

EFEITO DAS TINTURAS PREPARADAS COM FOLHAS SECAS, FOLHAS VERDES DO CAFÉ CATUAÍ VERMELHO EM RATOS DIABÉTICOS

Aginaldo Rodrigues de Melo Chaves¹, Tânia Toledo de Oliveira², Luciana Marques Cardoso³, Maria Aparecida Leão⁴, Marcelo Rocha da Costa⁵, Marilane Kalyetta Almeida Fonseca⁶, Luís Eugênio Franklin Augusto⁷, Tanus Jorge Nagem⁸

¹ Pesquisador, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, agnaldoufv@yahoo.com.br

² Professora, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, toledo@ufv.br.

³ Doutoranda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, luciana2504@ig.com.br

⁴ Técnica de Laboratório, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, mcidaleao@yahoo.com.br

⁵ Médico e Pesquisador, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, marcelorochadacosta@yahoo.com.br

⁶ Médica e Pesquisadora, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, marilane_kaf@yahoo.com.br

⁷ Graduando de Veterinária, União de Ensino Superior de Viçosa Ltda, Viçosa-MG, luis.efranklin@hotmail.com

⁸ Professor, D.Sc., Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, tanus.nagem@pq.cnpq.br

RESUMO: Estudos epidemiológicos demonstraram efeito benéfico do consumo de café na prevenção da diabetes tipo 2. Entretanto, os compostos específicos e os mecanismos responsáveis por este efeito não estão claros. Foi realizado um experimento para avaliar os efeitos de tinturas obtidas a partir da folha seca e folha verde do café (*Coffea arabica* L.) da variedade Catuaí Vermelho em ratos com diabetes induzidos pela administração de aloxano (60mg/kg de peso corporal). Todas as tinturas foram testadas nas doses de 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL. Após 30 dias de tratamento, foram coletadas amostras de sangue dos animais para dosagens séricas de glicose, colesterol e triacilglicerol. A tintura de folha seca (2,0 mL) foi a única capaz de reduzir significativamente as concentrações de colesterol. Com relação aos níveis de glicose e triacilglicerol, observou-se que todas as tinturas reduziram significativamente estes parâmetros. A redução das concentrações de glicose e triacilglicerol variaram entre 22% a 47% (folha seca) e 30 a 48% (folha verde). Estes resultados indicam que estas tinturas podem ter importância na abordagem de diabetes mellitus 2 e dislipidemias.

Palavras-chaves: colesterol, aloxano, tinturas

EFFECT OF DRY LEAF AND GREEN LEAF TINCTURES OF THE CATUAÍ RED COFFEE IN RATS WITH DIABETES

ABSTRACT: The coffee consumption has benefic effect on the prevention of diabetes type 2, as many epidemiological studies have been demonstrated. However, the specific substances and the responsible mechanisms for this effect are not clear. This experiment was realized to evaluate the effects of tinctures of dry leaf and green leaf of coffee (*Coffea Arabica* L.) of the Red Catuaí variety in rats with induced diabetes by administration of alloxan (60mg/kg of body weight). All the tinctures were tested in dosages of 0,5 mL, 1,0 mL and 2,0 mL. After 30 days of treatment, blood samples of the animals were collected to investigate serum glucose, cholesterol and triacylglycerol levels. The tincture dry leaf (2,0 mL) was the only one able to decrease significantly the concentrations of cholesterol. All the tinctures tested showed a significant decrease of glucose and triacylglycerol levels. The percentages of reduction of the glucose and triacylglycerol concentrations varied between 22% to 47% and 30% to 48%, respectively. These results indicate that these tinctures be able to promising in the treatment of diabetes and dyslipidemia.

Key words: cholesterol, alloxan, tinctures

INTRODUÇÃO

O alto consumo de café pode influenciar fatores de risco cardiovascular, incluindo colesterol (Thelle *et al.*, 1983; Urgert e Katan, 1997) e homocisteína séricos (El-Khairi *et al.*, 1999; De Bree *et al.*, 2002). Além disso, o excesso de café é frequentemente associado ao hábito de fumar, ao consumo de bebida alcoólica, baixa atividade física e hábitos alimentares não saudáveis (Puccio *et al.*, 1990). Vários estudos prospectivos mostram um aumento do risco de doença coronariana em pessoas que consomem alta quantidade de café (Klag *et al.*, 1994), mas outros trabalhos não encontraram esta relação (Myers e Basinski, 1992; Greenland, 1993).

Evidências epidemiológicas sugerem que o alto consumo de café pode reduzir o risco de diabetes tipo 2 (DM2) (van Dam, 2006). Em 2002, resultados de um estudo de coorte holandês sobre o consumo de café e o risco de DM2 foi reportado. Os participantes que consumiam sete ou mais xícaras de café por dia tiveram 0,50 vezes (95% de intervalo de confiança) menos chance de desenvolver DM2 comparado com os que consumiam 2 ou menos xícaras de café por dia (van Dam, 2002). Em seguida, resultados de 15 estudos epidemiológicos foram publicados sobre o consumo habitual de café em relação à sensibilidade a insulina, hiperglicemia e risco de DM2 em vários países (van Dam, 2006). No estudo realizado pela nossa equipe foram testados tinturas e não bebida café.

Porém, o conhecimento dos efeitos da cafeína no metabolismo da glicose não se aplica para o consumo a longo prazo de café, uma vez que efeitos do café na epinefrina são mais fracos que os da cafeína usada isoladamente (Graham

et al., 1998) e o estímulo da cafeína no aumento dos níveis de epinefrina diminuem após ingestão contínua (Robinson *et al.*, 2004). No sistema nervoso autônomo, o neurotransmissor adenosina, dentre outras funções, diminui a atividade neural e dilata os vasos sanguíneos, reduzindo a frequência cardíaca, a pressão arterial e a temperatura corporal, e também diminui a lipólise. A cafeína, por ter uma estrutura semelhante a adenosina, se liga ao receptor deste neurotransmissor, bloqueando a ação do mesmo (Yi *et al.*, 2006). O efeito vasoconstritor cerebral da cafeína é a propriedade que justifica o seu emprego no tratamento de crises de enxaqueca, onde a vasodilatação cerebral existente é responsável pelo quadro (Barone e Roberts, 1984). Baseados em estudos com animais, os efeitos da cafeína no metabolismo da glicose através do aumento da expressão de proteínas não acopladas e da oxidação lipídica também podem ser sugeridos (Yoshioka *et al.*, 2002). Paradoxalmente, a ingestão de cafeína, em estudos de intervenção por períodos curtos, foi capaz de aumentar a concentração de glicose pós prandial (Wachman *et al.*, 1970; Pizziol *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 2002; Robinsom *et al.*, 2004). Além disso, descobertas de estudos observacionais indicam que a associação inversa do consumo de café e o risco de DM2 podem não ser explicados apenas pela cafeína, pois o consumo de café descafeinado também foi associado com o menor risco de DM2 (Salazar-Martinez *et al.*, 2004; Greenberg *et al.*, 2005). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da folha seca e da folha verde da planta café (*Coffea arabica* L.) da variedade catuaí vermelho em ratos com diabetes induzido por aloxano.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo número 011/2008). Foram utilizados 96 ratos machos da raça Wistar, com 45 dias de idade, com peso médio de 250g, oriundos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo em cada uma seis animais, em ambiente climatizado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração comercial (Labina - Purina[®]) e água “*ad libitum*”.

Após um período de adaptação de 05 dias, os animais permaneceram em jejum de 16 horas para a indução do diabetes, que consistiu na administração de aloxano (Alloxan Monohydrate Sigma^R), também conhecido como 2,3,5,6-tetraoxoexaidropirimidina monoidratada a 15% p/v diluído em solução de NaCl a 0,9% na dose de 60mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal. Em seguida, para evitar a morte dos animais por hipoglicemia, os ratos receberam uma solução hipersaturada de glicose a 90% por 2 dias.

Sete dias após a aplicação do aloxano, parte dos animais que receberam esta droga, após jejum de 12 horas, foram eutanasiados para a determinação dos níveis séricos de glicose através da coleta de sangue. Verificou-se que todos os animais que receberam o aloxano ficaram diabéticos (glicose acima de 180 mg/dL).

Foram utilizadas tinturas da folha seca e folha verde do café *Coffea arabica* L. da variedade catuaí vermelho da fazenda de propriedade de Sebastião Lopes da Silva, localizada na cidade de Coimbra-MG. Para a obtenção da folha seca, as folhas verdes foram previamente secas em estufa na temperatura de 40 °C. As tinturas foram preparadas com 30g do material diluído em 70mL de água e 30mL de álcool de cereal. A solução foi armazenada em vidro âmbar e agitada 2 vezes ao dia por aproximadamente 7 dias.

Ao final do tratamento, todos os animais foram devidamente anestesiados por via intraperitoneal de ketamina (180 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg). As amostras de sangue (cerca de 5 mL por animal) foram coletadas por punção cardíaca, colocadas em tubos de ensaio e centrifugadas a 7100 x g por 15 minutos para obtenção do soro. Foram analisados os níveis séricos de glicose, colesterol e triacilglicerol, utilizando kits da marca BIOCLIN no equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé).

O ensaio biológico teve a duração de 30 dias, sendo que todos os grupos receberam as tinturas por via oral (gavagem), com exceção do grupo diabético (grupo 1) e do grupo controle (grupo 2). Os grupos foram constituídos conforme a Tabela 1 abaixo.

Na análise estatística, cada tratamento foi comparado ao grupo doente não tratado pelo teste de Dunnett, considerando 5% de significância.

Tabela 1: Descrição dos grupos de tratamentos avaliados:

GRUPOS	TRATAMENTO	DOSE (ml)
G1	RAÇÃO + ALOXANO	-
G2	RAÇÃO	-
G3	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA SECA	0,5
G4	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA SECA	1,0
G5	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA SECA	2,0
G6	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA VERDE	0,5
G7	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA VERDE	1,0

G8	RAÇÃO + ALOXANO + FOLHA VERDE	2,0
----	-------------------------------	-----

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2, foi observada uma redução significativa do parâmetro colesterol apenas no grupo 5 de 26%. Nos grupos 2, 6 e 8 observaram-se um aumento significativo no nível de colesterol comparado ao grupo 1. Porém, do ponto de vista clínico, este aumento observado pode não ser relevante para o desenvolvimento de uma patologia, como a hipercolesterolemia. Também de acordo com a tabela abaixo, o nível de triacilglicerol foi menor em todos os tratamentos (grupos 3 a 8) em relação ao grupo 1, resultando ainda em valores abaixo do apresentado pelo grupo normal. As reduções no parâmetro triacilglicerol variaram de 30% a 48%, sendo que os grupos que obtiveram as maiores reduções foram os grupos 4 e 5, 48% e 46%, respectivamente.

Com relação à glicose, todos os tratamentos também reduziram este parâmetro, como se encontra na Tabela 2. Devido ao período de intervenção curto (30 dias), os tratamentos não foram capazes de reduzir os níveis de glicose sanguínea ao ponto de levar os animais à faixa de normalidade; porém, estas reduções são muito consideráveis e, possivelmente estas tinturas poderão ser utilizadas em pacientes portadores de diabetes. Os grupos 5 e 7 foram os que mais reduziram as concentrações de glicose, em 47% e 44%, respectivamente.

Tabela 2- Conteúdo médio (mg/dL) de colesterol, triacilglicerol e glicose em soro sanguíneo de ratos machos submetidos aos tratamentos com folha seca e folha verde do café e suas respectivas percentagens de variação.

Tratamentos	Conteúdo		% Variação		Conteúdo		% Variação		Conteúdo		% Variação	
	Colesterol				Triglicerídeos				Glicose			
G1	93,40	A	0		104,03	A	0		343,37	A	0	
G2	103,68	B	+11		102,62	A	-1		112,83	B	-67	
G3	92,87	A	-1		73,27	B	-30		262,82	B	-23	
G4	92,36	A	-1		54,31	B	-48		234,83	B	-32	
G5	68,67	B	-26		55,73	B	-46		180,97	B	-47	
G6	108,34	B	+16		63,37	B	-39		241,18	B	-30	
G7	92,91	A	-1		62,44	B	-40		193,25	B	-44	
G8	114,26	B	+22		70,73	B	-32		267,61	B	-22	

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância comparada ao grupo doente não tratado (G1).

Como visto anteriormente na Tabela 2, os resultados com relação ao colesterol são bem controversos, visto que alguns tratamentos aumentaram este parâmetro (folha verde 0,5 mL e 2,0 mL), ou diminuiu (folha seca 2,0 mL), enquanto outros não tiveram resultado significativo (folha seca 0,5 mL e 1,0 mL). Thelle *et al.* (1983) demonstraram correlação positiva entre o consumo de café e os níveis séricos de colesterol numa população do norte da Noruega composta por 7213 mulheres e 7368 homens com idades entre 20 e 54 anos. A relação café-colesterol foi altamente significativa ($p < 0,0001$) depois de ajustados a idade, o índice de massa corporal (IMC), atividade física, tabagismo e consumo de álcool, sendo que o nível de colesterol foi de $5,56 \pm 0,05$ mmol/L (média \pm erro padrão) em homens que consumiam menos de uma xícara de café/dia comparado com $6,23 \pm 0,03$ mmol/L naqueles que consumiam mais de nove xícaras/dia. Porém, cabe ressaltar que alguns estudos não identificam esta propriedade hipercolesterolêmica do café no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Beynen, 1996; Mennen *et al.*, 2002). Happonen *et al.* (2004), num estudo realizado com 1971 indivíduos, mostraram que o consumo de café em volumes maiores que 800 mL/dia esteve associado ao aumento na incidência de doença cardiovascular, mas, em contrapartida, o consumo moderado (400-800 mL/dia) confere efeito protetor para a mesma patologia. Este efeito protetor deve-se a algumas substâncias antioxidantes presentes no café, como o ácido clorogênico e o ácido cafeico (De Roos *et al.*, 2001).

Como visto anteriormente, os tratamentos com folha seca e folha verde diminuíram os níveis de glicose e triacilglicerol em 22% a 47% e 30% a 48%, respectivamente, sendo que os maiores decréscimos dos níveis de glicose, 47%, foram encontrados com o grupo tratado com folha seca (2,0 mL). Com relação ao parâmetro triacilglicerol, a maior redução (48%) foi obtida com o tratamento com folha seca (1,0 mL). A redução dos níveis de triacilglicerol pode ser explicada pelo metabolismo normal de um indivíduo, onde parte da glicose é metabolizada para o tecido adiposo, e sobre a influência da insulina, para a síntese de triacilglicerol. Portanto, havendo uma redução de glicose, possivelmente, as concentrações de triacilglicerol também decrescem.

Apesar deste trabalho ter avaliado a folha do café, seja esta verde ou seca, observou-se que os resultados são semelhantes a diversos estudos que encontraram correlação inversa com o consumo da bebida e as concentrações de triacilglicerol e glicose, mostrando que quanto maior o consumo de café, menor os níveis destes parâmetros sanguíneos (Tuomilehto *et al.*, 2004; van Dam, 2002; van Dam, 2006). Rosengren *et al.* (2004), demonstraram em um estudo prospectivo que o risco de desenvolvimento de diabetes foi 475 por 100.000 pessoas por ano nas mulheres que consumiam 0 - 2 xícaras de café por dia, 271 para aquelas cujo consumo era de 3 - 4 xícaras, 202 para o consumo de 5 - 6 xícaras e 267 para as que consumiam mais que sete xícaras. Os níveis de triacilgliceróis foram maiores nas mulheres

que consumiam menos que duas xícaras de café por dia. Não houve associação significativa entre o consumo de café e a pressão sanguínea. Posteriores ajustes para fumo, baixa atividade física, escolaridade e índice de massa corporal não alteraram estes resultados.

Suspeita-se que o principal composto orgânico do café associado ao menor risco de DM2 seja o ácido clorogênico (ACG). Consumidores de café podem ingerir 500 -1000 mg de ACG por dia (McCarty, 2005). Welsch *et al.* (1989) mostraram que o ACG diminuiu a absorção de glicose *in vitro* na concentração de 1mM, inibindo o transporte de glicose para o interior do enterócito em aproximadamente 80%. A glicose pode ser transportada para o interior das células intestinais por co-transporte com o íon sódio, que ocorre por uma diferença de concentração deste íon no exterior e interior dos enterócitos. Este mecanismo de co-transporte esta presente na parte apical da célula intestinal e túbulo proximal renal, e é independente da influência da insulina. O ACG pode afetar este gradiente de sódio, e consequentemente, diminuir a absorção de glicose intestinal (Johnston *et al.*, 2003).

Outras substâncias presentes no café podem atuar na diminuição dos níveis de glicose. Dentre elas, estão alguns flavonóides, a cafeína, ligninas, o magnésio, o ácido nicotínico e a trigonelina (van Dam, 2006).

CONCLUSÃO

Os tratamentos com as tinturas de folha seca e folha verde do café (*Coffea arabica* L.) da variedade catuaí vermelho foram capazes de reduzir significativamente, em diferentes proporções, os níveis de triacilglicerol e glicose séricos dos ratos com diabetes induzido por aloxano. As reduções são muito consideráveis e, futuramente, após ensaios de toxicidade em animais e estudos com humanos, estas tinturas poderão ser utilizadas como fitoterápicos no tratamento da hiperlipidemia e do diabetes e associados a um estilo de vida saudável, são capazes de prevenir o desenvolvimento de doenças crônicas como o diabetes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barone, J.J.; Roberts, H. Human consumption of caffeine. In: DEWS, P.B. **Caffeine: Perspectives from recent research**. Berlin: Springer- Verlag, cap. 4, p. 59-73, 1984.
- Beynen, A.C. Boiled coffee fails to raise cholesterol in hamsters and rats. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.76, p.755-764, 1996.
- De Bree, A.; Verschuren, W.M.; Kromhout, D.; Kluijtmans, L.A.; Blom, H.J. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. **Pharmacology Review**, v.54, p.599-618, 2002.
- De Roos, B.; Caslake, M.J.; Stalenhoef, A.F.H.; Bedford, D.; Demacker, P.N.M.; Katan, M.B. The coffee diterpene cafestol increases plasma triacylglycerol by increasing the production rate of large VLDL apolipoprotein B in healthy normolipidemic subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.45-52, 2001.
- El-Khairy, L.; Ueland, P.M.; Nygard, O.; Refsum, H.; Vollset, S.E. Lifestyle and cardiovascular disease risk factors as determinants of total cysteine in plasma: the Hordaland Homocysteine Study. **American Journal of Clinical Nutrition**; v.70, p.1016-24, 1999.
- Graham, T.E.; Hibbert, E.; Sathasivam, P. Metabolic and exercise endurance effects of coffee and caffeine ingestion. **Journal Applied Physiology**, v.85, p. 883-889, 1998.
- Greenberg, J.A.; Axen, K.V.; Schnoll, R.; Boozer, C.N. Coffee, tea and diabetes: the role of weight loss and caffeine. **International Journal of Obesity**, v.29, p.1121-1129, 2005.
- Greenland, S. A meta-analysis of coffee, myocardial infarction, and coronary death. **Epidemiology**, v.4, p.366-74, 1993.
- Happonen, P.; Voutilainen, S.; Salonen, J.T. Coffee drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. **Journal of Nutrition**, v.134, p.2381-2386, 2004.
- Johnston, K.L.; Clifford, M.N.; Morgan, L.M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.728-733, 2003.
- Klag, M.J.; Mead, L.A.; LaCroix, A.Z. Coffee intake and coronary heart disease. **Annual Epidemiology**, v.4, p.425-33, 1994.
- Lane, J.D.; Pieper, C.F.; Phillips-Bute, B.G.; Bryant, J.E.; Kuhn, C.M. Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home. **Psychosom Medicine**, v.64, p.595-603, 2002.
- Mennen, L.I.; De Courcy, G.P.; Guillard, J.C.; Ducros, V.; Bertrais, S.; Nicolas, J.P.; Maurel, M.; Myers, M.G.; Basinski A. Coffee and coronary heart disease. **Archives International of Medicine** v.152, p.1767-72, 2002.
- Pizziol, A.; Tikhonoff, V.; Paleari, C.D.; Russo, E.; Mazza, A.; Ginocchio, G.; Onesto, C.; Pavan, L.; Puccio, E.M.; McPhillips, J.B.; Barrett-Connor, E.; Ganiats, T.G. Clustering of atherogenic behaviors in coffee drinkers. **American Journal Public Health**, v.80, p.1310-3, 1998.
- Robinson, L.E.; Savani, S.; Battram, D.S.; McLaren, D.H.; Sathasivam, P.; Graham, T.E. Caffeine ingestion before an oral glucose tolerance test impairs blood glucose management in men with type 2 diabetes. **Journal of Nutrition**, v.134, p.2528-2533, 2004.

- Rosengren, A.; Dotevall, A.; Wilhelmsen, L.; Thelle, D.; Johansson, S. Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up study. **Journal International of Medicine**, v.255, p.89-95, 2004.
- Salazar-Martinez, E.; Willett, W.C.; Ascherio, A.; Manson, J.E.; Leitzmann, M.F.; Stampfer, M.J.; Thelle, D.S.; Arnesen, E.; Forde, O.H. The Tromso heart study. Does coffee raise serum cholesterol? **New England Journal of Medicine**, v.308, p.1454-1457, 2004.
- Tuomilehto, J.; Hu, G.; Bidel, S.; Lindstrom, J.; Jousilahti, P. Coffee consumption and risk of Type 2 diabetes mellitus among middle-aged Finnish men and women. **JAMA**, v.291, p.1213-19, 2004.
- Urgert, R.; Katan, M.B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annual Review of Nutrition**; v.17, p.305-24, 1997.
- van Dam, R.M.; Feskens, E.J. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v.360, p.1477- 1488, 2002.
- van Dam, R.M. Coffee and type 2 diabetes: From beans to beta-cells. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.16, p.69 - 77, 2006.
- Wachman, A.; Hattner, R.S.; B George, B.; Bernstein, D.S. Effects of decaffeinated and nondecaffeinated coffee ingestion on blood glucose and plasma radioimmunoreactive insulin responses to rapid intravenous infusion of glucose in normal man. **Metabolism**, v.19, p.539-46, 1970.
- Welsch, C.A.; Lachance, P.A.; Wasserman, B.P. Dietary phenolic compounds: inhibition of Na⁺ dependent d-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. **Journal of Nutrition**, v.119, p.1698-1704, 1989.
- Yi, C.; Wei, Z.; Deng, X.; Sun, Z.; Li, X.; Tian, C. Effects of coffee and caffeine on bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.8, p.1037-1043, 2006.
- Yoshioka, K.; Kogure, A.; Yoshida, T.; Yoshikawa, T. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v.360, p.703, 2002.