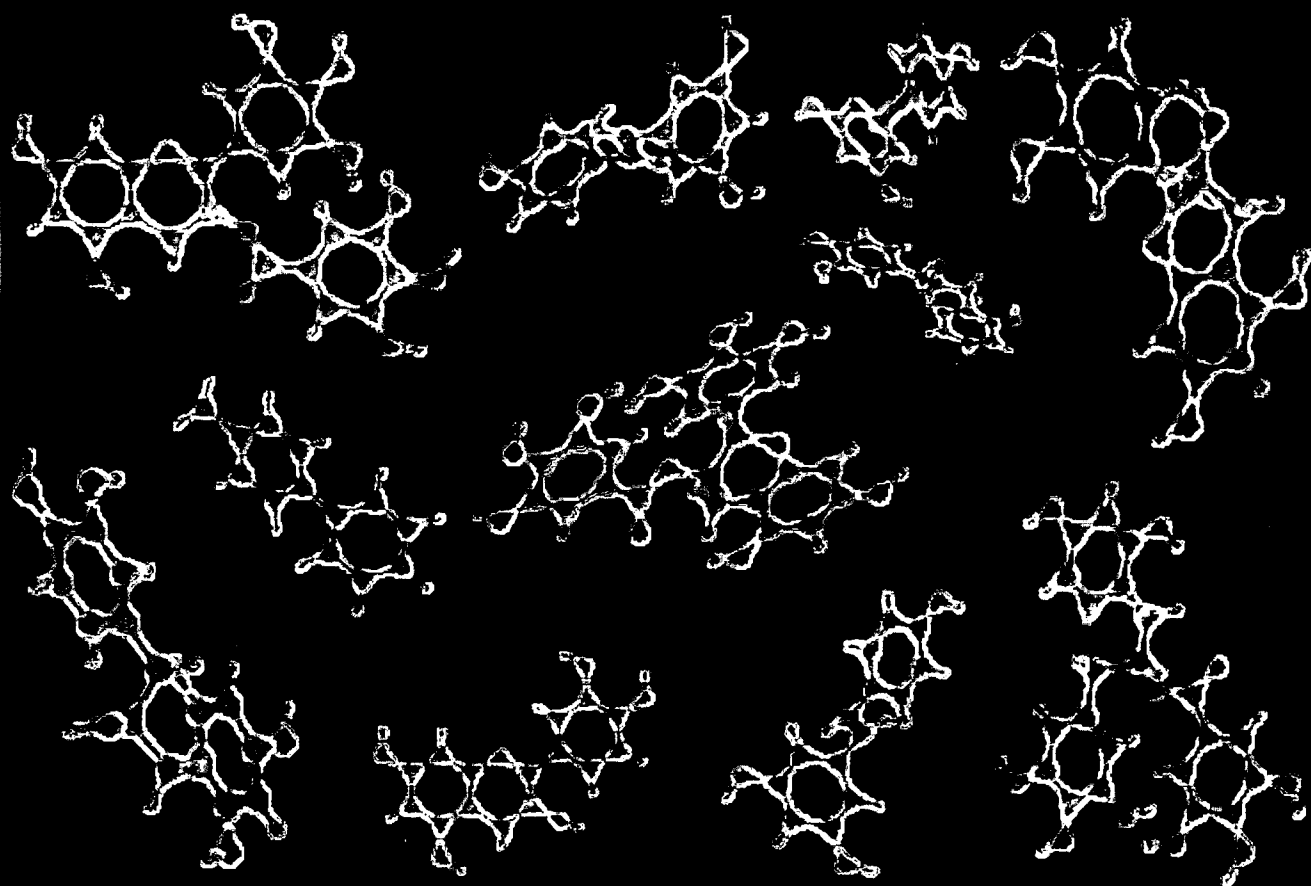


# Captação de Catiões Orgânicos em Células Caco-2

## Efeitos do Vinho e do Chá



Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

**CAPTAÇÃO DE CATIONES ORGÂNICOS  
EM CÉLULAS CACO-2**

**EFEITOS DO VINHO E DO CHÁ**

**Maria do Rosário Barbosa Monteiro**

PORTO  
JULHO DE 2002

## AGRADECIMENTOS

Perante o resultado deste trabalho de investigação, sinto a necessidade de realçar a importância daqueles que, de uma forma ou de outra, permitiram a sua realização. Aos investigadores e colaboradores do Serviço de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, agradeço sinceramente, e espero retribuir a atenção, o tempo dispendido, o apoio e a amizade com que fui recebida. Não posso deixar de salientar a contribuição decisiva da Professora Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo, directora do Serviço, da Professora Doutora Maria da Conceição Costa Pinho Calhau, minha orientadora e da Professora Doutora Maria de Fátima Moreira Martel.

Aos meus professores e alunos, estou também grata pelo incentivo e pelos conhecimentos que me transmitiram.

Finalmente, aos meus amigos, aos meus pais e ao Marco, a quem as palavras são curtas para demonstrar o que sinto, agradeço por tudo que me proporcionaram e permitiram realizar.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – *adonesine triphosphate* (trifosfato de adenosina)

Caco-2 – células derivadas de carcinoma de cólon humano com diferenciação enterocítica

CV – chá verde

CP – chá preto

DMSO – dimetilssulfóxido

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilenodiaminotetracético)

EGCG – epigallocatequina-3-galato

EMT – *extraneuronal monoamine transporter* (transportador extraneuronal de monoaminas)

EtOH – etanol

[<sup>3</sup>H] – trício (radiação *beta*)

LDH – *lactate dehydrogenase* (desidrogénase do lactato)

MPP<sup>+</sup> – 1-metil-4-fenilpiridínio

MPP<sup>+</sup>-[<sup>3</sup>H] – 1-metil-4-fenilpiridínio triciado

NADH – *reduced nicotinamide-adenine dinucleotide* (dinucleótido de nicotinamida-adenina reduzido)

OCT – *organic cation transporter* (transportador de catiões orgânicos)

pKa – operador p (logaritmo do inverso) da constante de dissociação de um ácido

pH – operador p (logaritmo do inverso) da actividade hidrónica

VB – vinho branco

VBD – vinho branco desalcoholizado

VT – vinho tinto

VTD – vinho tinto desalcoholizado

## ÍNDICE



1. Resumo .....	7
2. Introdução .....	9
3. Objectivos .....	13
4. Materiais e Métodos .....	14
5. Resultados .....	21
6. Discussão .....	31
7. Conclusão .....	41
8. Bibliografia .....	43

## 1. RESUMO

Nos últimos anos têm-se reunido dados epidemiológicos que sugerem um papel protector do consumo de vinho e de chá, especialmente vinho tinto e chá verde, para a saúde humana, nomeadamente no que diz respeito à doença coronária e a certos tipos de neoplasias. Tem sido recentemente descrito que o consumo destas bebidas poderá influenciar a eficácia terapêutica de muitos fármacos. Muitos metabolitos endógenos e medicamentos são, a pH fisiológico, cationes orgânicos. Assim, este trabalho foi realizado com o objectivo de esclarecer a possível influência destas bebidas na captação intestinal de cationes orgânicos.

Como modelo de células intestinais usaram-se células Caco-2, células derivadas de carcinoma de cólon humano, com fenótipo enterocítico. A variação da entrada de  $MPP^+-[^3H]$  (1-metil-4-fenilpiridínio; 200 nM) foi determinada pela incubação destas células, durante 5 minutos, na presença de vinho tinto (VT), vinho branco (VB), vinho tinto desalcoholizado (VTD), vinho branco desalcoholizado (VBD), chá verde (CV) e chá preto (CP) (500  $\mu$ l/ml), e VT, VB, CV e CP sujeitos a diálise. O VT, o VTD, o CV e o CP aumentaram de forma significativa a captação de  $MPP^+-[^3H]$ , o VBD e os vinhos sujeitos a diálise diminuíram este transporte. O VB e os chás dialisados não tiveram qualquer efeito sobre este parâmetro. É de realçar que o VTD e o CP tiveram um efeito menos acentuado que o verificado na presença de VT e de CV, respectivamente. Para além das bebidas, as células foram ainda incubadas na presença de alguns dos seus componentes. O resveratrol (100  $\mu$ M) e a epigallocatequina-3-galato (EGCG; 100  $\mu$ M) aumentaram a captação de  $MPP^+-[^3H]$ . A catequina (100  $\mu$ M e 1 mM), a miricetina (25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M), a quercetina (50  $\mu$ M), a teofilina (1mM) e a cafeína (1mM) reduziram este

transporte. Curiosamente, o etanol, na mesma concentração existente no vinho testado (47,4 mg/ml), reduziu a captação do catião orgânico modelo. Através do doseamento da actividade da enzima desidrogénase do lactato, verificou-se que o VT, o VB, o CV e o CP, em contacto com as células durante 25, 45 e 80 minutos, não alteraram ou até melhoraram a viabilidade celular.

Assim, conclui-se que (i) o aumento da captação de  $MPP^+-[^3H]$  em células Caco-2 na presença de VT e VTD poderá, pelo menos em parte, ser explicado pelo resveratrol; (ii) o etanol poderá facilitar a solubilização, a biodisponibilidade e/ou o efeito de outros compostos do vinho, o que explicará as diferenças na intensidade do efeito observado na presença de VT e VTD; (iii) os compostos de elevado peso molecular presentes no vinho poderão contribuir de forma marcada para o aumento do transporte de  $MPP^+-[^3H]$ , o que é sugerido pelos resultados obtidos com os vinhos dialisados e (iv) a EGCG poderá explicar, pelo menos em parte, o aumento da captação de  $MPP^+-[^3H]$  em células na presença dos chás. A diferença entre os efeitos dos dois tipos de chá, com maior potência do CV, reforça esta hipótese, uma vez que este composto fenólico é mais abundante no CV comparativamente ao CP. Em suma, os nossos resultados sugerem que, a biodisponibilidade de fármacos e nutrientes, catiões orgânicos, será influenciada pela ingestão de vinho tinto ou branco, chá verde ou preto, o que poderá condicionar os efeitos terapêuticos e/ou toxicológicos destes fármacos/nutrientes.

## 2. INTRODUÇÃO

A estrutura que reveste a célula, separando o meio intracelular do meio extracelular, é a membrana plasmática. Esta é constituída essencialmente por uma camada dupla de fosfolipídios que se organizam formando uma barreira à passagem de água e de outras substâncias, com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. A membrana possui ainda proteínas integrais que a atravessam, rompendo a continuidade da camada lipídica. Algumas dessas proteínas são proteínas transportadoras e têm a seu cargo o transporte de substâncias que, de outro modo, não atravessariam a membrana. Estas proteínas ligam-se às moléculas ou aos iões a serem transportados e, após alterações conformacionais da molécula transportadora, movem as substâncias através dos interstícios da proteína até ao outro lado da membrana plasmática. Em geral, estas proteínas são altamente selectivas para a molécula ou ião de cujo transporte se encarregam<sup>1</sup>. As moléculas que entram ou saem da célula por recurso a proteínas transportadoras são geralmente glícidos, aminoácidos, neurotransmissores e iões de metais, em suma, moléculas que pelas suas características físico-químicas não atravessam livremente as membranas celulares, isto é, todas as que não são hidrofóbicas e de baixo peso molecular. Muitas vezes o transporte transmembranar requer uma fonte de energia, pelo que o processo pode ser acoplado à hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) ou ao gradiente electroquímico de uma outra substância como o ião sódio<sup>2</sup>. Este tipo de transporte pode ocorrer em ambos os sentidos, isto é, pode ocorrer quando se absorvem ou segregam substâncias<sup>3</sup>.

A principal função do intestino é absorver as moléculas que resultam dos processos digestivos sobre os alimentos<sup>4</sup>. Para além disso, o epitélio intestinal, foi recentemente reconhecido como local importante de secreção de muitas substâncias<sup>5</sup>. Também muitos fármacos encontram neste epitélio a principal forma de entrada para o organismo. Como uma grande parte destas moléculas de importantes grupos terapêuticos são polares, não conseguem difundir através da membrana celular. Desta forma, o seu transporte necessita ser efectuado através de proteínas transportadoras da membrana, que controlam a sua passagem consoante a selectividade destes transportadores<sup>5</sup>. Assim, a regulação deste transporte, nomeadamente a nível intestinal, constitui um factor determinante para a biodisponibilidade e até mesmo para a possível toxicidade destes compostos.

Muitos metabolitos endógenos e medicamentos são moléculas com uma ou mais aminas primárias, secundárias, terciárias ou quaternárias podendo ser protonados, no pH fisiológico, dependendo do seu pKa. Colectivamente estes compostos são denominados de catiões orgânicos e incluem fármacos pertencentes a importantes classes terapêuticas tais como os anti-histamínicos, os relaxantes do músculo esquelético, os anti-arrítmicos, os agentes bloqueadores dos receptores adrenérgicos  $\beta$ , entre outros. Incluem ainda muitas aminas bioactivas como a dopamina, a colina e a *N*<sup>1</sup>-metilnicotinamida, adrenalina e guanidina<sup>5,6</sup>. Algumas vitaminas como a tiamina e a riboflavina, ou outros componentes alimentares tais como as aminas biogénicas histamina e tiramina pertencem também a esta classe de compostos<sup>7,8</sup>. Como tal, o transporte destes compostos através das membranas celulares é mediado por transportadores. Muitos dos transportadores que se encarregam do transporte de moléculas orgânicas carregadas positivamente pertencem à família dos transportadores de

catiões orgânicos (OCTs, *organic cation transporters*) existentes em vários tecidos epiteliais tais como o rim, o fígado e o intestino. Nestes tecidos, estes transportadores têm funções de transporte de endo- e xenobióticos. Existem, no entanto, outros transportadores de catiões orgânicos não pertencentes a esta família, nestes e noutros epitélios<sup>5</sup>.

Nos últimos anos têm-se reunido dados epidemiológicos que sugerem um papel protector do vinho, especialmente do vinho tinto, para a saúde humana, nomeadamente no que diz respeito à doença coronária e a certos tipos de neoplasias. Uma vez que o vinho é uma matriz tão complexa, é difícil atribuir os seus efeitos a qualquer dos compostos que o compõem. No entanto, têm sido realizados muitos estudos na tentativa de desvendar este mistério.

Pelo menos alguns dos efeitos do vinho são atribuídos ao etanol que nele existe na concentração de 10 a 13% (v/v). Mais recentemente têm sido descritas actividades protectoras de alguns compostos presentes nos vinhos em quantidades importantes, como os flavonóides<sup>9,10</sup>.

Relativamente a estes compostos e ao seu efeito protector, há ainda a considerar as investigações realizadas sobre o chá, particularmente o chá verde.

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado o efeito protector do consumo de chá em relação à aterosclerose, à doença coronária, à elevação do colesterol plasmático e à elevação da tensão arterial. Menos estudos sugerem protecção do chá relativamente ao acidente vascular cerebral, ao enfarte do miocárdio, à osteoporose, às doenças hepáticas e às infecções bacterianas e virais<sup>11,12</sup>.

O chá e o vinho têm em comum o facto de serem ricos em compostos polifenólicos. Este grupo de mais de 8000 compostos tem suscitado o interesse da comunidade científica pela multiplicidade de propriedades que se têm vindo a

atribuir a alguns deles, essencialmente uma actividade anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-alérgica, hepatoprotectora, anti-trombótica, anti-viral e anti-carcinogénica<sup>13,14,15,16</sup>.

Tem sido recentemente descrito que o consumo destas bebidas influenciará a eficácia terapêutica de muitos fármacos<sup>17,18,19</sup>. Pela escassa informação sobre os possíveis efeitos destas mesmas bebidas na absorção intestinal de catiões orgânicos, pareceu-nos pertinente o estudo da influência dos vinhos tinto e branco e dos chás verde e preto na captação intestinal destes compostos.

Recentemente tornaram-se disponíveis culturas celulares que permitem o estudo do transporte intestinal. Entre estas está a linha de células de carcinoma de cólon humano, Caco-2. Embora sejam derivadas de cólon, no estado de diferenciação completa, estas células apresentam fenótipo enterocítico. Em confluência, o que acontece após cerca de 5 dias de cultura formando monocamadas, apresentam microvilosidades, enzimas, receptores e transportadores característicos do epitélio intestinal, constituindo um bom modelo para estudos de transporte intestinal<sup>20</sup>.

O catião orgânico 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP<sup>+</sup>) é um reconhecido substrato para alguns dos transportadores de catiões orgânicos, tais como o OCT1, o OCT2 e o OCT3<sup>21</sup> (recentemente denominado de EMT – *extraneuronal monoamine transporter*<sup>22</sup> e, não é metabolizado *in vivo*<sup>23</sup>.

Assim, este catião é usado como modelo em estudos de transporte de catiões orgânicos<sup>24,25,26</sup>.

### 3. OBJECTIVOS

Este trabalho de investigação, realizado no Serviço de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, teve como principais objectivos testar o efeito de diferentes bebidas, ricas em compostos fenólicos (vinho tinto e vinho branco, chá verde e chá preto), no transporte intestinal de cationes orgânicos. Para além disso, efectuaram-se ensaios no sentido de clarificar quais os compostos fenólicos, presentes nestas bebidas, responsáveis pelos efeitos observados. Adicionalmente tivemos como objectivo esclarecer o papel do etanol, no caso dos vinhos, nos efeitos destes sobre a biodisponibilidade dos cationes orgânicos. Pretendeu-se ainda verificar a possível alteração da viabilidade de células intestinais tratadas com as bebidas em estudo.

#### 4. MATERIAS E MÉTODOS

**Materiais.** MPP<sup>+</sup>-[<sup>3</sup>H] (acetato de N-[metil-<sup>3</sup>H]-4-fenilpiridínio, actividade específica 82 Ci mmol<sup>-1</sup>; New England Nuclear, Dreieich, Alemanha); MPP<sup>+</sup> (iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio; Research Biochemicals International, Natick, MA, EUA); alfa-amilase de pâncreas de Porco (EC 3.2.1.1; 57 U/mg), cafeína, (+)-catequina hidratada, HEPES (N-2-ácido etanosulfónico-N'-2-hidroxietilpiperazina), (-)-epigallocatequina-3-galato, miricetina, pancreatina de pâncreas de Porco, pepsina A de estômago de Porco (EC 3.4.23.1; 1:10000), quercetina di-hidratada, resveratrol, sais biliares (cerca de 50% de colato de sódio e 50% de desoxicolato de sódio), solução de penicilina/estreptomicina, teofilina, Tris (hidroclorato de tris-(hidroximetil)-aminometano), solução de tripsina-EDTA (Sigma, St. Louis, MO, USA); DMSO (dimetilssulfóxido; Merck, Darmstadt, Alemanha); papel de filtro (Ø 90 mm; Whatman, England). Chá preto e chá verde dos Açores, Portugal. Membranas de diálise (MWCO 12-14000 Da; Medicell Int., Inglaterra). Vinho tinto e vinho branco da região do Douro, Portugal. A (+)-catequina foi dissolvida em etanol (1%); a cafeína, a quercetina, a miricetina, o resveratrol e a teofilina foram dissolvidos em DMSO (1%). Os controlos para estes compostos foram realizados na presença do solvente correspondente.

**Culturas celulares.** A linha celular Caco-2 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md., EUA) e foi utilizada entre as passagens 40 e 70. As células Caco-2 (ATCC 37-HTB) foram mantidas a 37°C em atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>/95% de ar e foram cultivadas em *Minimal Essential*

*Medium* (MEM; Sigma, St Louis, Mo., USA) suplementado com 20% de soro fetal de Boi, 25 mM de HEPES, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B (todos adquiridos na Sigma). O meio de cultura foi mudado a cada 2-3 dias e a divisão da cultura foi efectuada a cada 7 dias. Para realizar uma subcultura as células foram removidas enzimaticamente das placas (0,25% de Tripsina-EDTA, 5 minutos, 37°C), diluídas de 1:3 e semeadas em placas Petri de poliestireno (21cm<sup>2</sup>, Ø 60 mm; Corning Costar, NY., USA). As células para as experiências foram cultivadas em placas de poliestireno com 24 poços (2 cm<sup>2</sup>, Ø 16 mm; Corning Costar). Durante as 24 horas antes da experiência as células foram mantidas em meio de cultura sem soro fetal. As experiências foram realizadas com células com 7 dias de cultura. Cada cm<sup>2</sup> continha cerca de 200-300 µg de proteínas celulares.

**Estudo funcional de captação de catiões orgânicos.** O estudo do transporte de MPP<sup>+</sup>-[<sup>3</sup>H] foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Martel et al (2000)<sup>25</sup>, da qual farei uma breve descrição. Inicialmente o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas em meio Hanks a 37°C. De seguida as células foram pré-incubadas com meio Hanks a 37°C. O transporte foi iniciado pela adição de 300 µl de meio de Hanks contendo MPP<sup>+</sup>-[<sup>3</sup>H] a 200 nM. A incubação foi terminada ao fim de 5 minutos pela adição de 500 µl de meio de Hanks a 4°C. As células foram então solubilizadas pela adição de 300 µl de Triton X-100 a 0,1% (v/v) (em Tris-HCl a 5 mM, pH 7,4) e permaneceram durante 18-24 horas à temperatura ambiente. A composição do meio Hanks (em mM) foi a seguinte: 137 de NaCl, 5 de KCl, 0,8 de MgSO<sub>4</sub>, 1,0 de MgCl<sub>2</sub>, 0,33 de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 de CaCl<sub>2</sub>, 0,15 de Tris-HCl e 1,0 de butirato de

sódio, com o pH ajustado a 7,4. A radioactividade nas células foi determinada por cintilometria líquida em contador de radiação *beta*.

**Preparação das bebidas em estudo.** Foram usados vinhos tinto e branco provenientes da região do Douro (Portugal, 12% álcool (v/v)) e os mesmos vinhos tinto e branco desalcoholizados. Os vinhos foram testados nas concentrações de 500  $\mu$ l por ml de meio Hanks, presentes na pré-incubação e na incubação (o que equivale a cerca de 47,4 mg de etanol/ml de meio de pré-incubação ou incubação). Os chás verde e preto foram preparados pela infusão, durante 10 minutos, de 600 mg de folhas de chá verde ou preto (provenientes dos Açores, Portugal), em 200 ml de água fervida, seguida de filtração durante 20 minutos com papel de filtro (Whatman, Inglaterra;  $\varnothing$  90 mm, retenção até 0,7  $\mu$ m). Os chás nas concentrações de 500  $\mu$ l e 250  $\mu$ l por ml de meio Hanks estiveram presentes na pré-incubação e na incubação (1,5 mg e 0,75 mg por ml de meio Hanks, respectivamente). As células foram incubadas com os respectivos veículos das bebidas: 500  $\mu$ l de água bidestilada com 47,4 mg/ml de etanol por ml de meio Hanks no caso dos vinhos intactos, e 500  $\mu$ l e 250  $\mu$ l água bidestilada por ml de meio Hanks no caso dos vinhos desalcoholizados e dos chás.

**Estudo do efeito de compostos.** Os compostos a testar estiveram presentes durante a pré-incubação e a incubação.

**Extracção do etanol.** Os vinhos tintos e brancos foram submetidos a evaporação do etanol num evaporador rotativo (BUCCHI, Waterbath B480), à

pressão de 75 mbar a 30°C durante aproximadamente 60 minutos. A concentração final foi determinada por cromatografia gasosa<sup>27</sup>. A extracção do etanol foi realizada pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto.

**Determinação do índice de compostos fenólicos nos vinhos.** A determinação da composição do vinho em compostos fenólicos foi efectuada por doseamento espectrofotométrico a 280 nm de uma amostra de vinho diluída 50 vezes, de acordo com a metodologia descrita por Mateus e Freitas (2001)<sup>28</sup>. Este procedimento foi realizado pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto.

**Determinação do índice de diálise nos vinhos.** Este índice representa uma medida dos polifenóis de elevado peso molecular e a sua determinação foi descrita por Mateus e Freitas (2001)<sup>28</sup>. Brevemente, colocaram-se 5 ml do vinho em estudo num tubo de diálise (celulose; peso molecular *cut-off* 12-16000 Da; raio médio de poro de 25 Å). O tubo foi colocado num recipiente com uma solução alcoólica (etanol 12%, v/v, e 5 g/l de ácido tartárico, pH 3,2). Terminada a diálise, o conteúdo deste recipiente foi colocado num balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com a referida solução alcoólica. As soluções foram armazenadas à temperatura ambiente durante 24 horas e determinou-se a absorvância a 280 nm desta solução e de uma outra, de referência. A diferença entre a absorvância da solução de referência e da solução sujeita a diálise, dividida pela absorvância da solução referência constitui o índice de diálise. Este

procedimento foi realizado pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto.

**Separação de compostos de elevado peso molecular.** As membranas de diálise (*molecular weight cut-off* de 12-14000 Da) foram primeiramente mergulhadas em água destilada e de seguida colocadas durante 30 minutos a 80°C, em bicarbonato de sódio a 10 mM, com agitação permanente. As membranas foram transferidas para solução de EDTA dissódico a 10 mM, durante 30 minutos. Colocaram-se novamente a 80°C em água destilada, durante 30 minutos, com agitação permanente. Terminado este tempo, deixaram-se arrefecer, secaram-se e colocaram-se em solução de formaldeído a 1% (v/v) para serem armazenadas a 4°C, tendo o cuidado de as manter sempre submersas na solução. Este procedimento tem como objectivo a eliminação dos resíduos de glicerol, de compostos sulfurosos e de pequenas quantidades de metais pesados, possivelmente presentes na membrana de diálise.

A diálise decorreu num contentor de Teflon de parede dupla, pelo interior do qual se fez passar água destilada à temperatura constante de 37°C. A metodologia seguida foi a descrita por Azenha (2000)<sup>29</sup>, da qual farei uma breve descrição. Primeiramente, colocaram-se 50 ml da amostra a dialisar no interior do tubo juntamente com 25 ml de solução A (solução A: pepsina a 10 g/l, HCl a 0,02 M e NaCl a 0,15 M) e manteve-se a 37°C com agitação durante 3 horas. No decorrer deste período verificou-se o pH que foi cerca de 3,5.

A membrana de diálise foi preparada lavando-a no interior e no exterior com água destilada (todo o manuseamento da membrana de diálise foi sempre realizado usando luvas). Secou-se, encheu-se com 12 ml de solução de

bicarbonato de sódio a 10% (p/v) e fechou-se a membrana em ambas as extremidades.

Terminada esta fase, adicionaram-se, ao conteúdo do recipiente 12 ml de solução de sais biliares a 1,5 g/l e solução B (solução B: pancreatina a 30 g/l e amilase a 10 g/l) e mergulhou-se no seu conteúdo a membrana de diálise previamente preparada. Manteve-se à temperatura de 37°C durante 3 horas, com agitação permanente. No final, o conteúdo da solução no interior da membrana apresentava um valor de pH aproximadamente de 7,4. O produto de diálise foi então armazenado a -80°C até à realização experimental.

A soluções enzimáticas e de sais biliares foram sempre preparadas no dia da experiência.

As células Caco-2 foram incubadas na presença e na ausência dos produtos de diálise e efectuaram-se os respectivos controlos (controlo dos vinhos: produto de diálise de uma solução com 12% (v/v) de etanol, 0,3 % de ácido tartárico, pH 3,5; controlo dos chás e dos vinhos desalcoholizados: produto da diálise de uma solução de 0,15 M de NaCl)

**Determinação da viabilidade celular.** A determinação da viabilidade celular após diversos tratamentos foi realizada através do doseamento da actividade da enzima desidrogenase do lactato (LDH, *lactate dehydrogenase*, EC 1.1.1.27) de acordo com o método descrito por Bergmeyer e Bernt (1974)<sup>30</sup>, tratando-se de uma enzima intracelular. Para tal, as células foram incubadas na presença dos compostos em estudo, durante diferentes períodos de tempo (25, 45 e 80 minutos). Começou-se por aspirar o meio de cultura e lavar as células com 300 µl de meio Hanks a 37°C. Colocaram-se 300 µl de meio de incubação com o

composto em estudo, diluído em meio de Hanks (com a composição supra-referida). No final da incubação retirou-se uma alíquota de 50  $\mu$ l de meio de incubação, para doseamento da actividade extracelular da LDH, de seguida aspirou-se o restante meio. Colocaram-se 300  $\mu$ l de Triton X-100 a 0,1% (v/v) (em Tris-HCl a 5 mM, pH 7,4) e colocaram-se as placas a 37°C durante 30 minutos. Obteve-se um homogeneizado celular do qual se retirou uma nova alíquota de 50  $\mu$ l para doseamento da actividade intracelular de LDH.

As alíquotas foram adicionadas no momento da leitura espectrofotométrica a 1,5 ml de solução C e 25  $\mu$ l de solução D. A composição da solução C era a seguinte (em mM): 50 de solução amortecedora de fosfatos ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ), 0,63 de piruvato de sódio com pH ajustado para 7,5. A solução D consistia de NADH dissódico a 11,3 mM e  $NaHCO_3$  a 10 mg/ml. Efectuou-se a análise da actividade enzimica durante 120 segundos a 25°C, por determinação da variação da absorvância a 340 nm.

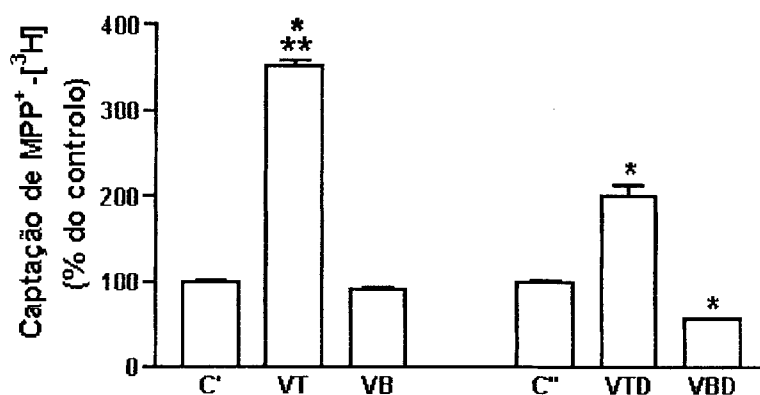
**Quantificação das proteínas.** A quantidade de proteína do homogeneizado celular foi determinada pelo método de Bradford (1976)<sup>31</sup>, tendo como referência a albumina do soro.

**Análise estatística.** As médias aritméticas são apresentadas com o erro padrão da média (SEM). A diferença entre vários grupos foi avaliada usando o teste de análise de variância (teste ANOVA) seguido do teste Newman-Keuls. Para a comparação entre dois grupos foi usado o teste *t* de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando foi obtido um  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

De acordo com Martel et al (2000)<sup>25</sup>, a captação de  $MPP^+-[^3H]$  por células Caco-2 é linear durante os primeiros 15 minutos de incubação. Deste modo para determinar as taxas iniciais de captação, no presente estudo, as células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas durante 5 minutos (200 nM de  $MPP^+-[^3H]$ ) na presença ou na ausência dos compostos em estudo.

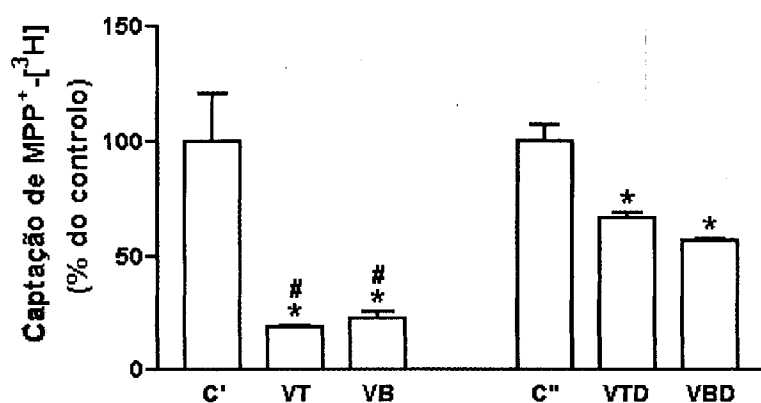
**Efeito sobre a captação de  $MPP^+-[^3H]$ .** O vinho tinto (VT) na concentração de 500  $\mu$ l/ml (47,4 mg de EtOH/ml,  $n=18$ ) aumentou significativamente o transporte de  $MPP^+-[^3H]$  em células Caco-2, quando comparado com o controlo (47,4 mg de EtOH/ml;  $1,4 \pm 0,2$  pmol de  $MPP^+-[^3H]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=15$ ).



**Figura 1** – Efeito do vinho tinto e do vinho branco (500  $\mu$ l/ml) sobre a captação de  $MPP^+-[^3H]$  em células Caco-2. Vinho tinto (VT;  $n=18$ ), vinho tinto desalcoholizado (VTD;  $n=6$ ), vinho branco (VB;  $n=18$ ) e vinho branco desalcoholizado (VBD;  $n=6$ ). Os compostos testados estiveram presentes na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (5 minutos; 200 nM de  $MPP^+-[^3H]$ ). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C',  $1,4 \pm 0,2$  pmol de  $MPP^+-[^3H]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=15$ ; C'',  $2,2 \pm 0,1$  pmol de  $MPP^+-[^3H]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ). \* $P < 0,05$  vs respectivo controlo; \*\* $P < 0,05$  vs VTD.

Por outro lado, o vinho branco (VB), na mesma concentração, diminuiu este transporte, embora de forma não significativa. O transporte do catião  $MPP^+$  foi, em percentagem do controlo, de  $353 \pm 28\%$  e de  $90 \pm 7\%$  para o VT e para o VB, respectivamente (figura 1).

O VT desalcoholizado (VTD;  $n=6$ ) na mesma concentração ( $500 \mu\text{l/ml}$ ), teve um efeito semelhante ao observado na presença de VT, sobre a captação de  $MPP^+ - [^3\text{H}]$ . No entanto, o aumento verificado com o VTD ( $200 \pm 31\%$ ) foi significativamente menor que o aumento verificado na presença de VT (figura 1). Quando ao VB foi extraído o etanol, verificou-se que esta alteração foi importante para o efeito agora observado, isto é, o VB desalcoholizado (VBD;  $n=6$ ) reduziu significativamente para cerca de 57% a captação quando comparado com o respectivo controlo ( $2,2 \pm 0,1$  pmol de  $MPP^+ - [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ).



**Figura 2** – Efeito do vinho tinto (VT,  $n=6$ ; VTD,  $n=6$ ) e do vinho branco (VB,  $n=6$ ; VBD,  $n=6$ ) após diálise (*cut-off* 12-14000 Da), sobre a captação de  $MPP^+ - [^3\text{H}]$ , em células Caco-2. O composto testado ( $500 \mu\text{l/ml}$ ) esteve presente na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (5 minutos; 200 nM de  $MPP^+ - [^3\text{H}]$ ). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C',  $1,6 \pm 0,6$  pmol de  $MPP^+ - [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ; C'',  $1,4 \pm 0,2$  pmol de  $MPP^+ - [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ). \* $P < 0,05$  vs respectivo controlo; #  $P < 0,05$  vs respectivo vinho desalcoholizado.

Os vinhos, bem como os vinhos desalcoholizados, sujeitos a diálise, como se pode observar na figura 2, diminuíram a captação de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ . No caso do VTD ( $66 \pm 7\%$ ;  $n=6$ ) e do VBD ( $56 \pm 2\%$ ;  $n=6$ ) a diminuição observada, em percentagem do controlo, foi menos acentuada do que com o VT ( $19 \pm 1\%$ ;  $n=6$ ) e com o VB ( $23 \pm 8\%$ ;  $n=6$ ), quando comparada com os respectivos controlos ( $1,4 \pm 0,2$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$  e,  $1,6 \pm 0,6$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ , respectivamente).

O etanol (figura 3) na concentração de 47,4 mg/ml e na concentração de 23,7 mg/ml diminuiu de forma significativa ( $53 \pm 7\%$ ;  $n=9$ ;  $41 \pm 13\%$ ;  $n=6$ , respectivamente) a captação de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$  em relação aos respectivos controlos ( $1,6 \pm 0,2$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=9$  e  $3,0 \pm 0,1$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ , respectivamente).

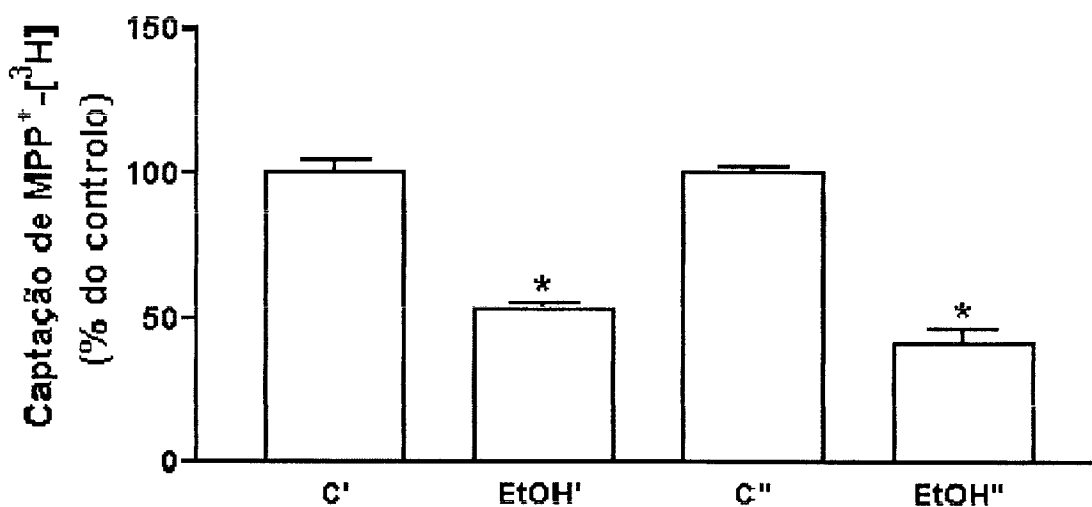
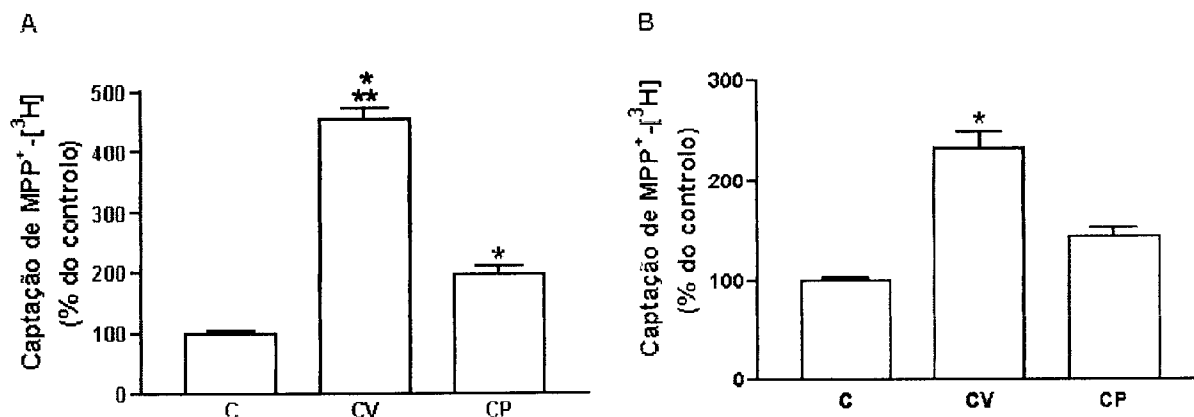


Figura 3 – Efeito do etanol (EtOH', 47,4 mg/ml,  $n=9$ ; EtOH'', 23,7 mg/ml,  $n=6$ ) sobre a captação de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$  em células Caco-2. O composto testado esteve presente na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (5 minutos; 200 nM de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ ). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C', 500  $\mu\text{l/ml}$  de água bidestilada,  $1,6 \pm 0,2$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ; C'', 250  $\mu\text{l/ml}$  de água bidestilada,  $3,0 \pm 0,1$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ). \* $P < 0,05$  vs controlo.

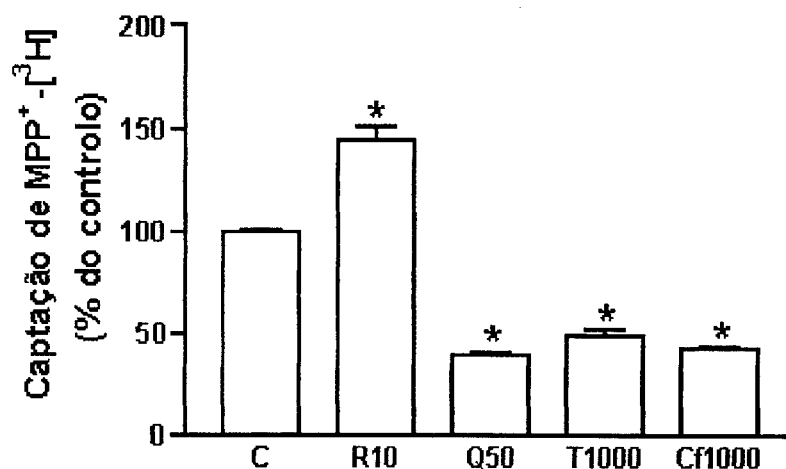
O chá verde (CV) e o chá preto (CP) nas concentrações de 500  $\mu\text{l/ml}$  e de 250  $\mu\text{l/ml}$  (1,5 e 0,75 mg de chá/ml, respectivamente), também aumentaram a captação de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ . Este efeito foi dependente da concentração (figuras 4A e 4B).



**Figura 4 – A** – Efeito do chá verde (CV; 500  $\mu\text{l/ml}$ ,  $n=9$ ) e do chá preto (CP; 500  $\mu\text{l/ml}$ ,  $n=6$ ) sobre a captação de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$  em células Caco-2. Os compostos testados estiveram presentes na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (5 minutos; 200 nM de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ ). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C;  $1,3 \pm 0,3$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=6$ ). \* $P < 0,05$  vs controlo; \*\* $P < 0,05$  vs CP. **B** – Efeito do chá verde (CV; 250  $\mu\text{l/ml}$ ,  $n=3$ ) e do chá preto (CP; 250  $\mu\text{l/ml}$ ,  $n=3$ ) sobre a captação de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$  em células Caco-2. Os compostos testados estiveram presentes na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (5 minutos; 200 nM de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ ). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C;  $3,0 \pm 0,1$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ). \* $P < 0,05$  vs controlo.

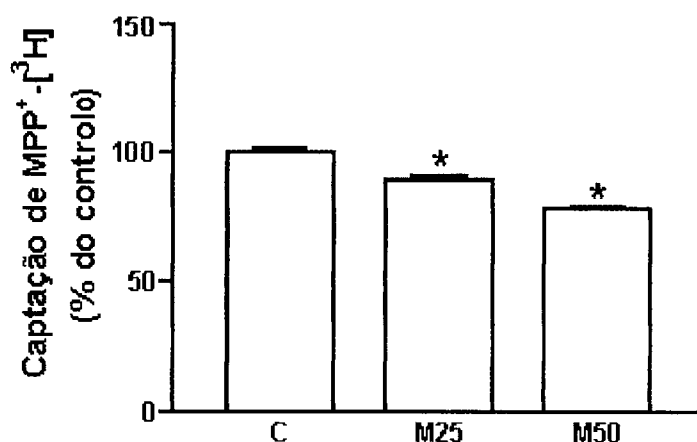
Os resultados, apresentados em percentagem do controlo, foram estatisticamente significativos para 500  $\mu\text{l/ml}$  de CV ( $454 \pm 55\%$ ;  $n=9$ ) e de CP ( $197 \pm 32\%$ ;  $n=6$ ) e para 250  $\mu\text{l/ml}$  de CV ( $231 \pm 29\%$ ;  $n=3$ ) e não significativos para 250  $\mu\text{l/ml}$  de CP ( $143 \pm 16\%$ ;  $n=3$ ), quando comparados com os respectivos controlos (500  $\mu\text{l/ml}$  de chá,  $1,3 \pm 0,3$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=6$ ; 250  $\mu\text{l/ml}$  de chá,  $3,0 \pm 0,1$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ).

Na concentração de 500  $\mu\text{l/ml}$ , o CV ( $63\pm 18\%$ ;  $n=3$ ) e o CP ( $77\pm 11\%$ ;  $n=3$ ) sujeitos a diálise não foram significativamente diferentes do respectivo controlo ( $1,4\pm 0,2$  pmol de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]/\text{mg}$  de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ).

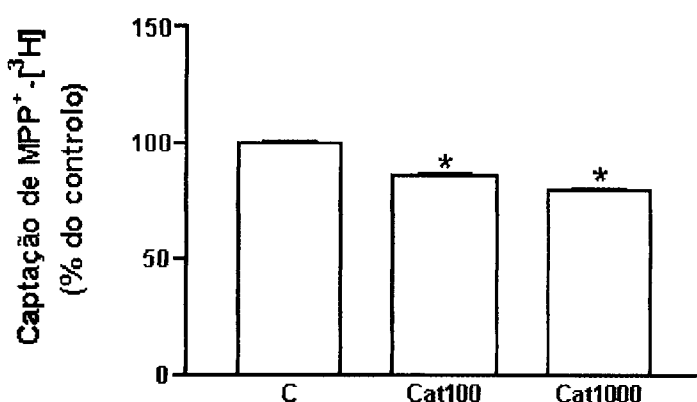


**Figura 5** – Efeito do resveratrol 10  $\mu\text{M}$  (R10;  $n=6$ ), da quercetina 50  $\mu\text{M}$  (Q50;  $n=6$ ), da teofilina 1mM (T1000;  $n=6$ ) e da cafeína 1 mM (Cf1000;  $n=6$ ) sobre a captação de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]$  em células Caco-2. Os compostos testados estiveram presentes na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (5 minutos; 200 nM de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]$ ). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C;  $1,7\pm 0,2$  pmol de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]/\text{mg}$  de proteína por 5 minutos,  $n=21$ ). \* $P < 0,05$  vs controlo.

O resveratrol na concentração de 10  $\mu\text{M}$  ( $n=6$ ) aumentou para 144% a captação de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]$  em células Caco-2 (figura 5), quando comparada com o respectivo controlo (1% de DMSO, v/v;  $1,7\pm 0,2$  pmol de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]/\text{mg}$  de proteína por 5 minutos,  $n=21$ ). Os flavonóis quercetina (figura 5) na concentração de 50  $\mu\text{M}$  ( $n=6$ ) e miricetina (figura 6) na concentração de 25  $\mu\text{M}$  ( $n=3$ ) e de 50  $\mu\text{M}$  ( $n=3$ ), diminuíram significativamente a captação do catião orgânico para cerca de 89%, de 78% e de 40%, respectivamente, em relação ao respectivo controlo.



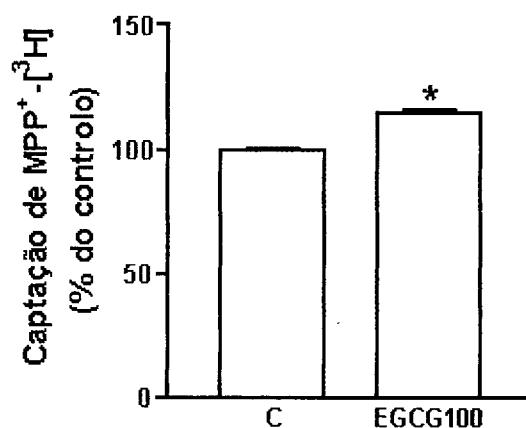
**Figura 6** – Efeito da miricetina 25  $\mu\text{M}$  (M25;  $n=3$ ) e 50  $\mu\text{M}$  (M50;  $n=3$ ) sobre a captação de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$  em células Caco-2. Os compostos testados estiveram presentes na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (5 minutos; 200 nM de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ ). Os resultados representam a percentagem do valor controle (C;  $2,6 \pm 0,2$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=6$ ). \* $P < 0,05$  vs controle.



**Figura 7** – Efeito da catequina a 100  $\mu\text{M}$  (Cat100;  $n=9$ ) e 1 mM (Cat1000;  $n=6$ ) sobre a captação de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$  em células Caco-2. Os compostos testados estiveram presentes na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (5 minutos; 200 nM de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ ). Os resultados representam a percentagem do valor controle (C;  $2,6 \pm 0,1$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=9$ ). \* $P < 0,05$  vs controle.

Também o flavanol catequina (figura 7) na concentração de 100  $\mu\text{M}$  ( $n=9$ ) e de 1 mM ( $n=6$ ), foi capaz de reduzir significativamente a captação do catião  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ , para cerca de 86% e de 79% relativamente ao respectivo controle (1% EtOH, v/v,  $2,6 \pm 0,1$  pmol de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=9$ ). No entanto, a

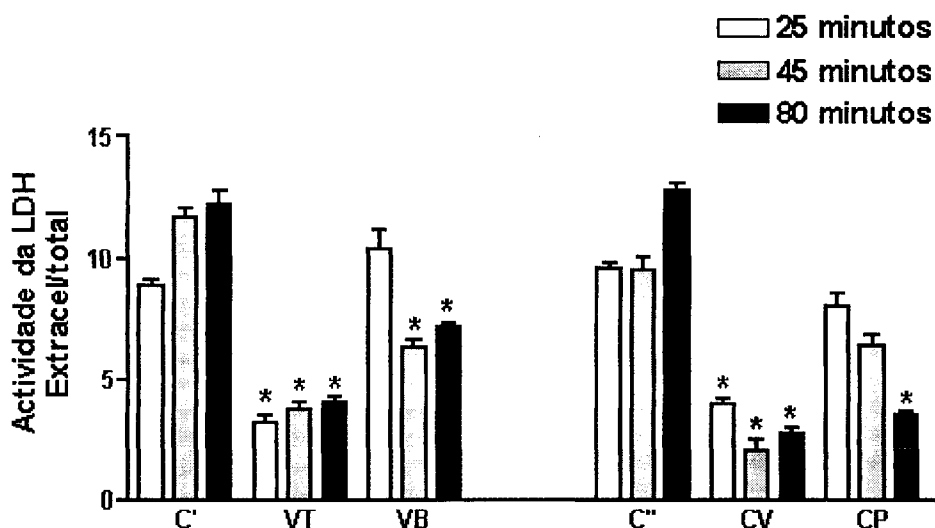
ECGC (figura 8) na concentração de 100  $\mu\text{M}$  ( $n=3$ ), aumentou ( $114\pm 3\%$ ) a captação deste catião em relação ao controlo ( $2,8\pm 0,03$  pmol de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]$ /mg de proteína em 5 minutos,  $n=3$ ). Relativamente às xantinas teofilina e cafeína, ambas na concentração de 1 mM, pudemos verificar da análise da figura 5 que estes compostos reduzem significativamente a captação do catião  $\text{MPP}^+$ .



**Figura 8** – Efeito da ECGC na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (EGCG100;  $n=3$ ) sobre a captação de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]$  em células Caco-2. O composto testado esteve presente na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (5 minutos; 200 nM de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]$ ). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C;  $2,8\pm 0,03$  pmol de  $\text{MPP}^+ - [^3\text{H}]$ /mg de proteína por 5 minutos,  $n=3$ ). \* $P < 0,05$  vs controlo.

**Efeito sobre a viabilidade celular.** como se pode observar na figura 9 aos 25 minutos de incubação o VT (500  $\mu\text{l/ml}$ ) reduziu significativamente a actividade da LDH no meio extracelular relativamente ao respectivo controlo ( $36\pm 9\%$ ;  $n=6$ ), o que traduz um aumento da viabilidade celular. Este resultado não foi observado com a incubação, durante 25 minutos, na presença de VB (500  $\mu\text{l/ml}$ ). Curiosamente foi observado idêntico comportamento na presença do CV e do CP (1,5 mg/ml de CV,  $n=3$  e de CP,  $n=3$ , respectivamente) também ao fim de 25 minutos de tempo de incubação, isto é, o CV reduziu significativamente a

actividade da LDH no meio extracelular relativamente ao respectivo controlo ( $41 \pm 5\%$ ;  $n=3$ ) e o CP não teve qualquer efeito sobre este mesmo parâmetro.



**Figura 9** – Efeito ao longo do tempo dos vinhos e dos chás (500  $\mu\text{l/ml}$ ) sobre a actividade da enzima LDH em células Caco-2. Os compostos testados estiveram presentes em diferentes tempos de incubação: 25 minutos (VT,  $n=6$ ; VB,  $n=3$ ; CV,  $n=3$ ; CP,  $n=3$ ), 45 minutos (VT,  $n=3$ ; VB,  $n=3$ ; CV,  $n=3$ ; CP,  $n=3$ ) e 80 minutos (VT,  $n=6$ ; VB,  $n=3$ ; CV,  $n=3$ ; CP,  $n=3$ ). Os resultados representam a relação da actividade da enzima LDH no meio extracelular/actividade total (C de 25 minutos,  $n=6$ ; C de 45 minutos,  $n=3$ ; C de 80 minutos,  $n=6$ ). A actividade enzimática total resulta da soma da actividade no meio extracelular com a actividade no meio intracelular.  $*P < 0,05$  vs controlo.

No entanto, pudemos ainda verificar da análise da figura 9 que, ao longo do tempo, tanto o VT como o CV mantêm os referidos efeitos sobre a viabilidade celular. O VB aos 45 minutos de incubação reduz significativamente a actividade da LDH no meio extracelular, efeito que se mantém aos 80 minutos de incubação. O CP não tem efeito significativo sobre este parâmetro também ao fim de 45 minutos de tempo de incubação. No entanto, aos 80 minutos de incubação das células Caco-2 com CP, foi verificada uma redução significativa da actividade da LDH no meio extracelular.

**Índice de compostos fenólicos e índice de diálise.** A partir da determinação do índice de compostos fenólicos e do índice de diálise dos vinhos efectuada pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto, verificou-se que o índice de compostos fenólicos do VT e do VB utilizados era de 57,6 e 8,15 e que o índice de diálise do VT e do VB era de 41,8 e 10,9, respectivamente (tabela 1).

	VT	VB	VT/VB
<b>Compostos fenólicos (280 nm)</b>	57,6	8,15	7,07
<b>% Índice de diálise</b>	41,8	10,9	3,83

**Tabela 1** – Índice de compostos fenólicos e índice de diálise do vinho tinto (VT) e do vinho branco (VB) e relação entre ambos (VT/VB).

## 6. DISCUSSÃO

A modulação dos mecanismos de transporte intestinal é alvo do interesse de muitos cientistas. É cada vez maior o número de estudos que tentam esclarecer os efeitos de componentes alimentares em processos de transporte intestinal de outras substâncias. Este facto terá cada vez maior relevância se considerarmos que de 1983 a 1994 foram aprovados cerca de 520 novos compostos com efeitos terapêuticos, 39% dos quais são fármacos de origem natural<sup>32</sup>.

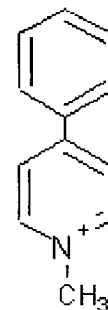
Nas últimas décadas, o chá e o vinho têm sido objecto da curiosidade da comunidade científica<sup>9,10,11,12,33,34</sup>. Inúmeros estudos epidemiológicos referem o consumo destas bebidas como factor protector em relação às doenças cardiovasculares e a certos tipos de cancro<sup>35,36,37,38,39</sup>. Foram já descritos alguns dos mecanismos bioquímicos que justificam os seus alegados efeitos<sup>34,38,39</sup>.

Pelo consumo crescente destas bebidas e, pela escassez de informação sobre a sua influência na absorção intestinal de fármacos de importantes classes terapêuticas ou de nutrientes, considerou-se importante o estudo do vinho, do chá e de alguns dos seus componentes sobre a captação de catiões orgânicos a nível intestinal.

Os catiões orgânicos representam um grande número de compostos com propriedades distintas, como medicamentos de várias classes terapêuticas, neurotransmissores, algumas vitaminas e aminas biogénicas. Existem no intestino, embora não exclusivamente, transportadores de catiões orgânicos que se encarregam do transporte deste tipo de moléculas<sup>5</sup>. Estes transportadores pertencem à família dos ASF (*Amphiphilic Solute Facilitator*; facilitador de solutos

anfílicos) e alguns dos membros deste grupo, tais como o OCT1, o OCT2 e o EMT, são expressos no intestino<sup>24</sup> e, em particular, também nas células Caco-2<sup>40</sup>.

O catião orgânico 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP<sup>+</sup>) (figura 10) é referenciado na literatura como um bom substrato para o OCT1, OCT2 e EMT, e não é metabolizado *in vivo*, pelo que foi usado como catião orgânico modelo<sup>23,24,25,40</sup>.



**Figura 10** – Estrutura do 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP<sup>+</sup>).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o VT e o VTD aumentaram o transporte de catiões orgânicos em células Caco-2 (figura 1). No entanto, o VTD foi significativamente menos potente que o VT, o que levanta a hipótese do etanol presente no VT contribuir de alguma forma para este efeito. Curiosamente, quando se testou o efeito do etanol, principal álcool do vinho<sup>9</sup>, numa concentração semelhante à presente na bebida (47,4 mg/ml), verificou-se uma diminuição da captação de MPP<sup>+</sup>-[<sup>3</sup>H] nestas mesmas células (figura 3). Este resultado parece discordante com os anteriores, no entanto, é no mesmo sentido dos resultados descritos por Corder et al (2001), que verificou que o efeito do sumo de uva sobre a diminuição da produção de endotelina-1 era menos pronunciado que o do vinho tinto.

Relativamente ainda à questão dos efeitos do etanol *versus* efeitos das bebidas alcoólicas, Sun et al (2002)<sup>39</sup> observa, em ratos Sprague Dawley, uma diminuição das alterações de parâmetros neurológicos (associados aos danos oxidativos nos neurónios provocados pelo consumo crónico de etanol), quando estes ingeriam dietas suplementadas simultaneamente com etanol e polifenóis extraídos de uvas.

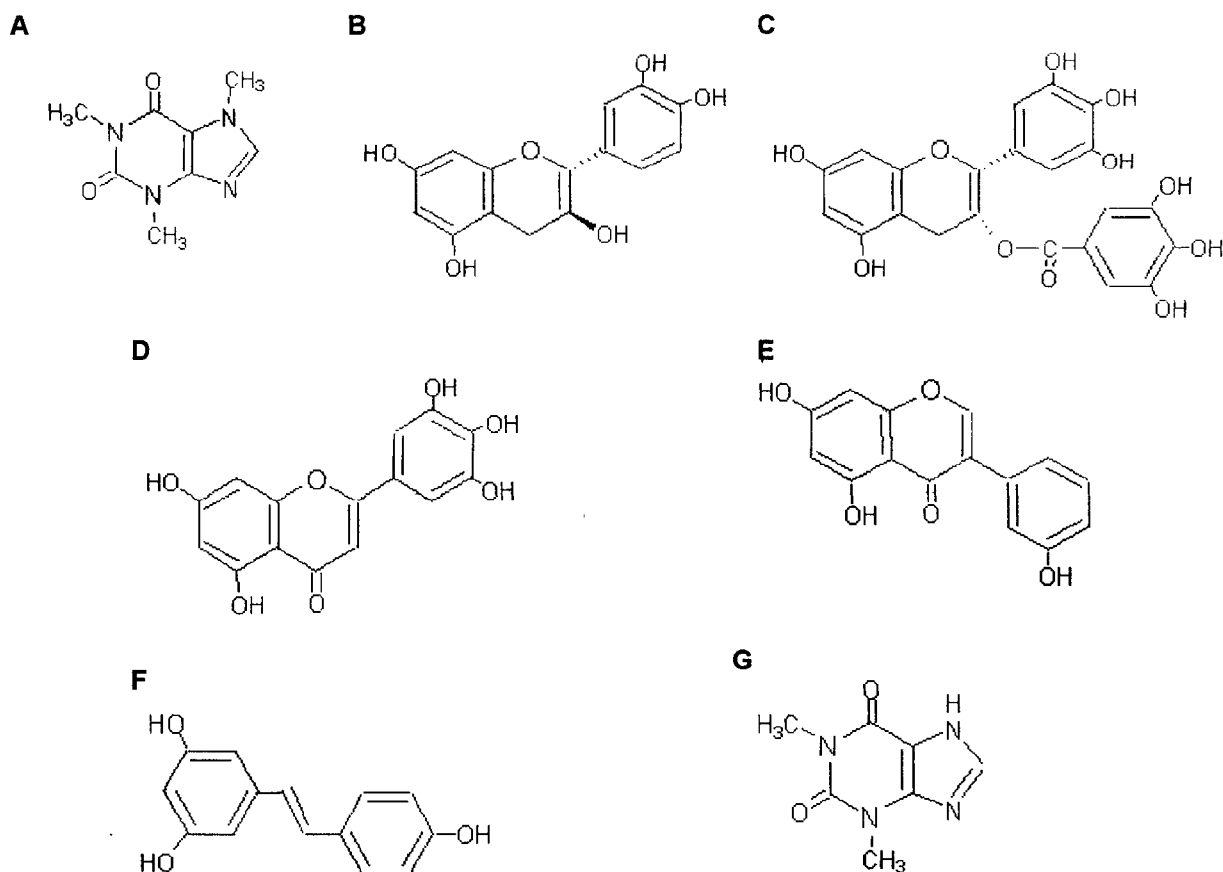
De acordo com estes resultados<sup>39</sup> e com os descritos no nosso trabalho, poderemos concluir que deverá existir alguma prudência quando se fazem extrapolações de dados resultantes de experiências efectuadas com etanol isoladamente e se generalizam as conclusões para as bebidas alcoólicas<sup>41,42,43,44,45,46</sup>. De facto, podem existir nessas bebidas, outros compostos que anulem ou invertam o efeito observado com o etanol sobre o(s) mecanismo(s) em estudo.

Sabe-se que durante a produção do vinho o etanol que é produzido atinge concentrações de 10 a 13% (v/v) no produto final, permitindo a extracção dos compostos polifenólicos das películas e das sementes das uvas e actuando como um solvente para muitos destes compostos<sup>9,33</sup>. Para além destes efeitos, o etanol poderá ter influência na potenciação dos efeitos de alguns dos compostos presentes no vinho, possivelmente por alterar a solubilização, a biodisponibilidade e/ou o directamente o efeito desses mesmos compostos, o que se poderá repercutir, neste caso, na captação de catiões orgânicos pelas células intestinais. A influência do etanol sobre o efeito de outros compostos presentes no vinho é apoiada pelos resultados obtidos neste estudo com a catequina. Este flavanol (figura 11B) existe no VT e no VB na concentração de cerca de 191,3 mg/ml e 34,9 mg/ml, respectivamente<sup>10</sup>. No presente trabalho verificamos que, quando diluído em etanol nas concentrações de 100  $\mu$ M e 1 mM, obtivemos uma redução significativa da captação de  $\text{MPP}^+ \text{-} [^3\text{H}]$ , dependente da concentração (figura 7). No entanto, quando se utilizou como solvente o DMSO para a catequina a 1 mM (resultados não apresentados), não foi observado qualquer efeito deste flavanol sobre a captação do catião  $\text{MPP}^+$ , o que apoia a hipótese da importância do

etanol, provavelmente enquanto solvente, sobre o efeito de alguns dos compostos presentes no vinho.

Assim, de acordo com os resultados obtidos na presença de catequina (em EtOH) não parece que, pelo menos em parte, seja este composto o responsável pelo aumento da captação de  $MPP^+$  observado com o VT e do VTD, podendo, no entanto, explicar os resultados obtidos com o VT sujeito a diálise.

Quando se testou o efeito de outros polifenóis do vinho (figuras 11D, 11E e 11F), para avaliar a qual(is) se poderiam atribuir os efeitos verificados com os vinhos sobre a captação de  $MPP^+-[^3H]$ , constatou-se que, dos compostos testados, apenas o resveratrol (10  $\mu M$ ) aumentou esta captação de forma significativa.



**Figura 11** – Estrutura dos compostos testados. **A**, cafeína; **B**, (+)-catequina; **C**, (-)-epigallocatequina-3-galato; **D**, miricetina; **E**, quercetina; **F**, *trans*-resveratrol; **G**, teofilina.

Este polifenol é um estilbeno, que existe nos vinhos tintos e brancos nas concentrações de 4,37 mg/l 0,68 mg/l, respectivamente<sup>38,47,48</sup>. Os flavonóis miricetina e quercetina, presentes apenas nos vinhos tintos (8,5 mg/ml e 7,7 mg/ml, respectivamente), nas concentrações testadas tiveram um efeito semelhante ao obtido com a catequina sobre a captação de  $MPP^+-[^3H]$  (figuras 5, 6 e 7). Assim, dos compostos testados, só o resveratrol poderá explicar, pelo menos em parte, o efeito do vinho tinto sobre a captação de  $MPP^+-[^3H]$  em células Caco-2.

O facto do VB diminuir a captação de  $MPP^+-[^3H]$  poderá possivelmente ser explicado pelas diferenças de composição em relação ao VT. Estes dois tipos de vinho testados apresentam consideráveis diferenças nos seus conteúdos em compostos polifenólicos. Os polifenóis constituem 85% do conteúdo fenólico do VT ( $\geq 1000$  mg/l) e apenas 20% do VB ( $\geq 50$  mg/l)<sup>9</sup>. Relativamente aos vinhos usados neste estudo, verificamos que o índice de compostos fenólicos, foi cerca de 7 vezes maior no VT do que no VB (tabela 1). Assim, com base nestes resultados, os compostos presentes no VT, responsáveis pelos efeitos observados sobre a captação de  $MPP^+$ , podem estar ausentes no VB ou existir em concentrações mais baixas. Neste último caso, o efeito que exerceriam pode não ser evidenciado por outros compostos presentes em maior abundância no VT. Como pudemos concluir dos resultados obtidos com a catequina, a miricetina e o etanol, existem no vinho compostos que diminuem a captação de  $MPP^+-[^3H]$ , o que também está no mesmo sentido dos resultados obtidos por Corder et al (2001)<sup>33</sup> que obteve menor efeito sobre a síntese de endotelina-1 com o VB do que com o VT e o sumo de uva.

Os resultados obtidos com os vinhos sujeitos a diálise (figura 2), sugerem que o efeito facilitador do transporte intestinal de catiões orgânicos verificado com o VT, provavelmente, se deve, em grande parte, a compostos com pesos moleculares superiores a 14000 Da. Sendo o índice de diálise uma medida da quantidade de taninos condensados, de complexos tanino-polissacarídeo e pigmentos polimerizados, consideramos importante, para explicar esta nossa hipótese, comparar os vinhos testados relativamente também a este parâmetro. Deste modo verificamos que o índice de diálise (tabela 1) do VB é cerca de 4 vezes inferior, comparativamente ao do VT analisado, o que reforça a hipótese acima referida.

Ainda da análise dos resultados obtidos com os vinhos sujeitos a diálise, poderemos compreender os efeitos verificados pelos flavonóis testados. Os flavonóis são um grupo de compostos de baixo peso molecular<sup>13</sup>, o que poderá sugerir que estes estejam presentes nos produtos de diálise, e por isso, nos vinhos dialisados, contribuam em grande parte para o efeito inibitório destes sobre a captação intestinal do catião  $MPP^+-[^3H]$ .

O CV e o CP (figuras 4A e 4B) aumentaram a captação de  $MPP^+-[^3H]$ . Estas bebidas são também ricas em flavonóides embora difiram entre si. O vinho possui compostos com peso molecular mais elevado, no entanto, o chá é especialmente rico em compostos de baixo peso molecular<sup>37</sup>.

O CV é principalmente rico em flavanóis ou catequinas (30% do peso seco do chá verde). O processo de fabrico do chá preto tem como consequência a oxidação de uma parte das catequinas (9% do peso seco do CP) que originam teaflavinas e tearrubiginas<sup>34,36,49</sup>.

Esta diferença de composição poderá explicar o menor efeito do CP sobre a captação intestinal de  $MPP^+-[^3H]$ . Para além disso, verificou-se que, pelo menos em parte, o aumento da captação deste catião orgânico pode ser explicado pela EGCG (figura 11C), o principal componente do CV que representa cerca de 50% das catequinas deste chá<sup>14</sup>.

A EGCG aumenta, na concentração de 100  $\mu M$ , a captação do catião orgânico em estudo, embora em muito menor extensão que o efeito verificado com o CV (figura 8). O chá tem cerca de 2 mM de EGCG<sup>11</sup> e o composto foi testado na concentração de 100  $\mu M$ , por ser impossível dissolvê-lo *in vitro* numa concentração superior. É provável que aumentando a sua concentração se consiga explicar com segurança o efeito do CV e do CP sobre a captação de  $MPP^+-[^3H]$ . Muitos estudos sobre o efeito das catequinas do chá, em que se utilizam catequina, epicatequina, epicatequina galato, epigalocatequina e EGCG, apontam esta última como a mais potente das catequinas<sup>14,49,50</sup>. Esta catequina constitui cerca de 9% do peso seco do CV e 2% do peso seco do CP<sup>51</sup>.

As xantinas cafeína e teofilina (figuras 11A e 11G) que constituem cerca de 3% do peso seco do chá<sup>34</sup>, reduziram significativamente o transporte de  $MPP^+$  (figura 5). No entanto, sabe-se que o CV e o CP têm diferentes quantidades de cafeína (11 a 20 mg/g de peso seco e 22 a 28 mg/g de peso seco, respectivamente<sup>52</sup>). Comparando estes efeitos com os obtidos com a EGCG, e tendo em conta a diferente abundância destes mesmos grupos de compostos nos dois tipos de chá, poderemos especular sobre a explicação dos resultados obtidos com o CV com base no efeito verificado com a EGCG e dos obtidos com o CP com base nas xantinas.

A diálise dos chás anulou o efeito verificado com ambos sobre a captação de  $MPP^+-[^3H]$  em células Caco-2. Tem sido atribuída grande importância ao resíduo de galato para os efeitos bioquímicos das catequinas, provavelmente porque este confere maior lipossolubilidade a este grupo de compostos<sup>14</sup>. É possível que pela permanência durante 3 horas a pH ácido (<3,5) e/ou pelo contacto com enzimas como a amílase, tenha ocorrido a hidrólise da ligação éster deste resíduo à EGCG, o que poderá explicar a perda de efeito. Como já foi referido, a miricetina (25  $\mu M$  e 50  $\mu M$ ), a quercetina (50  $\mu M$ ) e a catequina (100  $\mu M$  e 1 mM), flavonóides comuns ao chá e ao vinho<sup>10,34</sup>, não serão os responsáveis pelos efeitos observados com o vinho tinto e com o chá, já que diminuem a captação de  $MPP^+-[^3H]$ .

Finalmente também não se pode excluir a possibilidade de tanto, no vinho como no chá, os compostos possam actuar sinergicamente, como já referido por exemplo por Paquay et al (2000)<sup>49</sup>, ou concorrerem para o mesmo efeito, não podendo os resultados observados serem explicados por nenhum deles isoladamente. É o que provavelmente acontece com o etanol no vinho.

Será importante no futuro esclarecer a(s) causa(s) das alterações na captação de  $MPP^+-[^3H]$  pelas células Caco-2. O mecanismo responsável por este efeito poderá ter actuado ao nível do aumento da absorção ou da diminuição da extrusão deste catião.

Recentemente, foi obtida evidência do envolvimento da fosfatase alcalina na modulação do transporte de catiões orgânicos em hepatócitos de Rato<sup>53</sup>, assim como em células renais de embrião humano (células Hek293)<sup>54</sup>, de carcinoma de cólon humano (células Caco-2)<sup>55</sup> e em células endoteliais de capilares cerebrais de Rato<sup>56</sup>. Por outro lado, têm sido descritos na literatura efeitos moduladores de

muitos destes compostos fenólicos sobre a actividade desta enzima<sup>57,58</sup>, enzima também presente na membrana apical destas células Caco-2<sup>55</sup>. Assim, de acordo com estes dados não será de excluir a hipótese de muitos destes efeitos serem mediados por uma modulação da actividade da fosfatase alcalina.

É sabido que muitos destes catiões orgânicos são substrato da glicoproteína-P<sup>26,53</sup>, uma proteína transmembranar formadora de poro existente na superfície apical das células que a expressam e que, de forma dependente do ATP faz a extrusão celular de fármacos<sup>59</sup>. Jodoin et al (2002)<sup>50</sup> observou que a EGCG é substrato para a glicoproteína-P inibindo o transporte de fármacos para o exterior da célula. Estes resultados poderiam explicar a maior acumulação de MPP<sup>+</sup>-[<sup>3</sup>H] no interior das células estudadas. No entanto, a explicação dos resultados obtidos neste trabalho com base na influência destas bebidas sobre a actividade da glicoproteína-P, já referida na literatura por Jodoin et al (2002)<sup>50</sup>, não defensável já que: (i) aos 5 minutos estuda-se apenas a entrada de MPP<sup>+</sup>-[<sup>3</sup>H] para as células<sup>25,40</sup> e (ii) Martel et al (2000)<sup>25</sup> verifica que o anticorpo para a glicoproteína-P não afecta este transporte.

Pela observação dos resultados obtidos pela determinação da viabilidade celular (figura 9), pudemos verificar que as diferentes bebidas estudadas não afectaram a integridade das células. Pelo contrário, as bebidas foram, com o aumento do tempo de incubação, provocando um aumento da viabilidade celular, o que sugere um efeito protector sobre as células Caco-2. Este aumento da viabilidade celular pode ter sido devido tanto à diminuição da apoptose como ao aumento da multiplicação celular. Pelo tempo de incubação máximo que se efectuou (80 minutos), a segunda hipótese parece pouco provável. O aumento da viabilidade celular por diminuição da apoptose é controverso, uma vez que já estão descritos

efeitos anti-neoplásicos de muitos dos componentes do vinho e do chá por aumento da apoptose<sup>11,38</sup>. No entanto, também está descrito que os mesmos compostos que promovem a apoptose nas células neoplásicas não têm esse mesmo efeito sobre as células normais<sup>11</sup>.

## 7. CONCLUSÃO

Com a realização deste estudo foi possível concluir que existem no vinho e no chá compostos capazes de modular a captação do catião orgânico  $MPP^+-[^3H]$  nas células Caco-2. Este facto apoia a hipótese de que o consumo destas bebidas poderá alterar a absorção intestinal de catiões orgânicos, podendo mesmo a alterar a eficácia terapêutica de muitos medicamentos. Por exemplo, uma vez que alguns alimentos possuem quantidades apreciáveis de aminas biogénicas como a histamina e a tiramina<sup>60</sup>, também catiões orgânicos, a ingestão concomitante destas bebidas com os referidos alimentos poderá potenciar os efeitos dessas aminas através da promoção da sua absorção.

Uma vez que, no chá e no vinho, o aumento da captação de  $MPP^+-[^3H]$  poderá ser explicado por diferentes componentes destas bebidas, os mecanismos celulares pelos quais elas actuam poderá também ser distinto. Assim, seriam necessários mais ensaios no sentido de clarificar esta questão.

No futuro, seria interessante verificar se a adição de etanol ao vinho tinto desalcoholizado produziria efeitos semelhantes aos provocados pelo vinho tinto sobre o aumento da captação de  $MPP^+-[^3H]$  e ainda testar o efeito sobre este transporte de diferentes componentes do vinho, na presença e na ausência de etanol. Por outro lado, a hipótese de que diferentes polifenóis das bebidas testadas possam interagir para produzir um dado efeito, não está, neste caso, posta de parte, já que nenhum dos polifenóis testados pode explicar por completo os resultados obtidos na presença destas bebidas.

Neste estudo não se testou o efeito dos constituintes dos vinhos com maior peso molecular mas seria importante efectuar este estudo posteriormente, para que verificar se estes compostos estariam realmente implicados no aumento da captação de  $MPP^+-[^3H]$  nas células Caco-2.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Guyton AC, Hall JE. (2000) Textbook of Medical physiology. 10<sup>th</sup> Ed. Philadelphia. WB Saunders Company.
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. (1999) Pharmacology. 4<sup>th</sup> Ed. Harcourt Publishers Limited.
3. Wagner D, Spahn-Langguth H, Hanafy A, Koggel A, Langguth P. (2001) Intestinal drug efflux: formulation and food effects. *Adv Drug Deliv Rev* 50;(suppl)S13-31.
4. Henning SJ (1985) Ontogeny of enzymes in the small intestine. *Ann Rev Physiol* 47: 231-245.
5. Zhang L, Brett CM, Giacomini KM. (1998) Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:431-60.
6. Lee VHL. (2000) Membrane transporters. *Eur J Pharm Sci* 11(suppl2):S41-50.
7. Iseki K, Sugawara M, Saitoh N, Miyazaki K. (1993) The transport mechanisms of organic cations and their zwitterionic derivatives across rat intestinal brush-border membrane. 1. Binding characteristics to the bio- and lipid- membranes. *Biochim Biophys Acta* 1146(1):121-6.

8. Rindi G, Laforenza V. (2000) Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *Proc Soc Exp Biol Med* 224:246-255.
9. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. (1997) Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 11:287-313.
10. van de Wiel A, van de Golde PHM, Hart HC. (2001) Blessings of the grape. *Eur J Int Med* 12:484-9.
11. Mukhtar H, Ahmad N. (2000) Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 71(suppl):1698S-1702S.
12. Trevisanato SI, Kim Y-I. (2000) Tea and health. *Nutrition Rev* 58(1):1-10.
13. Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 56(11):317-33.
14. Kuruto-Niwa R, Inoue S, Ogawa S, Maramatsu M, Nozawa R. (2000) Effects of tea catechins on the ERE-regulated estrogenic activity. *J Agric Food Chem* 48:6355-61.
15. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 52:673-751.

16. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, Van Leeuwen PAM. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418-25.
17. Offman EM, Freeman DJ, Dresser GK, Munoz C, Bend JR, Bailey DG. (2001) Red wine-cisapride interaction: comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Therap* 70(1):17-23.
18. Piver B, Berthou F, Dreano Y, Lucas D. (2001) Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components. *Toxicol Lett* 125(1-3):83-91.
19. Tsunoda SM, Harris RZ, Christians U, Velez RL, Freeman RB Beret LZ, Warshaw A. (2001) Red wine decreases cyclosporine bioavailability. *Clin Pharmacol Therap* 70(5):462-7.
20. Delie F, Rubas W. (1997) A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Ther Drug Carrier Sys* 14(3):221-86.
21. Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V. (1998) Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* 273:15971-79.

22. Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schömig E. (1998) Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal monoamine transporter. *Nature Neurosci* 1:349-51.
23. Sayre LM. (1989) Biochemical mechanism of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol Lett* 48:121-49.
24. Gründemann D, Liebich G, Kiefer N, Köster S, Schömig. (1999) Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol Pharmacol* 56 :1-10.
25. Martel F, Calhau C, Azevedo I. (2000) Characterization of the transport of the organic cation [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup> in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361:505-13.
26. Martel F, Keating E, Azevedo I. (2001a) Effect of P-glicoprotein modulators on the human extraneuronal monoamine transporter. *Eur J Pharmacol* 422 :31-7.
27. Bertrand A, Ribereau-Gayon P. (1970) Determination of volatile components of wine by gas-phase chromatography. *Ann Fals Expert Chim* 63:148-156.
28. Mateus N, de Freitas V. (2001) Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during Port Wine aging. *J Agric Food Chem* 49(11):52117-22.
29. Azenha M. (2000) Speciation and bioavailability of Pb and Cu in wines – Influence of Cu on the kinetics of fermentation by *Saccharomyces cerevesiae*.

Dissertação para Doutoramento em Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Portugal.

30. Bergmeyer HU, Bernt E. (1974) Lactate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods in enzymatic analysis*. New York. Academic Press: 574-579.
31. Bradford MM. (1976) A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
32. Cao Y, Cao R, Bråkenhielm E. (2002) Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J Nutr Biochem* 13:380-90.
33. Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Santos ACV, Wood EG, Carrier MJ. (2001) Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 414:863-4.
34. Yang CS, Maliakal P, Meng X. (2002) Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol.* 42:25-54.
35. Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. (1997) Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 65:1489-94.
36. Arts ICW, Hollman PCH, Freskens EHM, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D. (2001) Catechin might explain the inverse relation between tea consumption

and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 74:227-32.

37. Iijima K, Yoshizumi M, Ouchi Y. (2002) Effect of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell function – molecular mechanism of the “French paradox”. *Mech Ageing Dev* 123:1033-9.
38. Soleas GJ, Grass L, Josephy PD, Goldberg DM, Diamandis EP. (2002) A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin Biochem* 35:119-24.
39. Sun AY, Simonyi A, Sun GY. (2002) The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Rad Biol Med* 32(4):314-18.
40. Martel F, Gründermann D, Calhau C, Schöming E, Azevedo I. (2001b) Apical uptake of organic cations by human intestinal Caco-2 cells: putative involvement of ASF transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363:40-9.
41. Silverman B, Rivlin RS. (1982) Ethanol-provoked disturbances in the binding of zinc to rat jejunal mucosal proteins. *J Nutr* 112(4):744-9
42. Gastaldi G, Casirola D, Ferrari G, Rindi G. (1989) Effect of chronic ethanol administration on thiamine transport in microvillous vesicles of rat small intestine. *Alcohol Alcoholism* 24:83-89.

43. Polache A, Martin-Algarra RV, Guerri C. (1996) Effects of chronic alcohol consumption on enzyme activities and active methionine absorption in the small intestine of pregnant rats. *Alcohol Clin Exp Res* 20(7):1237-42.
44. Martin-Algarra RV, Polache A, Fernandez-Villalba E, Pla Delfina JM, Guerri C. (1998) Influence of chronic alcohol intake on intestinal taurine and antipyrine transport in pregnant rats. *Alcohol Clin Exp Res* 22(2):463-7.
45. Coudray C, Tressol JC, Feillet-Coudray C, Bellanger J, Pépin D, Mazur A. (2000) Long term consumption of red wine does not modify absorption or status of zinc and copper in rats. *J Nutr* 130:1309-13.
46. Villanueva JA, Devlin AM, Halsted CH. (2001) Reduced folate carrier: tissue distribution and effects of chronic ethanol intake in the micropig. *Alcohol Clin Exp Res* 25(3):415-20.
47. Sato M, Suzuki Y, Okuda T, Yokotsuka K. (1997) Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* 61(11):1800-5.
48. Bråkenhielm E, Cao R, Cao Y. (2001) Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *FASEB J* 15: 1798-800.

49. Paquay JBG, Haenen GRMM, Stender G, Wiseman SA, Tijburg LBM, Bast A. (2000) Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J Agric Food Chem* 48:5768-72.
50. Jodoin J, Demeule M, Béliveau R. (2002) Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochim Biophys Acta* 1542:149-59.
51. van het Hof KH, de Boer HSM, Wiseman AS, Lien N, Weststrate JA, Tijburg LBM. (1997) Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 66 :1125-32.
52. Khokhar S, Magnusdottir SG. (2002) Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J Agric Food Chem* 30;50(3):565-70.
53. Martel F, Martins MJ, Hipólito-Reis C, Azevedo I. (1996) Inward transport of [<sup>3</sup>H]-1-methyl-4-phenylpyridinium in rat isolated hepatocytes: putative involvement of a P-glycoprotein transporter. *Br J Pharmacol* 119:1519-24.
54. Martel F, Keating E, Calhau C, Gründemann D, Schömig E, Azevedo I. (2001c) Regulation of human extraneuronal monoamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364:487-95.

55. Calhau C, Martel F, Hipólito-Reis C, Azevedo I. Modulation of uptake of organic cationic drugs in cultured human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by an ecto-alkaline phosphatase activity (submetido).
56. Calhau C, Martel F, Soares-da-Silva P, Hipólito-Reis C, Azevedo I. (2002) Regulation of  $^3\text{H-MPP}^+$  transport by phosphorylation/dephosphorylation pathways in RBE4 cells: role of ecto-alkaline phosphatase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365(5):349-56.
57. Yamaguchi M, Gao YH. (1998) Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: the genistein effect is enhanced by zinc. *Mol Cell Biochem* 178:377-82.
58. Calhau C, Martel F, Hipólito-Reis C, Azevedo I. (2000) Effect of P-glycoprotein modulators on alkaline phosphatase activity in cultured rat hepatocytes. *Cell Physiol Biochem* 10:177-86.
59. Bellamy WT. (1996) P-glicoproteins and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:161-83.
60. Pinho O, Fernandes JO, Ferreira IMPLVO, Gomes AMP, Ferreira MA. (2000) Aminas biogénicas e os alimentos. *Alimentação Humana* 6:29-41.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, por POCTI, FEDER (32550/99) e pela Lasvin.

Gostaríamos de agradecer à Doutora Paula Guedes de Pinho e ao Doutor J. Oliveira da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto pela extração do etanol na preparação dos vinhos desalcooolizados e pelas determinações dos índices de compostos polifenólicos e de diálise dos vinhos.