/dL e/ou teste oral de tolerância a glicose com 75g (TTG 75) igual ou superior a 140 e inferior a 200 mg/dL, ou seja, em níveis pré-diabéticos.

Os critérios de exclusão foram: diagnóstico prévio de DM, uso de hipoglicemiantes orais ou insulina, doença renal clínica (creatinina >1,5 mg/dL), doença cardiovascular definida (acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana ou doença aterosclerótica clínica) e diagnóstico de neoplasias nos últimos 12 meses.

Além dos pacientes que preencheram os critérios de inclusão, também foram aceitos indivíduos convidados que tiveram adesão voluntária ao projeto e não pertenciam ao grupo anterior.

Coletas sanguíneas foram realizadas através de punção venosa antecubital após 12 horas de jejum noturno. Todas as análises sanguíneas foram realizadas no mesmo laboratório e em triplicata. Foram feitas as análises de glicose e  $A_{1c}$  por testes de referência.

No momento da coleta venosa antecubital, foram separadas alíquotas de 5  $\mu$ L em triplicata sem anticoagulante para análise por FT-IR. As coletas de sangue foram armazenadas a 2-8 °C até o processamento. O material utilizado para coletas e armazenamento do sangue foi descartado conforme rotina de descarte de materiais biológicos do LAFISA. Triplicatas de 5  $\mu$ L de sangue total (antecubital ou periférico) foram misturadas com 150 mg de brometo de potássio, liofilizadas por 2h15min a  $1,10^{-4}$  torr e -50°C (Labcomco Lyofilyzer<sup>®</sup>), analisadas em espectrômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer (Perkin Elmer<sup>®</sup>) laser HeNe de 633 nm com acessório para espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho (Pike Technologies, Madison) com Transformada de Fourier na faixa de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução e 16 scans.

Os espectros foram adquiridos em absorbância, normalizados, convertidos em extensão \*.csv, organizados em planilha Microsoft Office Excel 2010 e submetidos à análise de regressão multivariada via método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) com transformação de correção de espalhamento de luz (MSC) e pré-processamento por auto-escalamento em software Pirouette 4.0 (Infometrix). Os modelos de calibração foram validados por validação cruzada com mútua exclusão de 1 por vez. Os modelos de calibração foram otimizados utilizando como critério o valor de coeficiente de correlação  $R^2$  acima de 0,99 e o menor valor da raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (RMSECV).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de Santa Cruz do Sul, processo 2686/10. Os participantes foram devidamente orientados e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

#### 4 RESULTADOS

O presente estudo foi composto por 46 pacientes entre 32 a 59 anos, com o IMC entre 21,94 e 40,88  $\text{Kg/m}^2$ , com valores de glicemia de jejum entre 71,67 e 135 mg/dL e de  $A_{1c}$  de 5,3 a 7,2 %. Trata-se de um grupo bastante heterogêneo, sendo que existem pacientes euglicêmicos, pré-diabéticos e diabéticos. As figuras de mérito dos modelos PLS-DRIFTS para glicose e  $A_{1c}$  encontram-se na Tabela 1 e os respectivas curvas de correlação entre os

valores preditos pelos respectivos modelos e os valores experimentais encontra-se representados na Figura 1.

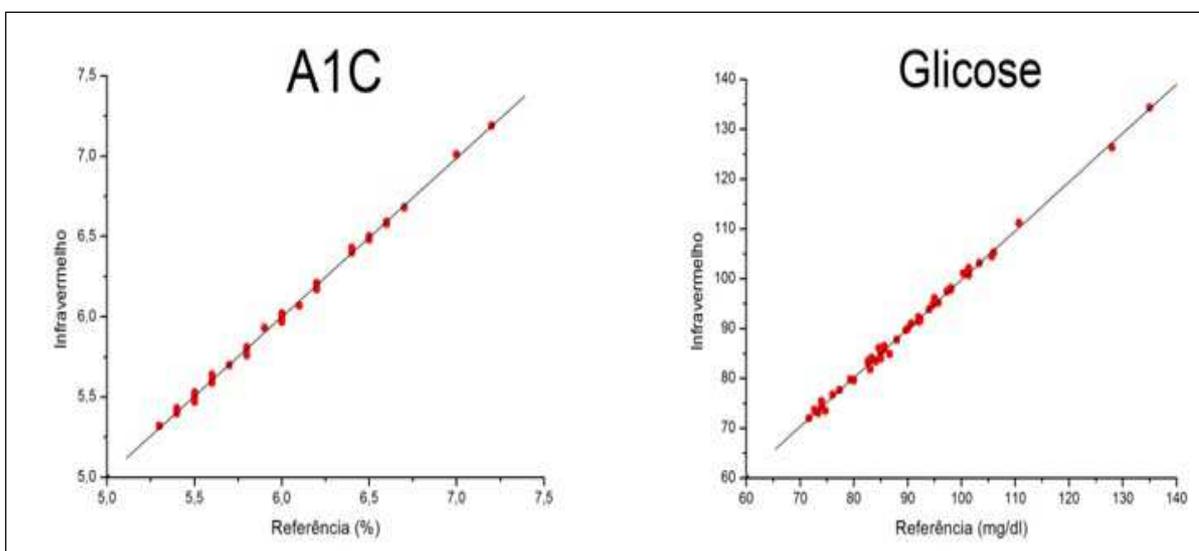
**Tabela 1 – Figuras de mérito da modelagem de PLS-DRIFTS entre amostras de sangue total e níveis séricos de glicose (mg/dL) e de A1C (%).**

Modelo	Região Espectral (cm <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	RMSECV	VRA	Nº Fatores
A <sub>1c</sub>	4000-2401, 2300-600	0,993	0,06	44,1	5
Gli	4000-2401, 2300-600	0,995	1,37	44,6	6

RMSECV = erro quadrático médio padrão de validação cruzada; R<sup>2</sup>= coeficiente de correlação de validação cruzada; VRA = variância relativa acumulada (%); VL = variáveis latentes; A<sub>1c</sub>=Hemoglobina Glicada (%); Gli = glicemia de jejum (mg/dL)

A tentativa de seleção de frequências não encontrou valores de R<sup>2</sup> melhores que os encontrados a partir da correlação com a faixa espectral de 4000-2401, 2300-600 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 1 - Gráficos de correlação de modelagem de regressão PLS-DRIFTS, entre amostras de sangue total e triglicerídeos séricos, colesterol total e colesterol HDL, para pacientes diabéticos, pré diabéticos e euglicêmicos.**



Para o modelo de A<sub>1c</sub> foi encontrado um RMSECV de 0,06 % e R<sup>2</sup> de 0,993. Normalmente, o resultado do exame se apresenta até a primeira casa decimal, dessa forma o erro encontrado praticamente não iria ter efeitos para fins diagnósticos, mostrando a mesma acurácia quanto o teste de referência. Para os dados de glicemia de jejum o RMSECV foi de 1,37 mg/dL e R<sup>2</sup>=0,995. Esse valor de erro encontrado é inferior ao das fitas reagentes para

teste de glicemia capilar, método amplamente utilizado por pacientes com DM e esse valor é próximo ao aceitável pelos testes de referência.

Tendo em vista que laboratórios de análises clínicas necessitam de diferentes reagentes para cada exame com a FT-IR, com apenas uma alíquota de sangue da polpa digital é possível quantificar glicemia de jejum e  $A_{1c}$ . Também é possível avaliar outros parâmetros bioquímicos simultaneamente e sem uso de reagentes específicos para cada quantificação. A partir da Figura 1 podem ser criados modelos de triagem de pacientes, traçando planos verticais nos valores de corte para diagnóstico, dessa forma a FT-IR associada à análise multivariada pode servir como método de triagem populacional como uma ferramenta de baixo custo, alta reprodutibilidade e menos invasivo aos pacientes semelhante a outros modelos já obtidos (HEISE et al., 1989; JANATSCH et al., 1989; HEISE et al., 1994; HEISE & BITTNER, 1998; SHAW et al., 1998; VONACH et al., 1998; WERNER et al., 1998; PETRICH et al., 2000; LOW-YING et al., 2002; PETRICH et al., 2002) porém com erros de previsão menores.

No entanto, tendo em vista que a FT-IR é uma metodologia oriunda da química analítica, pode-se, em um primeiro momento, necessitar de profissionais especializados para interpretar e quantificar esses parâmetros. Contudo, como a maioria das técnicas de análises, pode ser treinada e ensinada a fim de consolidar essa ferramenta como técnica de auxílio no diagnóstico de DM como em outras patologias.

## 5 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado foi possível concluir que a espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) associada à análise multivariada se mostrou sensível para prever os parâmetros bioquímicos de glicemia de jejum e  $A_{1c}$  com uma margem de erro pequena, atendendo aos requisitos analíticos da ANVISA para quantificação destes parâmetros. Se comparado com os atuais testes utilizados para controle diário, as fitas reagentes para glicemia capilar, juntamente com seu custo e margem de erro apresentada pelos fabricantes a FT-IR, é amplamente vantajosa, principalmente por apresentar erros consideravelmente menores. Por fim, a técnica estudada se mostra promissora, apesar de necessitar mais estudos com populações maiores e multicêntricas, a fim de que se possa

futuramente utilizar esta técnica como um exame diagnóstico e para o monitoramento de pacientes com o diagnóstico de DM.

## REFERÊNCIAS

ENGELGAU, M. M.; THOMPSON, T. J.; HERMAN, W. H.; BOYLE, J. P.; AUBERT, R. E.; KENNY, S. J.; BADRAN, A.; SOUS, E. S.; ALI, M. A. Comparison of fasting and 2 hours glucose and HbA1c levels for diagnosing diabetes. Diagnostic criteria and performance revisited. *Diabetes Care*, v. 20, n. 5, p. 785-791, 1997.

GOTSHAL, Y.; ADAM, I.; KATZIR, A. Glucose measurements in solutions using fiberoptic evanescent wave spectroscopy and tunable CO<sub>2</sub> laser. *Proceedings of SPIE- The International Society of Optical Engineering*, v. 3262, p. 192-196, 1998.

GROSS, J.L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.L.; REICHEL, A.J.; AZEVEDO, M.J. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

HEISE, H.M.; MARBACH, R.; JANATSCH, G.; KRUSE-JARRES, J.D. Multivariate determination of glucose in whole blood by attenuated total reflection infrared spectroscopy *Analytical Chemistry*, v. 61, n. 18, p. 2009–2015, 1989.

HEISE, H.; MARBACK, R.; KOSCHINSKY, T.; GRIES, F. Multicomponent assay for blood substrates in human plasma by mid-infrared spectroscopy and its evaluation for clinical analysis. *Applied Spectroscopy*, v. 48, n. 1, p. 85-95, 1994.

HEISE, H.M.; BITTNER, A. Blood glucose assays based on infrared spectroscopy: alternatives for medical diagnostics. *Proceedings of SPIE- The International Society of Optical Engineering*, v. 3257, p. 2-12, 1998.

JANATSCH, G.; KRUSE-JARRES, J.D.; MARBACH, R.; HEISE, H.M. Multivariate calibration for assays in clinical chemistry using attenuated total reflection infrared spectra of human blood plasma. *Analytical Chemistry*, v. 61, n. 18, p. 2016-2023, 1989.

LOW-YING, S.; SHAW, R.A.; LEROUX, M.; MANTSCH, H.H. Quantitation of glucose and urea in whole blood by mid-infrared spectroscopy of dry films. *Vibrational Spectroscopy*, n. 28, n. 1, p. 111-116, 2002.

MANLEY, S. Haemoglobin A1c – a marker for complications of type 2 diabetes: the experience from the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. v. 41, n. 9, p. 1182-1190, 2003.

PETRICH, W.; DOLENKO, B.; FRUH, J.; GANZ, M.; GREGER, H.; JACOB, S.; KELLER, F.; NIKULIN, A.; OTTO, M.; QUARDER, O.; SOMORJAI, R.L.; STAIB, A.; WERNER, G.; WIELINGER, H. Disease pattern recognition in infrared spectra of human sera with diabetes mellitus as an example. *Applied Optics*, v. 39, n. 19, p. 3372-3379, 2000.

PETRICH, W.; STAIB, A.; OTTO, M.; SOMORJAI, R.L. Correlation between the state of health of blood donors and the corresponding mid-infrared spectra of the serum. *Vibrational Spectroscopy*, n. 28, n. 1, p. 117-129, 2002.

SHAW, R.A.; EYSEL, H.H.; LIU, K.-Z.; MANTSCH, H.H. Infrared spectroscopic analysis of biomedical specimens using glass substrates. *Analytical Biochemistry*, v. 259, n. 2, p. 181-186, 1998.

SCHWARTZ, P. E.; LINDSTRÖM, J.; KISSIMOVA-SCARBECK, K.; SZYBINSKI, Z.; BARENGO, N.C.; PELTONEN, M.; TUOMILEHTO, J.; DE-PLAN project. The European perspective of type 2 diabetes prevention: diabetes in Europe--prevention using lifestyle, physical activity and nutritional intervention (DE-PLAN) project. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, v. 116, n. 3, p. 167-172, 2008.

TABÁK, A.G.; JOKELA, M.; AKBARALY, T.N.; BRUNNER, E.J.; KIVIMÄKI, M.; WITTE, D.R. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet*, v. 373, n. 9682, p. 2215-2221, 2009.

THE DCCT RESEARCH GROUP. DCCT and EDIC: The Diabetes Control and Complications Trial and Follow-up Study. 1993.

TUOMILEHTO, J.; ERIKSSON, J.G.; VALLE, T.T.; HÄMÄLÄINEN, H.; ILANNE-PARIKA, P.; KEINÄNEN-KIUKAANNIEMI, S.; LAAKSO, M.; LOUHERANTA, A.; RASTAS, M.; SALMINEN, V.; UUSITUPA, M.; Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 18, p. 1343-1350, 2001.

VALCARCEL, B.; WURTZ, P.; AL BASATENA, N-KS.; TUKIAINEN, T.; KANGAS, A.J.; SOININEN, P.; JARVELIN, M-R.; ALA-KORPELA, EBBELS, T.M.; DE IORIO, M. A differential network approach to exploring differences between biological states: an application to prediabetes. *PLoS One*, v. 6, n. 9, p. e24702, 2011.

VONACH, R.; BUSCHMANN, J.; FALKOWSKI, R.; SCHINDLER, R.; LENDL, B.; KELLNER, R. Application of mid-infrared transmission spectrometry to the direct determination of glucose in whole blood. *Applied Spectroscopy*, v. 52, n. 6, p. 820-822, 1998.

WANG, L.; MIZAIKOFF, B. Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, n. 5, p. 1641-1654, 2008.

WERNER, G.H.; BOECKER, D.; HAAR, H.-P.; KUHR, H.-J.; MISCHLER, R. Multicomponent assay for blood substrates in human sera and haemolysed blood by mid-infrared spectroscopy. *Proceedings of SPIE- The International Society of Optical Engineering*, v. 3257, p. 91-100, 1998.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.