

EFEITO DAS TINTURAS PREPARADAS COM FRUTO VERDE E CASCA CEREJA 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, Paulo César Correa⁷, 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, ttoledo@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 Professor, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, copace@ufv.br

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

RESUMO: O consumo de café tem sido associado com um menor risco de diabetes. Entretanto, os compostos específicos e os mecanismos responsáveis por este efeito ainda não estão claros. Desta forma, foi realizado um experimento para avaliar o efeito de tinturas de casca cereja, fruto verde e fruto cereja (fruto maduro) da planta café (*Coffea arabica* L.) da variedade catuaí vermelho em ratos com diabetes induzido pela administração de aloxano (60mg/kg de peso corporal). Após 30 dias de tratamento, foram coletados amostras de sangue dos animais para dosagens séricas de glicose, colesterol e triacilglicerol. As tinturas de casca cereja (1,0 mL), fruto verde (0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL), fruto cereja (1,0 mL e 2,0 mL) promoveram aumento significativo nos níveis de colesterol comparado ao grupo doente não tratado, entretanto, do ponto de vista clínico, estes não foram capazes de causar hipercolesterolemia. Com relação aos níveis de glicose e triacilglicerol, observou-se que todas as tinturas reduziram significativamente estes parâmetros. As porcentagens de redução dos níveis de glicose e triacilgliceróis variaram entre 28% a 49% e 27% a 47%, respectivamente. A diminuição dos níveis de glicose e triacilgliceróis se sobrepõem ao aumento observado do colesterol, indicando que estas tinturas podem ser promissoras como adjuvantes no tratamento do diabetes.

Palavras-chaves: triacilgliceróis, glicose, colesterol, hipercolesterolemia

EFFECT OF CHERRY FRUIT, GREEN FRUIT AND CHERRY SKIN TINCTURES CATUAÍ RED COFFEE IN RATS WITH DIABETES

ABSTRACT: The coffee consumption has been associated with a lower risk of diabetes. However, the specific components and the responsible mechanism for this effect are not clear yet. An experiment was made to evaluate the tinctures effect of cherry skin, green fruit and the cherry fruit (ripe fruit) of the coffee plant (*Coffea Arabica* L.) of the red catuaí variety, in rats with induced diabetes, by administration of alloxan (60mg/kg of body weight). After 30 days of treatment, blood samples of the animals were collected for serum glucose, cholesterol and triacylglycerols. The tinctures of cherry skin (1,0mL), green fruit (0,5mL, 1,0 mL and 2.0 mL) and cherry fruit (1,0 mL and 2,0 mL), promoted the significant increase in the levels of cholesterol compared to the sick group not treated, however, of the clinical point of view, these were not capable to cause hypercholesterolemia. All the tinctures reduced significantly the levels of glucose and triglycerides. The percentages of reduction of the glucose and triacylglycerols levels varied between 28% to 49% and 27% to 47%, respectively. The decrease of the glucose and triacylglycerols levels overlap the observed cholesterol increase, indicating that these tinctures can be promising as adjuvants in the treatment of diabetes.

Key words: triacylglycerols, glucose, hypercholesterolemia

INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio crônico do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas causado por secreção inadequada e/ou diminuição da sensibilidade dos tecidos à insulina. O efeito no metabolismo decorre da tentativa de garantir o aporte adequado de glicose para as células. Consequentemente há o aumento da glicemia, utilização de quantidades cada vez menores de glicose e mobilização crescente de proteínas e lipídeos (Guyton e Hall, 2000). O diabetes ocasiona complicações vasculares e neuropatias, e juntos com o acidente vascular cerebral e coronariopatias fazem do diabetes a sétima causa de óbitos no mundo desenvolvido (Sacks *et al.*, 2002). Pelo impacto socioeconômico, o DM vem sendo reconhecido, em vários países como problema de saúde pública com reflexos sociais importantes (Ortiz *et al.*, 2000). Estima-se que em 2000 havia aproximadamente 150 milhões de pessoas no mundo com diagnóstico da doença e é provável que este número alcance o dobro em 2025 (King *et al.*, 1998). Na Europa, o número de diabéticos em 1994 era de 16 milhões e poderá chegar 24 milhões em 2010 (Amos *et al.*, 1997). Nos Estados Unidos,

o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que mais de 18 milhões de norte-americanos são portadores de diabetes, e que o diabetes tipo 2 corresponde a mais de 90% desse total. No Brasil, esta doença pode atingir cerca de 12 milhões de indivíduos (Diabetes, 2007).

O número crescente de pacientes portadores de DM e os altos índices de morbidade e mortalidade associados à doença torna relevante o investimento em conhecimento que visem a prevenção e tratamento mais eficazes. As pesquisas sobre os fatores dietéticos e o risco de diabetes tipo 2 (DM2) focalizam os macronutrientes. Entretanto, micronutrientes e fitoquímicos também podem afetar o metabolismo da glicose (van Dam, 2002). O café é constituído por cafeína, trigonelina, minerais, ácido clorogênico, ácidos alifáticos, ácido quínico, flavonóides (caempferol, quercetol), carboidratos, aminoácidos totais, aminoácidos livres e lipídeos (Clarke, 1985). Diferenças na composição entre os grãos verdes e torrados, bem como nas espécies e nos procedimentos de extração para preparo da bebida, resultam numa grande diversidade da composição química do produto final (Daglia *et al.*, 2000; Borrelli *et al.*, 2002).

Substâncias presentes no café, como cafeína (Yoshioka *et al.*, 2002), ácido clorogênico (Shearer *et al.*, 2003), magnésio (de Valk, 1999) e trigonelina (Mishinsky *et al.*, 1967) podem afetar o metabolismo de glicose em animais e humanos. Durante o processo de torrefação do café, pode ocorrer a degradação de algumas dessas substâncias, como o ácido clorogênico e a trigonelina. A trigonelina é parcialmente degradada no processo de torrefação do café e ocorre a decomposição do ácido clorogênico com formação do aroma volátil, material polimérico (melanoidina) e CO₂. Apesar de termicamente estável, também pode ocorrer pequenos decréscimos de cafeína (Maier, 1987). Diante destas evidências, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de tinturas obtidas a partir de *Coffea arabica* L. da variedade catuaí vermelho em ratos com diabetes induzido por aloxano.

MATERAIS 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 (UFJF). Foram utilizados 132 ratos machos da raça Wistar, com 45 dias de idade, com peso médio de 250 g, 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. Optou-se pela utilização de aloxano como droga diabetogênica, devido às características apresentadas serem semelhantes às encontradas na síndrome diabética em humanos: glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, entre outras (Carvalho, 2002). 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. Verificou-se que todos os animais que receberam o aloxano ficaram diabéticos (glicose acima de 180 mg/dL). Foram utilizadas tinturas de frutos de *Coffea arabica* L. da variedade catuaí vermelho da fazenda de propriedade de Sebastião Lopes da Silva, localizada na cidade de Coimbra-MG. Estas 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 eutanasiados, 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 e o equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé).

A análise estatística foi realizada no SAEG 9.0 UFV, comparando-se cada tratamento descrito no quadro abaixo com o grupo doente não tratado pelo teste de Dunnett, considerando 5% de significância.

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 de tratamentos foram identificados como descrito na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Descrição dos grupos de tratamentos utilizados na avaliação:

GRUPO	TRATAMENTO	DOSE(ml)
G1	RAÇÃO + ALOXANO	-
G2	RAÇÃO	-
G3	RAÇÃO + ALOXANO + CASCA CEREJA	0,5
G4	RAÇÃO + ALOXANO + CASCA CEREJA	1,0
G5	RAÇÃO + ALOXANO + CASCA CEREJA	2,0
G6	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO VERDE	0,5
G7	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO VERDE	1,0
G8	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO VERDE	2,0
G9	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO CEREJA	0,5
G10	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO CEREJA	1,0
G11	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO CEREJA	2,0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 2, apenas o grupo 9 reduziu o parâmetro colesterol, porém não foi estatisticamente significativo. Os demais tratamentos aumentaram este parâmetro, sendo que nos grupos 3, 6, 7, 8, 10 e 11 este valor foi significativo comparado ao grupo 1. Entretanto, com relação ao significado clínico destas variações, observou-se que os tratamentos com as tinturas de café não aumentaram as concentrações de colesterol ao ponto de desenvolverem uma hipercolesterolemia.

Com relação ao parâmetro triacilglicerol (idem Tabela 2), todos os tratamentos (grupos 3 a 11) apresentaram reduções (27% a 47%) estatisticamente significativas, resultando em valores abaixo do apresentado pelo grupo 2. Os maiores decréscimos, 47%, 46% e 45%, foram observados nos grupos 7, 3 e 11, respectivamente, enquanto a menor redução (27%) ocorreu com o grupo 6. É importante ressaltar que no grupo 9, o único que não aumentou o nível de colesterol, promoveu uma diminuição de 43% nos níveis de triacilglicerol. Assim, observa-se que todos os tratamentos, seja com tinturas de casca cereja, fruto verde ou fruto cereja da planta café foram benéficos na redução dos níveis de triacilglicerol. Ademais, estas reduções são muito consideráveis do ponto de vista clínico, e, possivelmente estas tinturas poderão ser utilizadas no tratamento da hiperlipidemia.

Na Tabela 2, observa-se que todos os tratamentos foram eficazes na redução da glicose comparados com o grupo 1, sendo estes resultados estatisticamente significativos. Os tratamentos não foram capazes de reduzir os níveis de glicose sanguínea ao ponto de levar os animais à normalidade. Porém, o período da intervenção foi apenas de 30 dias, o que pode não ter sido suficiente para que os animais atingissem níveis de glicose semelhantes ao grupo normal. O grupo 6 foi o tratamento que mais influenciou na diminuição do nível de glicose, reduzindo em 49% este parâmetro, seguido pelos grupos 11 e 5, que apresentaram porcentagens de redução de 40 e 36%, respectivamente. Estas reduções são consideráveis para uso clínico, uma vez que pacientes com diabetes tomam medicações hipoglicemiantes por longos períodos. Portanto, as tinturas de casca cereja, fruto verde e fruto cereja da planta café são promissoras no tratamento do diabetes.

Os níveis de glicose sanguínea e triacilglicerol descritos na tabela após 30 dias, foram maiores nos grupos dos animais diabéticos não tratados em relação ao grupo normal. Este resultado já era esperado, visto que a droga utilizada para a indução do diabetes, o aloxano, promove o aumento dos níveis de glicose sanguínea em animais experimentais, como observado em diversos trabalhos (Cavalli *et al.*, 2007; Lerco *et al.*, 2003; Mazzanti *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2002). Conseqüentemente, há uma elevação do triacilglicerol, pois o excesso de glicose pode ser metabolizada no tecido adiposo para a síntese deste parâmetro.

Com relação ao colesterol, existem controvérsias sobre os efeitos do café neste parâmetro. Alguns trabalhos demonstraram que a bebida do café pode influenciar fatores de risco cardiovascular, incluindo colesterol (Thelle *et al.*, 1995; Urgert e Katan, 1997) e homocisteína séricos (El-Khairi *et al.*, 1990; De Bree *et al.*, 2002). Entretanto, outros trabalhos não encontraram esta relação (Beynen, 1996; Mennen *et al.*, 2002; Greenland, 1993). Adicionalmente, o café

contém substâncias antioxidantes que diminuem a oxidação do LDL, como o ácido clorogênico e o ácido caféico, minimizando problemas cardiovasculares (De Roos *et al.*, 2001).

Tabela2: Conteúdo médio (mg/dL) de colesterol, triacilglicerol e glicose em soro sanguíneo de ratos machos submetidos a diferentes tratamentos e suas respectivas percentagens de variação.

Tratamentos	Conteúdo		% Variação		Conteúdo		% Variação	
	Colesterol		Triacilglicerol		Glicose			
G1	93,40	A	0		104,03	A	0	
G2	103,68	B	11		102,61	A	-1	
G3	96,21	A	3		56,33	B	-46	
G4	107,77	B	15		70,68	B	-32	
G5	98,36	A	5		64,78	A	-38	
G6	107,24	B	15		75,76	B	-27	
G7	99,06	B	6		54,69	B	-47	
G8	108,88	B	17		58,71	B	-44	
G9	88,62	A	-5		59,47	B	-43	
G1	115,12	B	23		60,95	B	-41	
G11	106,15	B	14		57,42	B	-45	

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

Em relação aos níveis de glicose e triacilgliceróis, os resultados deste trabalho, indicam que substâncias presentes no café podem ser úteis na prevenção e tratamento do diabetes e são coerentes com vários trabalhos que analisaram a associação do café com esta patologia. Estudo realizado na Finlândia (Tuomilehto *et al.*, 2004), envolvendo mais de 14.000 pessoas, reportou que o alto consumo de café pode reduzir o risco de DM2. Como a Finlândia tem o índice mais alto de consumo de café do mundo, foi possível determinar o risco de diabetes com altos níveis de consumo. Neste trabalho, pessoas que tomavam grandes quantidades de café, isto é, dez ou mais xícaras por dia, tiveram menos probabilidade de desenvolver o diabetes. Um consumo de tal magnitude reduziu o risco em 79% no caso das mulheres e em 55% no caso dos homens em desenvolver o DM2. A constatação também foi positiva para as pessoas que tomavam quantidades moderadas, três a quatro xícaras por dia, para quem o risco de diabetes foi 29% menor nas mulheres e 27% nos homens.

Pesquisas indicam que a ingestão de ácidos clorogênicos (ACL) reduz a concentração de glicose em ratos (Andrade-Cetto *et al.*, 2001; Herling *et al.*, 1999). Alguns mecanismos tem sido propostos para explicar os efeitos benéficos do ACL no metabolismo da glicose (van Dam, 2006). Estudos *in vitro* (Arion *et al.*, 1997) e com animais (Herling *et al.*, 1999) utilizando o ACL mostraram que este composto pode inibir a produção hepática de glicose por inibir a glicose-6-fosfatase. O ACL também pode diminuir a absorção da glicose no intestino por inibir a glicose-6-fosfato translocase 1 e reduzir o gradiente de sódio (Johnston *et al.*, 2003). Adicionalmente, o ACL parece estimular a secreção do hormônio incretina glucagon-like peptídeo 1 em humanos (Johnston *et al.*, 2003).

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). Entretanto, recentes descobertas de estudos observacionais indicam que a associação inversa do consumo de café e o risco de DM2 podem não ser explicados pela cafeína, pois o consumo de café descafeinado também foi associado com o menor risco de DM2 em estudos de coorte (Salazar-Martinez *et al.*, 2004; Greenberg *et al.*, 2005). Além disso, a ingestão de cafeína, em estudos de intervenção por períodos curtos, mostrou um aumento na concentração de glicose pós prandial (Wachman *et al.*, 1970; Pizziol *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 2002; Robinsson *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que todos os tratamentos *in vivo* com tinturas da casca cereja, fruto verde e fruto cereja do cafeeiro reduziram significativamente, em diferentes proporções, os parâmetros de glicose e triacilglicerol em ratos diabéticos induzidos por aloxano. Estes dados sustentam a hipótese que o café está associado com um menor risco de DM2. A maioria dos tratamentos promoveu um pequeno aumento nos níveis de colesterol, no entanto, do ponto de vista clínico, estes não foram capazes de causar hipercolesterolemia. Os benefícios das tinturas de café utilizadas neste trabalho nos níveis de glicose e triacilglicerol se sobrepõem ao possível efeito negativo sobre o parâmetro colesterol, indicando que estas tinturas podem ser promissoras para o tratamento do

diabetes. Sugere-se, após estudos de toxicidade em animais, que estas tinturas sejam estudadas em humanos, visando o aumento de opções terapêuticas e a redução dos custos com medicação para os portadores de diabetes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amos, A.F.; McCarty, D.J.; Zimmet, P. The rising global burden of diabetes and its complications: Estimates and projections to the year 2010. **Diabetes Medicine**, v.14, p.7-85, 1997.
- Andrade-Cetto, A.; Wiedenfeld, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacol**, v.78, p.145-149, 2001.
- Arion, W.J.; Canfield, W.K.; Ramos, F.C.; Schindler, P.W.; Burger, H.J.; Hemmerle, H. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. **Archives Biochemistry Biophysical**, v.339, p 315-322, 1997.
- Beynen, A.C. Boiled coffee fails to raise cholesterol in hamsters and rats. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.76, p.755-764, 1996.
- Carvalho, P. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- Cavalli, V.L.L.O.; Sordi, C.; Tonini, K.; Muneron, T.; Guigi, A.; Júnior, W.A.R. Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) **Bernh Revista Brasileira Farmacognosia**. v.17 n.1, 2007.
- Clarke, R. J.; Macrae, R. Coffee chemistry. **Applied Science** v.1, 1985.
- Daglia, M.; Papeti, A.; Gregotti, C.; Berté, F.; Gazzani, G. In vitro antioxidant and in vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.48, p.1449-1454, 2000.
- 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.
- de Valk, H.W. Magnesium in diabetes mellitus. **Netherland Journal of Medicine**, v.54, n.4, p.139-146, 1999.
- Diabetes 2007. Disponível em: <www.diabetes.org.br>. Acessada em: dezembro de 2007.
- El-Khairi, 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, 1990.
- Greenberg, J.A.; Axen, K.V.; Schnoll, R.; Boozer, C.N. Coffee, tea and diabetes: the role of weight loss and caffeine. **International Journal 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.
- Greer, F.; Hudson, R.; Ross, R.; Graham, T. Caffeine ingestion decreases glucose disposal during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp in sedentary humans. **Diabetes**, v.50, p.2349-2354, 2001.
- Guyton, A.C.; Hall, J.E. Insulin, glucagon, and diabetes mellitus. In: Textbook of medical physiology. **Elsevier Science**, 78: 884-897, 2000.
- Herling, A.W.; Burger, H.; Schubert, G.; Hemmerle, H.; Schaefer, H.; Kramer, W. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.386, p.75-82, 1999.
- 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.
- King, H.; Aubert, R.E.; Herman, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimate, and projections. **Diabetes care**, v.21, p.1414-31, 1998.
- 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. **Psychosomatic Medicine**, v. 64, p. 595-603, 2002.

- Lerco, M.M.; Spadella, C.D.; Machado, J.L.M.; Schellini, A.S.; Padovani, C.R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, p.132-142, 2003.
- Maier, H.G. The acids of coffee. **Proceedings 12th Asic College**, p.229-237, 1987.
- Mazzanti, C.M.; Schossler, D.R.; Filappi, A.; Prestes, D.; Balz, D.; Mirion, V.; Morsch, A.; Schetinger, M.R.C.; Morsch, V.M.; Cecim, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v.33 (6), p. 1061-1065, 2003.
- Mennen, L.I.; De Courcy, G.P.; Guillard, J.C.; Ducros, V.; Bertrais, S.; Nicolas, J.P.; Maurel, M.; Zarebska, M.; Favier, A.; Franchisseur, C.; Hercberg, S.; Galan, P. Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.1279 – 1289, 2002.
- Mishkinsky, J.; Joseph, B.; Sulman, F.G. Hypoglycaemic effect of trigonelline. **Lancet** v.16, p.1311-1312, 1967.
- Oliveira, T.T.; Liberato S.C.; Nagem, T.J.; Pinto, A.S.; Magalhães, N.M.; Lima, E.Q., Brunoro, N.M.C.; Ortiz, M.C.A.; Zanetti, M.L. Diabetes mellitus: fatores de risco em uma instituição de ensino da área da saúde. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 6, p. 128-132, dezembro 2000.
- Pizziol, A.; Tikhonoff, V.; Paleari, C.D.; Russo, E.; Mazza, A.; Ginocchio, G.; Onesto, C.; Pavan, L.; Casiglia, E.; Pessina, A.C. Effects of caffeine on glucose tolerance: A placebo-controlled study. **European Journal of Pharmacology**, v.52, p.846-849, 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.
- Sacks, D.B.; Bruns, D.E.; Goldstein, D.E.; Maclaren, N.K.; McDonald, J.M.; Parrott, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of Diabetes mellitus. **Clinical Chemistry**, v.48, p.436-472, 2002.
- Salazar-Martinez, E.; Willett, W.C.; Ascherio, A.; Manson, J.E.; Leitzmann, M.F.; Stampfer, M.J. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. **Annual International Medicine**, v.140, p.1-8, 2004.
- Shearer, J.; Farah, A.; de Paulis, T.; Bracy, D.P.; Pencek, R.R.; Graham, T.E. Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. **Journal of Nutrition**, v.133, p.3529-3532, 2003.
- Thelle, D.S. Coffee, tea and coronary heart disease. **Current Opinion Lipidol**. v.1, p.25–27, 1995.
- 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 Disease**, v.16, p.69 - 77, 2006.
- Wachman, A.; RS Hattner, R.S.; B George, B.; DS 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.
- Yoshioka, K.; Kogure, A.; Yoshida, T.; Yoshikawa, T. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v.360, p703, 2002.