



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Cristiane Manfé Pagliosa

Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na absorção do ferro em portadores de hemocromatose hereditária relacionada ao gene *HFE*: ensaio clínico, randomizado, controlado e cruzado

Florianópolis
2021

Cristiane Manf  Pagliosa

Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na absor o do ferro em portadores de hemocromatose hereditária relacionada ao gene *HFE*: ensaio clínico, randomizado, controlado e cruzado

Tese submetida ao Programa de Pós-Gradua o em Nutri o da Universidade Federal de Santa Catarina para a obten o do título de Doutora em Nutri o.

Orientadora: Francilene Gracieli Kunradi Vieira, Dra.
Coorientador: Prof. Edson Luiz da Silva, Dr.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pagliosa, Cristiane Manfé

Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)
na absorção do ferro em portadores de hemocromatose
hereditária relacionada ao gene HFE: ensaio clínico,
randomizado, controlado e cruzado / Cristiane Manfé
Pagliosa ; orientador, Francilene Gracieli Kunradi
Vieira, coorientador, Edson Luiz da Silva, 2021.
183 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. Hemocromatose Hereditária. 3. Infusão
de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). 4.
Atividade quelante de ferro. 5. Absorção. I. Kunradi
Vieira, Francilene Gracieli . II. da Silva, Edson Luiz .
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Nutrição. IV. Título.

Cristiane Manfé Pagliosa

Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na absorção do ferro em portadores de hemocromatose hereditária relacionada ao gene *HFE*: ensaio clínico, randomizado, controlado e cruzado

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Ana Lúcia Bertarello Zeni, Dra.
Fundação Universidade Regional de Blumenau

Médica Andrea Thives de Carvalho Hoepers, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Elisabeth Wazlawik, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Nutrição.

Ana Carolina Fernandes, Dra.
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Nutrição

Francilene Gracieli Kunradi Vieira, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado a todos os que apresentam hemocromatose hereditária e àqueles, que nunca perdem a esperança e com amor se doam para o bem do próximo, para um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ser a fonte de toda a fé, esperança e amor. Fortaleza e guia nessa caminhada;

Ao meu amado esposo, Mauro, pela vida e sonhos compartilhados e por tudo ser mais leve e feliz ao seu lado. À nossa amada filha Amanda, graça de Deus e raio de luz;

A todos os meus familiares, em especial aos meus pais, Ivo e Eremita e ao meu irmão, Marcos, sua esposa Karine e o sobrinho Lauro, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos;

Aos meus avós, *in memoriam*, Honorato Manfé e Umbelina Giasson Manfé e Agostinho Kremer e Vitorina Mannes Kremer, por serem testemunho de fé, caráter e humildade e pelo legado de amor e dedicação à família e ao bem comum.

Aos voluntários para o ensaio clínico, muito obrigada pela confiança e comprometimento. Essa tese só foi alcançada, porque vocês aceitaram fazer parte dela.

Aos Professores orientadores, Prof^a Francilene G. K. Vieira e em especial ao Prof. Edson Luiz da Silva, com quem primeiramente compartilhei a proposta para essa tese e o sonho de trabalhar com esse tema. Muito obrigada por ter aceito e acreditado.

Aos membros das bancas examinadoras do exame de qualificação e da defesa final da tese, Hematologista Andrea Thives de Carvalho Hoepers, Prof^a Ana Lúcia Bertarello Zeni, Prof^a Yara Maria Franco Moreno, Prof^a Edna Regina Amante, Prof. David Cavalcanti Ferreira, Prof^a Manoela Alano Vieira e Prof^a Elisabeth Wazlawik;

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, muito obrigada pela oportunidade de aprendizado;

Às colegas de turma Alice Freitas da Silva, Angela Teodósio da Silva, Cinthia Rejane Corrêa, Gabriela Cristofoli Barni, Julia Carvalho Ventura e Simone de Castro Giacomelli, pelos momentos compartilhados e pelas trocas de experiência e aprendizado e em especial à Ana Paula Prudêncio, pela amizade, pelos momentos de estudo e também de atividades no Laboratório de Lipídios, Antioxidantes e Aterosclerose;

A todos os demais colegas do Laboratório de Lipídios, Antioxidantes e Aterosclerose, pela oportunidade de aprendizado e convívio. Em especial, à Tais Thomsen Silveira e à Roberta Caetano pela amizade formada, parceria e incentivo. E também à Cleonice Gonçalves da Rosa, Heloisa Pamplona Cunha, Blerina Shkempi, Jéssica Ramos Krieguer, Marcela Freitas Medeiros e Hanna Pillmann Ramos, pela prestatividade e apoio;

À Fernanda Cristina de Souza, por toda a prestatividade no Laboratório de Técnica Dietética;

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC), pela disponibilidade e apoio prestados e

pelo aprendizado;

Aos profissionais do Ambulatório do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Santa Catarina (HEMOSC) e do Centro de Hemoterapia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC) e em especial aos hematologistas Bruno Vieira Dias e Vivian Karla Brognoli Franco, pela confiança, parceria e incentivo;

Aos amigos, Denise Nogueira Heidrich e Roberto M. Heidrich pelo apoio em tantos momentos e pelo testemunho de vida e profissional; às amigas Rossana Podestá e Nilda Martins, sempre por perto e otimistas;

Àqueles que nesse período deixaram saudades e de alguma forma fizeram parte dessa caminhada, ao amigo Roberto Garayo, à minha prima-irmã Karla Gomig Regalin, às primas Rejane Maria Fabiane Basso e Cecília Kremer Malfatti e à colega Maria Ignêz Marchioro Zaions;

À Prof^a Eleonora D'Orsi, pelo incentivo inicial, que foi decisivo para que eu chegasse até aqui e ao Prof. Luciano de Souza Ribeiro Bueno, pelo auxílio nas dúvidas em química orgânica;

Aos Secretários do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Vinicius Ferreira e Michelly Pizzinatto, pela prestatividade e o apoio para as questões burocráticas;

Ao Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC), por toda a atenção e auxílio técnico;

À empresa Matebrás, por ter doado as amostras de erva-mate;

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição pelas aulas ministradas e por toda a oportunidade de aprendizado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

"...Paciência, essa é a virtude que nos faz enfrentar a cada adversidade sem desistir..."
(São Padre Pio de Pietrelcina em Carta para Rafaelina Cerase, 16 de junho de 1914)

RESUMO

Alternativas adjuvantes para diminuir a absorção do ferro podem contribuir para o tratamento da hemocromatose hereditária (HH) e conseqüentemente, auxiliar para reduzir o risco a outras comorbidades. O presente estudo investigou o efeito da infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na absorção do ferro não heme em pacientes com HH para o genótipo *HFE*. Foram também avaliados o impacto do tempo de infusão e do volume de água na obtenção de uma infusão de folhas de erva-mate com alto conteúdo fenólico e de atividade quelante de ferro e a estabilidade dessas propriedades, no tempo de armazenamento e temperatura (imediatamente e após 24 h a 8 e 25 °C). Um estudo randomizado, controlado e cruzado de três braços foi conduzido em pacientes com HH *HFE*, com idade entre 29-69 anos e em terapia de manutenção. Os quatorze pacientes com HH *HFE* ingeriram uma refeição padronizada contendo 11,4 mg de ferro e 200 mL de cada bebida: água (controle), infusão de folhas de erva-mate ou suspensão de *Silybum marianum* (diluída em 200 mL de água). As bebidas foram oferecidas aleatoriamente e separadas por um período de 7 dias de *washout*. As amostras de sangue foram coletadas em jejum e após 1, 2, 3 e 4 horas do consumo da refeição, para a medida do ferro sérico. No estudo *in vitro*, a maior concentração de fenóis totais (18,1 mg/mL) e de atividade quelante de ferro (~ 100 %), foram observados para o tempo de infusão de 10 min., utilizando 30 g folhas/300 mL água. O armazenamento a 8 ou 25 °C por 24 h diminuiu a concentração de fenólicos totais e dos ácidos di-cafeoilquínicos em 23,5% e 25,5%, respectivamente ($p < 0,05$), sem afetar a atividade quelante de ferro, devido a uma saturação do efeito quelante com uma concentração fenólica de 3,34 mg/mL. No ensaio clínico, quando os participantes ingeriram a refeição com a infusão de folhas de erva-mate, ocorreu uma significativa redução da absorção de ferro, de acordo com todos os parâmetros derivados das curvas de ferro sérico, área sob a curva (AUC_{0-4h}) $173,3 \pm 44,7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, pico máximo de absorção do ferro (Δ_{max}) $1,3 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$ e recuperação do ferro no pico máximo ($\%Fe_{max}$) $2,4 \pm 0,5\%$ em comparação às demais bebidas, no caso, a água (AUC_{0-4h} de $1449,4 \pm 241,5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, Δ_{max} de $9,1 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$ e $\%Fe_{max}$ de $16,2 \pm 2,6\%$) e a suspensão de *Silybum marianum* (AUC_{0-4h} de $2195,2 \pm 399,9 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, Δ_{max} de $12,5 \pm 2,2 \mu\text{mol/L}$ e $\%Fe_{max}$ de $21,7 \pm 3,6\%$); $p < 0,001$ para todos os parâmetros derivados das curvas de ferro sérico (média \pm erro padrão da média). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a água e a suspensão de *Silybum marianum*; $p > 0,05$. O estudo *in vitro* mostrou que o tempo e o volume de água, normalmente utilizados no preparo de infusões, afeta a extração de compostos fenólicos e da atividade quelante de ferro. A atividade quelante apresentou um efeito saturante a uma baixa quantidade de fenóis totais e, conseqüentemente, a infusão foi altamente estável sob refrigeração e a temperatura ambiente para a ação quelante. O ensaio clínico mostrou um significativo efeito inibitório da infusão de folhas de erva-mate (100 mg/mL) sobre a absorção do ferro, com uma redução de 88% da AUC, comparado ao controle (água). Tanto os resultados *in vitro* quanto *in vivo* mostraram uma infusão com importante potencial como quelante natural de ferro. A ingestão da infusão de folhas de erva-mate inibiu significativamente a absorção do ferro em pacientes com HH *HFE* e, portanto, deve ser considerada como um possível adjuvante para o controle da sobrecarga de ferro no organismo.

Palavras-chave: Infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Atividade que-

lante de ferro. Hemocromatose hereditária. Absorção. Ensaio clínico controlado e randomizado.

ABSTRACT

Adjuvant alternatives to inhibit iron absorption can contribute to the treatment of hereditary hemochromatosis (HH), and consequently help to reduce the risk of other comorbidities. This study proposed to investigate the effect of *Ilex paraguariensis* leaf infusion on the absorption of non-heme iron in HH patients with the *HFE* genotype. The impact of infusion time and the water volume to obtain an *Ilex paraguariensis* leaf infusion with high phenolic content and iron chelating activity, such as the stability of these properties in the storage time and temperature (immediately and after 24 h at 8 and 25 °C) were also assessed. A three-way randomized, controlled, and crossover trial was conducted on patients, aged 29-69 years, undergoing maintenance therapy. Fourteen HFE-HH patients ingested a meal containing 11.4 mg iron and 200 mL of each beverage: water (control), *Ilex paraguariensis* leaf infusion, or *Silybum marianum* suspension (diluted in 200 mL of water). The beverages were offered in random order, at intervals separated by a *washout* period of 7 days. Blood samples were drawn shortly before and 1, 2, 3, and 4 h after the meal for serum iron measurement. For the *in vitro* study, the highest phenolic content (18.1 mg/mL) and iron chelating activity (~ 100%) were observed for 10 min. infusion time using 30 g leaves/300 mL water. Storage at 8 or 25 °C for 24 h decreased total phenolics and di-caffeoylquinic acids by 23.5% and 25.5%, respectively ($p < 0.05$), without affecting the iron-chelating activity due to a saturating chelating effect at 3.34 mg/mL phenolic content. About the results in the clinical trial, when the participants ingested the meal with the *Ilex paraguariensis* leaf infusion there was a highly significant reduction in their iron absorption, according to all the parameters derived from the serum iron curves, area under the curve (AUC_{0-4h}) $173.3 \pm 44.7 \text{ }^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, the maximum increase in serum iron concentration (Δ_{max}) $1.3 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{mol/L}$, and iron recovery at peak max. ($\%Fe_{max}$) $2.4 \pm 0.5\%$ compared to both water (AUC_{0-4h} of $1449.4 \pm 241.5 \text{ }^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, Δ_{max} of $9.1 \pm 1.4 \text{ } \mu\text{mol/L}$, and iron recovery at peak max. of $16.2 \pm 2.6\%$) and *Silybum marianum* suspension (AUC_{0-4h} of $2195.2 \pm 399.9 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, Δ_{max} of $12.5 \pm 2.2 \text{ } \mu\text{mol/L}$, and $\%Fe_{max}$ of $21.7 \pm 3.6\%$); $p < 0.001$ for all the parameters derived from the serum iron curves (mean \pm SEM). No significant difference was found between water and *Silybum marianum* suspension; $p > 0,05$. The *in vitro* results showed that the commonly used infusion time and water volume affected the extraction of phenolic compounds and the iron-chelating activity of the *Ilex paraguariensis* leaf infusion, which has a saturating effect at low total phenol content. Consequently, the *Ilex paraguariensis* infusion was highly stable under refrigeration and at room temperature for the iron-chelating activity. The clinical trial showed, a significant inhibitory effect of *Ilex paraguariensis* leaf infusion on the iron absorption in patients with *HFE*-HH after ingestion of a single meal, with 88% reduction of the AUC compared to control (water). Both, the *in vitro* and *in vivo* results showed an *Ilex paraguariensis* leaf infusion with important potential as natural iron-chelating. Intake of *Ilex paraguariensis* leaf infusion significantly inhibited the absorption of the iron in patients with *HFE*-HH and, therefore, should be considered as a possible adjuvant for iron overload control.

Keywords: *Ilex paraguariensis* leaf infusion (erva-mate). Iron chelating. Hereditary hemochromatosis. Absorption. Randomized controlled trial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais mecanismos envolvidos na homeostase do ferro.	27
Figura 2 – Mecanismos envolvidos na absorção do ferro alimentar no enterócito: (a) absorção de ferro pelo enterócito e transporte pela transferrina no plasma; (b) bloqueio da absorção de ferro no enterócito.	30
Figura 3 – A absorção do ferro alimentar em portadores de hemocromatose hereditária com mutação no gene <i>HFE</i>	33
Figura 4 – Representação esquemática da proteína de membrana composta por 348 aminoácidos, denominada HFE, codificada pelo gene <i>HFE</i> e identificação das três principais mutações.	34
Figura 5 – Diferentes estágios para o fenótipo de hemocromatose hereditária. .	36
Figura 6 – Distribuição do alelo C282Y em países da Europa e no Brasil. . . .	37
Figura 7 – Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.).	42
Figura 8 – Estrutura química dos principais ácidos fenólicos presentes na erva- mate.	46
Figura 9 – Representação esquemática do desenho do estudo clínico, randomi- zado, controlado e cruzado.	54
Figura 10 – Fluxo de participantes durante o estudo.	56
Figura 11 – Efeito do volume de água para a extração de compostos fenólicos em infusão com folhas de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.).	63
Figura 12 – Concentração de fenóis totais (mg EAC/mL) e a atividade quelante contra o ferro (%) de infusões com folhas de erva-mate (<i>Ilex para- guariensis</i> A. St. Hil.).	65
Figura 13 – Concentração dos ácidos mono-cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA e 5- CQA) e ácidos di-cafeoilquínicos (3,5-diCQA e 4,5-diCQA) da infusão de folhas de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) no tempo zero e após 24h a 8 °C e 25 °C	66
Figura 14 – Curvas de ferro sérico após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme por adultos saudáveis.	68
Figura 15 – Curvas de ferro sérico após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme por portadores de HH <i>HFE</i>	72
Figura 16 – Estrutura de dois ácidos cafeoilquínicos encontrados na infusão de folhas de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) e o sítio de liga- ção para o ferro, proposto pela literatura (KONO <i>et al.</i> , 1998; AND- JELKOVIC <i>et al.</i> , 2006; LI <i>et al.</i> , 2018).	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas envolvidas na absorção intestinal de ferro, função e expressão nos enterócitos e efeito para manter a homeostase do ferro em situações de depleção.	29
Tabela 2 – Estudos com plantas, que apresentaram efeito quelante sobre a absorção do ferro, no organismo de portadores de hemocromatose hereditária.	41
Tabela 3 – Efeito do tempo de infusão na extração de sólidos solúveis, de fenóis totais e na atividade quelante contra o ferro de folhas de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.).	62
Tabela 4 – Estabilidade da concentração de fenóis totais e da atividade quelante contra o ferro em infusão com folhas de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.).	64
Tabela 5 – Parâmetros derivados das curvas de ferro sérico utilizados como indicadores da absorção do ferro alimentar em pessoas saudáveis (n = 3).	67
Tabela 6 – Características biodemográficas e parâmetros laboratoriais dos portadores de HH- <i>HFE</i> (n = 14).	70
Tabela 7 – Parâmetros derivados das curvas de ferro sérico e utilizados como indicadores da absorção do ferro alimentar em portadores de hemocromatose hereditária (n = 14).	72
Tabela 8 – Absorção do ferro, de acordo com a mutação no gene <i>HFE</i> e a concentração de ferritina sérica.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGs	Ácidos clorogênicos
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANOVA-MR	Análise de variância de medidas repetidas
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
C282Y	Mutação do gene <i>HFE</i> , que ocorre no nucleotídeo 845, codificando para a substituição da cisteína (Cis) por tirosina (Tir) no aminoácido da posição 282 (C282Y) da proteína HFE.
C282Y/C282Y	C282Y homozigoto
C282Y/H63D	Duplo heterozigoto C282Y/H63D
CONSORT	<i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i>
5CQA	Ácido 5-cafeoilquínico
⁵⁹ Fe	Isótopo radioativo de ferro
CTLF	Capacidade total de ligação do ferro
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DcytB	<i>Duodenal cytochrome b</i>
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
EAC	Equivalente de ácido clorogênico
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ⁺²	Íon ferroso

Fe ⁺³	Íon férrico
Fe-S	Ferro-enxofre
FeSO ₄	Sulfato ferroso
FPN	Ferroportina
FT	Fenóis totais
HAMP	<i>Hepcidin antimicrobial peptide</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCP1	<i>Haem carrier protein 1</i>
HEMOSC	Centro de hematologia e hemoterapia do estado de Santa Catarina
HFE	<i>High Fe (iron)</i>
Hg	Hemoglobina
HJV	Hemojuvelina
HH	Hemocromatose hereditária
HH- <i>HFE</i>	Hemocromatose hereditária com mutação no gene <i>HFE</i>
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
H63D	Mutação do gene <i>HFE</i> , que ocorre no nucleotídeo 187, codificando para a substituição da histidina (His) por ácido aspártico (Asp) no aminoácido da posição 63 (H63D) da proteína HFE.
H63D/-	H63D heterozigoto
Ht	Hematócrito
HU-UFSC	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
IMC	Índice de massa corporal
IST	Índice de saturação de transferrina
IRIDA	<i>Iron-refractory iron-deficiency anemia</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MT2	<i>Matriptase-2</i>
Na ₂ EDTA	Ácido diamino-tetra-acético sódico

Nu	Núcleo
O ₂	Oxigênio
·OH	Radical hidroxil
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PCR-uv	Proteína C-reativa ultra-sensível
4CQA	Ácido 4-cafeoilquínico
4,5CQA	Ácido 4,5-dicafeoilquínico
R	Randomização
r ²	Coeficiente de determinação
SCL40A1	<i>Solute Carrier Family 40 Member 1</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
S65C	Mutação do gene <i>HFE</i> , que ocorre no nucleotídeo 193, codificando para a substituição da serina (Ser) por cisteína (Cis) no aminoácido da posição 63 (H63D) da proteína HFE.
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de transferrina
3CQA	Ácido 3-cafeoilquínico
3,4CQA	Ácido 3,4-dicafeoilquínico
3,5CQA	Ácido 3,5-dicafeoilquínico
TFI	Total de ferro ingerido em μmol
VP	Volume de plasma em <i>L</i>
VS	Volume de sangue em <i>mL</i>
μg	Micrograma
μmol	Micromol

LISTA DE SÍMBOLOS

AUC_{0-4}	Área sob a curva de ferro sérico pelo período de 4 h
Δ_{max}	Pico máximo de absorção do ferro
$\%Fe_{max}$	Percentual de recuperação do ferro no pico máximo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA	20
1.2	ORIGINALIDADE, RELEVÂNCIA E CONTRIBUIÇÃO PARA O CO- NHECIMENTO	21
1.3	ESTRUTURA GERAL DA TESE	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1	HOMEOSTASE DO FERRO E A HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA	25
3.1.1	Ferro	25
3.1.2	Homeostase do ferro no organismo humano e a absorção do ferro alimentar	26
3.1.2.1	Hepcidina	27
3.1.2.2	Proteína HFE	28
3.1.2.3	Absorção do ferro alimentar	28
3.1.3	Hemocromatose hereditária	32
3.2	PLANTAS UTILIZADAS COMO QUELANTES NATURAIS EM CASOS DE EXCESSO DE FERRO NO ORGANISMO	40
3.3	A ERVA-MATE: CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO E CONSUMO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	42
3.3.1	Compostos fitoquímicos e propriedades biológicas da erva-mate	45
3.4	GRUPO DE RISCO PARA A HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA NO BRASIL	47
4	MÉTODOS	49
4.1	ETAPAS DO ESTUDO	49
4.1.1	Estudo <i>in vitro</i>	49
4.1.1.1	Infusão de folhas de erva-mate	49
4.1.1.2	Compostos fenólicos totais em infusão de folhas de erva-mate	50
4.1.1.3	Atividade quelante contra o ferro em infusão de folhas de erva-mate	50
4.1.1.4	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos da infusão de folhas erva-mate para o estudo clínico	50
4.1.1.5	Estabilidade da concentração de compostos fenólicos e do percentual de atividade quelante contra o ferro na infusão de folhas de erva-mate para o estudo clínico	51
4.1.2	Estudo clínico, randomizado, controlado e cruzado	51
4.1.2.1	Local e população em estudo	51

4.1.2.2	Cálculo do tamanho da amostra e processo de amostragem	52
4.1.2.3	Delineamento do estudo	52
4.2	PROCESSO DE COLETA DE DADOS	57
4.2.1	Refeição padronizada e infusão de folhas de erva-mate com concentração de ferro conhecida	57
4.2.2	Parâmetros bioquímicos séricos e hematológicos	58
4.2.2.1	Variáveis bioquímicas séricas e hematológicas	58
4.2.2.2	Efeito da infusão de folhas de erva-mate na absorção do ferro	59
4.3	PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA	60
4.4	TRATAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	60
5	RESULTADOS	62
5.1	ESTUDO <i>IN VITRO</i> COM A INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE E ESTUDO PRELIMINAR <i>IN VIVO</i>	62
5.1.1	Efeito do tempo de infusão na extração de fenóis totais, sólidos solúveis e na atividade quelante contra o ferro	62
5.1.2	Efeito do volume de água para a extração de compostos fenólicos em infusão com folhas de erva-mate	63
5.1.3	Estabilidade da concentração de fenóis totais e da atividade quelante contra o ferro na infusão de folhas de erva-mate	63
5.1.4	Concentração e estabilidade dos ácidos clorogênicos em infusão com folhas de erva-mate	64
5.1.5	Estudo preliminar <i>in vivo</i> do efeito da infusão de folhas de erva-mate na absorção do ferro	67
5.2	EFEITO DA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE, NA ABSORÇÃO DE FERRO EM PORTADORES DE HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA <i>HFE</i>	68
6	DISCUSSÃO	74
6.1	ATIVIDADE QUELANTE CONTRA O FERRO DA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE EM ESTUDO <i>IN VITRO</i> E EM ESTUDO PRELIMINAR <i>IN VIVO</i>	74
6.2	EFEITO DA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE NA ABSORÇÃO DE FERRO EM PACIENTES COM HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA	79
7	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO	109
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO	123

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO PARA A COLETA DE DADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES COM HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA <i>HFE</i> E OS CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DO ENSAIO CLÍNICO	139
APÊNDICE D – ORIENTAÇÕES AOS PARTICIPANTES	142
APÊNDICE E – TEMPOS DE RETENÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS, IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	144
APÊNDICE F – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DO PERFIL DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS DA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE	147
APÊNDICE G – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS IDENTIFICADOS NA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE	149
APÊNDICE H – CARACTERÍSTICAS BIODEMOGRÁFICAS E OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS BASAIS DOS PARTICIPANTES CONSIDERADOS SAUDÁVEIS	151
APÊNDICE I – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO BIODEMOGRÁFICA E CLÍNICA DOS PARTICIPANTES COM HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA <i>HFE</i>	153
APÊNDICE J – CURVAS DE FERRO SÉRICO, POR MUTAÇÃO NO GENE <i>HFE</i> E POR NÍVEIS DE FERRITINA SÉRICA	155
APÊNDICE K – PARÂMETROS DERIVADOS DAS CURVAS DE FERRO SÉRICO, POR MUTAÇÃO NO GENE <i>HFE</i> E POR NÍVEIS DE FERRITINA SÉRICA	158
APÊNDICE L – ESTUDO DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	161
APÊNDICE M – DADOS SOBRE COMORBIDADES	169
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM SERES HUMANOS	171
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	176
ANEXO C – REGISTRO DO ENSAIO CLÍNICO	180

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

Considerado o elemento-traço mais abundante no organismo, o ferro está envolvido em vários processos biológicos e tem a sua homeostase mantida, essencialmente, pelo controle da sua absorção no intestino e liberação das reservas corporais. Regulada conforme as necessidades do organismo, ou seja, a absorção aumenta apenas quando há deficiência de ferro (ANDERSON; FRAZER, 2017).

Entretanto, na hemocromatose hereditária (HH) existe o aumento da capacidade de absorção do ferro alimentar, independente dos elevados níveis de armazenamento no organismo. A HH é um problema genético autossômico recessivo, que gera cerca de três a quatro vezes o aumento da absorção do ferro (ALLEN, K. J. *et al.*, 2008; VILLANI *et al.*, 2010; TYAGI *et al.*, 2015).

Considerando que o ser humano não possui um mecanismo específico para regular a sua excreção, o excesso de ferro absorvido se torna tóxico. A sua deposição progressiva e o aumento na formação de radicais livres causam danos oxidativos e lesões em órgãos e tecidos (ARRUDA, 2013; TYAGI *et al.*, 2015).

Com a progressão da sobrecarga de ferro em portadores de HH, ao longo do tempo, há o comprometimento de órgãos e sistemas, com o aumento do risco para desenvolver diabetes, cardiomiopatias, cirrose, artrites, hipogonadismo e cânceres (WHITLOCK *et al.*, 2006; VILLANI *et al.*, 2010). Estudos epidemiológicos têm evidenciado associações entre essa sobrecarga e doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como doenças cardiovasculares e diabetes (ALLEN, K. J. *et al.*, 2008; BASULI *et al.*, 2014).

Assim, alternativas adjuvantes para diminuir a absorção do ferro podem contribuir para o tratamento da HH e conseqüentemente, auxiliar para reduzir o risco a outras comorbidades. A mais importante e efetiva terapia para portadores de HH, ocorre através de flebotomias (sangrias) (KOWDLEY *et al.*, 2019).

A ocorrência estimada para a HH alcança um caso a cada duzentas pessoas em populações com descendência caucasiana, apesar de a HH ser, ainda, subdiagnosticada (PEREIRA *et al.*, 2001; ADAMS *et al.*, 2009; VILLANI *et al.*, 2010; BRISSOT *et al.*, 2011).

Para Aguiar *et al.* (2014), torna-se crescente o número de publicações no mundo, demonstrando a importância do estudo da HH para o diagnóstico precoce (AGUIAR *et al.*, 2014) e segundo Tyagi *et al.* (2015) e Hezaveh e Shidfar (2019) existe a necessidade de novas alternativas terapêuticas para a mesma, considerada uma das doenças genéticas mais comuns em caucasianos e um problema de saúde pública. Segundo Adams (2015), tanto a Europa, destaque para a região norte, quanto a América do Norte, consideram-na a principal doença genética que atinge a população.

No Brasil, embora existam poucas pesquisas sobre doenças genéticas que abordam a HH, essas revelam que a frequência das mutações no país é similar às daquelas de países europeus (PEREIRA *et al.*, 2001; BUENO *et al.*, 2006; TERADA *et al.*, 2009; CRAXI *et al.*, 2011).

Com base nos resultados de alguns estudos, a maioria dos portadores de HH apresentam mutação no gene *HFE* C282Y homozigoto, seguido de mutações no gene *HFE* duplo heterozigoto C282Y/H63D e uma menor parcela para *HFE* C282Y heterozigoto, *HFE* H63D homozigoto ou *HFE* H63D heterozigoto e mutação no gene *HFE* S65C (BOMFORD, 2002; FRANCHINI, 2006; SANDHU *et al.*, 2018). A mutação C282Y homozigoto é a mais importante no que diz respeito à associação com manifestações clínicas (JACKOWSKI *et al.*, 2004; PORTO *et al.*, 2016) e um menor número de casos de HH não apresenta relação com o gene *HFE*, são as mutações nos genes *HJV*, *HAMP*, *SLC40A1* e *TFR2*. No presente estudo avaliou-se indivíduos com HH portadores de mutações no gene *HFE*.

Dentre os tratamentos alternativos e coadjuvantes para diminuir a absorção de ferro, em casos de sobrecarga, alguns estudos consideram a possibilidade do uso de plantas, infusões e/ou extratos vegetais com propriedades de quelar o ferro da alimentação, efeito atribuído à presença de determinados compostos fenólicos, que funcionam como agentes quelantes com especificidade para o ferro (KALTWASSER *et al.*, 1998; HUTCHINSON *et al.*, 2010; DOORN; GOSSELINK, 2012).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é consumida diariamente pela população de diversas regiões do Brasil, principalmente na região Sul. Essa é uma planta rica em compostos fenólicos, conhecida por seu efeito hipocolesterolêmico, antioxidante, hepatoprotetor e hipoglicemiante (GUGLIUCCI, 1996; GORZALCZANY *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2008; DE MORAIS *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado que a erva-mate possui elevada capacidade quelante de ferro em estudo *in vitro* (COLPO *et al.*, 2016).

A propriedade quelante da erva-mate, até o momento, não foi avaliada em portadores de sobrecarga de ferro, porém instiga a investigação de seu efeito para auxiliar no tratamento da HH. Além do mais, o hábito do consumo diário de erva-mate em muitas regiões do país, principalmente naquelas em que predominam descendentes caucasianos com risco aumentado para expressar mutações para a HH, poderia ajudar a prevenir as complicações da HH.

A hipótese da presente proposta é de que a erva-mate diminui a absorção de ferro em pacientes com HH portadores de mutações no gene *HFE*.

1.2 ORIGINALIDADE, RELEVÂNCIA E CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO

A ausência de estudos sobre o efeito quelante da erva-mate em pessoas com sobrecarga de ferro, evidencia a originalidade da proposta. Não foram encontradas, até o

momento publicações científicas, após busca em bases de dados (PubMed/MEDLINE, Scopus e SciELO-Br) e em registros de pesquisas de ensaios clínicos, que buscam o entendimento do impacto do consumo desta planta em quem apresenta sobrecarga deste mineral.

A relevância do estudo está em contribuir com perspectivas relacionadas ao tratamento adjuvante da HH. No Brasil, apesar das poucas pesquisas direcionadas à HH, a frequência do seu genótipo é semelhante a de países que a consideram um problema de saúde pública. O estudo também envolve uma planta regional de consumo expressivo. Vale mencionar que o excesso de ferro no organismo da população em geral tem se tornado um problema comum, necessitando de alternativas terapêuticas (MENDES, J. F. R., 2008; TAO; PELLETIER, 2009; ARANDA *et al.*, 2010; NEGHINA; ANGHEL, 2011; MARTINS, 2012; AGUIAR *et al.*, 2014; TYAGI *et al.*, 2015; HEZAVEH; SHIDFAR, 2019).

Sendo assim, a avaliação do potencial da erva-mate para quelar o ferro em portadores de HH *HFE* corresponde à principal contribuição científica do presente projeto.

O presente estudo poderá auxiliar no desenvolvimento científico/tecnológico na área da nutrição envolvendo a hematologia, podendo resultar em impacto positivo na qualidade de vida dos portadores de HH. Espera-se também contribuir para estudos com plantas regionais, como a erva-mate, com potencial para auxiliar no tratamento da HH; favorecer o aumento de pesquisas voltadas à HH no Brasil; verificar o potencial da erva-mate para quelar o ferro e ajudar a evitar a susceptibilidade aumentada dessa população para outras doenças (diabetes, cardiopatias, carcinoma) e assim, não aumentar os custos do país com o tratamento dessas comorbidades.

Além disto, espera-se ajudar a promover a conscientização entre profissionais da área da saúde de que essa doença genética é comum, que existem terapias adjuvantes que podem contribuir para evitar o avanço da sobrecarga de ferro e que a HH requer atenção em nível de saúde pública. A identificação de grupos com predisposição (antes mesmo de apresentarem sintomas), o diagnóstico precoce e a pronta instituição do tratamento são capazes de prevenir o aparecimento de complicações clínicas e, mesmo nos indivíduos com algum grau de disfunção orgânica, podem reverter ou impedir sua progressão, conforme preconizado pela *European Association for the Study of the Liver* (CRAXI *et al.*, 2011) e conforme Bardou-Jacquet *et al.* (2020).

1.3 ESTRUTURA GERAL DA TESE

O Capítulo I ressalta a importância do estudo sobre a influência da erva-mate na absorção do ferro em portadores de HH *HFE*, para verificar o seu efeito quelante contra o ferro e o seu potencial como alternativa para o tratamento adjuvante dos pacientes. Foram destacados a relevância e a originalidade do estudo, bem como a

sua contribuição para a Ciência, para profissionais da área da saúde e para portadores de HH e grupos de risco.

No Capítulo II estão os objetivos, geral e específicos do estudo.

O Capítulo III corresponde à revisão bibliográfica, envolvendo aspectos da homeostase e absorção do ferro no organismo humano, a HH e o envolvimento das mutações do gene *HFE*, além de plantas utilizadas como quelantes naturais em casos de HH, bem como as características e propriedades biológicas da erva-mate. Além disto, o Capítulo também descreve o grupo de risco para a HH *HFE* no Brasil.

No Capítulo IV, são apresentados os métodos envolvidos para a condução da pesquisa *in vitro* e *in vivo* e os procedimentos éticos, que foram adotados.

O Capítulo V mostra os resultados obtidos no estudo *in vitro* com a infusão de folhas de erva-mate e o estudo *in vivo* e os resultados para o efeito da infusão de folhas de erva-mate, na absorção do ferro em portadores de HH *HFE*.

No Capítulo VI, ocorre a discussão dos principais resultados encontrados, destacando a originalidade e a importância das evidências encontradas para o efeito da infusão de folhas de erva-mate na absorção do ferro em portadores de HH *HFE*.

O Capítulo VII destina-se às conclusões e considerações finais, envolvendo os desfechos observados em relação aos objetivos da tese, e indicações para futuras pesquisas.

Como APÊNDICES, são apresentados resultados complementares do estudo e dois artigos originais, que foram elaborados a partir dessa tese. Um primeiro artigo publicado no periódico *Brazilian Archives of Biology and Technology*, intitulado Elevated iron chelating activity of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. leaf infusion: *in vitro* and *in vivo* pilot studies (Apêndice A) e um segundo artigo publicado no periódico *Food & Function*, intitulado *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. leaf infusion decreases iron absorption in patients with hereditary hemochromatosis: A randomized, controlled, and crossover study (Apêndice B).

Nos ANEXOS, foram incluídos documentos relacionados ao registro do ensaio clínico e aos procedimentos éticos da pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência da ingestão aguda de infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na absorção do ferro em portadores de HH *HFE*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o teor de fenóis totais e a capacidade da infusão de folhas de erva-mate em quelar o ferro *in vitro* e a estabilidade da concentração dos seus compostos fenólicos e da sua atividade quelante contra o ferro.
- Verificar a associação entre a concentração de fenóis totais e a atividade quelante contra o ferro na erva-mate.
- Analisar a concentração dos ácidos clorogênicos, 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico na infusão de folhas de erva-mate.
- Avaliar o efeito do consumo agudo de infusão de folhas de erva-mate na inibição da absorção do ferro, em portadores de HH *HFE*, por meio da medida de ferro sérico antes e após a ingestão de preparação alimentar padronizada e enriquecida com sulfato ferroso.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HOMEOSTASE DO FERRO E A HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

3.1.1 Ferro

O ferro é considerado o elemento-traço mais abundante no organismo. Os elementos-traço são substâncias de baixo peso molecular, que agem como catalisadores no organismo humano, estando incorporados ou associados à enzimas, coenzimas, metaloproteínas e hormônios (WHO, 1996). O ferro é um componente essencial da hemoglobina (responsável pelo transporte de oxigênio), da mioglobina (armazenamento de ferro muscular), das desidrogenases do músculo esquelético, dos citocromos e proteínas com centros de ferro-enxofre (Fe-S), envolvidos na produção de adenosina trifosfato (ATP) e das metaloenzimas teciduais (FAIRBANKS, 2009). Além disso, o ferro está envolvido em vários processos biológicos como eritropoiese, respostas imunológicas, diferenciação celular, função cognitiva, regulação do crescimento e metabolismo energético (COFFEY; GANZ, 2017).

Nesses processos, a sua capacidade de converter-se rapidamente a diferentes valências, como do estado ferroso (Fe^{+2}) para o estado férrico (Fe^{+3}), o faz um excelente doador e receptor de elétrons, respectivamente. Entretanto, o ferro quando presente na forma livre, a sua capacidade em doar e aceitar elétrons tende a catalisar a formação de radicais livres de forma descontrolada, a partir de espécies reativas de oxigênio (ERO) via reação de Fenton. Reação em que o íon de ferro (Fe^{+2}) cataliza a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) (IMAM *et al.*, 2017). Os produtos intermediários gerados por essa reação, têm potencial para danificar membranas celulares, degradar o ácido desoxirribonucleico (DNA), oxidar lipoproteínas e afetar o sistema neurológico, sistema cardiovascular, articulações, entre outras partes do organismo e, inclusive, desenvolver moléculas cancerígenas (COFFEY; GANZ, 2017; IMAM *et al.*, 2017; AYDINOK, 2018; HEZAVEH; SHIDFAR, 2019).

Assim, lesões em órgãos e tecidos são causados pelo excesso de ferro, porque o mesmo se torna tóxico e pode servir de gatilho para mecanismos clássicos de morte celular, a apoptose, a necrose e a autofagia e também a uma outra forma oxidativa de morte celular, denominada ferroptose. Embora o mecanismo que leva à ferroptose seja pouco conhecido, corresponde a uma morte celular não programada a partir do aumento do "pool" intracelular de ferro e que apresenta características morfológicas e bioquímicas distintas dos mecanismos clássicos de morte celular, bem conhecidos pela ciência (DANIAL; KORSMEYER, 2004; GRIVICICH *et al.*, 2007; DIXON; STOCKWELL, 2014; IMAM *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; LEI *et al.*, 2019).

Para evitar possíveis efeitos negativos nos sistemas fisiológicos e também danos

oxidativos aos componentes celulares, o organismo humano desenvolveu processos para regular a quantidade de ferro absorvida de acordo com as suas necessidades. O controle na absorção de ferro contribui para a sua homeostase e conseqüentemente reduz a susceptibilidade à doenças (POWELL *et al.*, 2016; LEI *et al.*, 2019).

3.1.2 Homeostase do ferro no organismo humano e a absorção do ferro alimentar

A quantidade de ferro no organismo de um adulto é mantida em geral, entre 3 e 4 g. O ferro está dentro das células, principalmente ligado à hemoglobina (70%), ligado à mioglobina (4%), em enzimas contendo ferro (< 1%), ou armazenado como ferritina ou hemossiderina (25%) e apenas uma pequena fração do ferro total encontrado no plasma está ligado à transferrina (Tf) (0,1%) (BRICKS, 1994; GANZ, 2013).

A Tf é responsável pelo transporte de ferro no plasma e, apesar de estar em pequena quantidade, apresenta uma dinâmica capacidade de transporte, com uma taxa de rotação (*turnover rate*) de 20 a 25 mg/dia (ANDERSON; FRAZER, 2017).

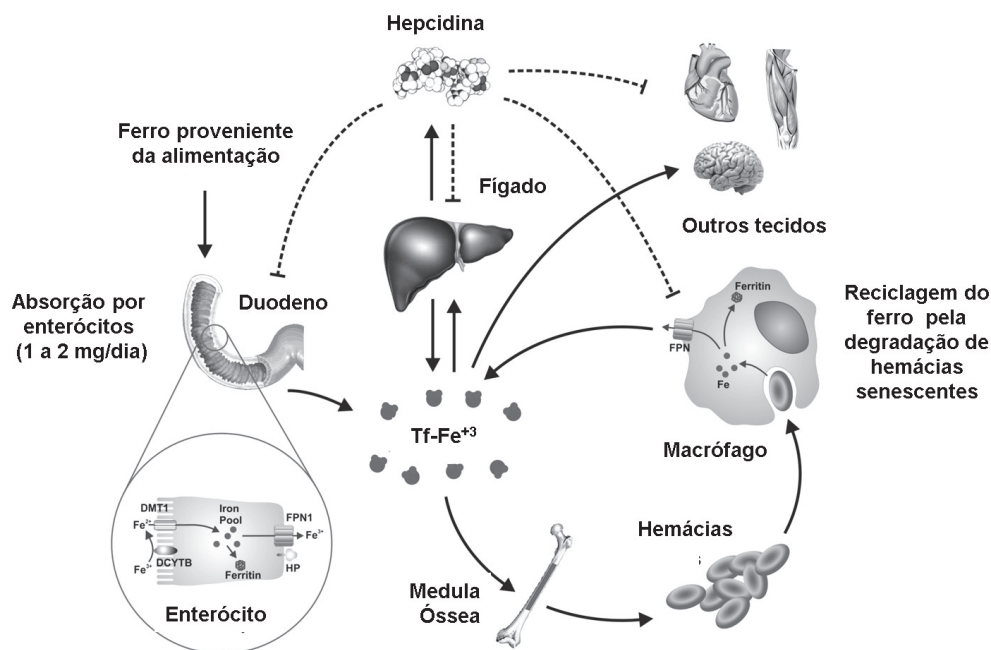
Os mecanismos que mantêm o ferro ligado à Tf (proteína de transporte) ou armazenado em órgãos e tecidos limitam a participação do ferro em reações oxidativas lesivas ao organismo. Uma vez, que os mecanismos de excreção de ferro são pouco eficientes, a sua homeostase é mantida essencialmente pelos mecanismos envolvidos com o controle da sua absorção no intestino delgado e liberação das reservas corporais (GROTTO, 2008; ANDERSON; FRAZER, 2017; RYBINSKA; CAIRO, 2017).

Os principais mecanismos, órgãos e células envolvidos na homeostase do ferro podem ser visualizados na Figura 1. Os enterócitos localizados no duodeno absorvem o ferro proveniente da alimentação, via proteína redutora citocromo b duodenal (DcytB) e em seguida, é transportado para dentro dos enterócitos através da proteína transportadora de metal divalente (DMT1). Os macrófagos do retículo endotelial esplênico, reciclam o ferro das hemácias senescentes, para ficar armazenado no próprio macrófago ou ser transportado para seus sítios de ação conforme a necessidade. As células, tanto macrófagos, quanto os enterócitos, liberam o ferro via ferroportina (FPN), que por sua vez, é transportado no plasma pela Tf até os seus locais de atuação e armazenamento (80% na medula óssea e o restante a demais órgãos e tecidos). A síntese e secreção da hepcidina pelos hepatócitos são influenciados pelos níveis de ferro no organismo (GROTTO, 2008; ANDERSON; FRAZER, 2017; RYBINSKA; CAIRO, 2017).

Segundo Cozzolino (2005), como uma quantidade insignificante de ferro é excretada pelo organismo, sua regulação depende, principalmente, da modificação da razão de absorção pelo trato gastrointestinal.

De acordo com a revisão de Coffey e Ganz (2017), em menos de duas décadas, a homeostase do ferro foi reconceitualizada como um complexo sistema endócrino e parácrino, mantido principalmente por mecanismos de controle da absorção do ferro

Figura 1 – Principais mecanismos envolvidos na homeostase do ferro.



Legenda: Tf , transferrina. Linha pontilhada, bloqueio da absorção no intestino e da liberação do ferro para o plasma. Linha não pontilhada, mecanismo de absorção, liberação para o plasma e armazenamento. Fonte: Adaptado de Anderson e Frazer (2017), pela autora (2021).

no intestino (duodeno e região inicial do jejuno). Assim, a homeostase do ferro é fundamental para a manutenção das funções celulares essenciais e simultaneamente, evita o acúmulo excessivo desse mineral.

Os mecanismos de controle da absorção do ferro têm o envolvimento de moléculas reguladoras como o hormônio hepcidina sintetizado no fígado e a proteína hemocromatose - HFE (*hemochromatosis protein* ou *high iron*) (GOSWAMI; ANDREWS, 2006; GROTO, 2008; ANDERSON; FRAZER, 2017).

3.1.2.1 Hepcidina

A hepcidina corresponde a um polipeptídeo, que inicialmente fora reconhecido apenas pelas suas propriedades antimicrobianas (KRAUSE *et al.*, 2000; PARK, C. H. *et al.*, 2001). Em 2001, estudos começaram a revelar a sua participação fundamental na regulação do ferro no organismo humano. A função hormonal da hepcidina foi descoberta em experimentos com camundongos deficientes de hepcidina, que desenvolveram sobrecarga de ferro no fígado, pâncreas, coração, glândula pituitária ou entre outros órgãos (NICOLAS *et al.*, 2001; PIGEON *et al.*, 2001). As descobertas do seu envolvimento no metabolismo do ferro, mudaram a compreensão da fisiologia das desordens no organismo relacionadas a esse mineral.

O hormônio hepcidina é considerado um regulador negativo do metabolismo do ferro, pois sua síntese aumenta em resposta aos níveis altos de ferro (sobrecarga) e parece reduzir em resposta contrária (hipóxia, anemia e deficiência de ferro). É produzido e liberado na corrente sanguínea, principalmente, pelos hepatócitos e em menor quantidade pelos monócitos e macrófagos (GROTTO, 2008; MAO *et al.*, 2019). A hepcidina tanto age na célula em que foi sintetizada (controle autócrino), como também é liberada na corrente sanguínea para agir em outras células (controle parácrino), regulando o fluxo de ferro (COFFEY; GANZ, 2017).

A expressão da hepcidina requer o envolvimento de proteínas de membrana plasmática encontradas nos hepatócitos, a hemojuvelina (HJV), a proteína da hemocromatose (HFE) e o receptor de transferrina 2 (TfR2), enquanto para a sua supressão há o envolvimento da protease *Matriptase-2* (MT2).

Devido a sua função reguladora para a homeostase do ferro, mutações nos genes das proteínas envolvidas na expressão da hepcidina (HJV, HFE e TfR2) levam à sobrecarga de ferro no organismo, enquanto a mutação no gene da proteína supressora da expressão da hepcidina, leva à anemia ferropênica refractária (*iron-refractory iron-deficiency anemia* (IRIDA)) (MAO *et al.*, 2019).

3.1.2.2 Proteína HFE

Enquanto a hepcidina não é expressa nos enterócitos (SANTOS, 2010), a proteína HFE e os receptores TfR possuem expressão nos enterócitos e nos hepatócitos.

A proteína HFE foi descoberta ao perceber a sua associação com os receptores TfR (FEDER *et al.*, 1996; LEBRON *et al.*, 1999).

O transporte de ferro pela Tf depende de receptores localizados na membrana das células, que podem ser do tipo 1 (TfR1), presente em todos os tecidos ou do tipo 2 (TfR2), encontrado, principalmente, no fígado. Quando a proteína HFE está ligada ao TfR1, deixa de ocorrer a afinidade do receptor com a Tf. Assim, na membrana basolateral dos enterócitos, a interação entre a proteína HFE e o TfR1, promove a redução da concentração de ferro no enterócito, o que demanda o aumento da absorção do ferro proveniente da dieta.

Nos hepatócitos a interação da proteína HFE com o TfR2, contribui para a síntese de hepcidina, apesar de estudo *in vivo*, sugerir que TfR2 e HFE também poderiam aumentar a expressão de hepcidina por vias diferenciadas (COFFEY; GANZ, 2017). Deste modo, como já descrito, a regulação da expressão da hepcidina tem sido atribuída à proteínas de membrana, como a proteína HFE (MAO *et al.*, 2019).

3.1.2.3 Absorção do ferro alimentar

Em geral, adultos saudáveis absorvem diariamente de 1 a 2 mg de ferro proveniente da alimentação, para compensar pequenas perdas causadas pela descamação

de células entéricas e epiteliais, transpiração, sangue menstrual, dentre outras formas de perda sanguínea (ANDERSON; FRAZER, 2017). Em paralelo, uma quantidade de 20 a 30 *mg/dia* de ferro do organismo é continuamente reciclada, proveniente do catabolismo de hemácias senescentes

A Tabela 1, apresenta, resumidamente, as proteínas envolvidas na absorção intestinal de ferro e as suas funções e expressões nos enterócitos. A Figura 2a e a Figura 2b ilustram os mecanismos envolvidos na absorção do ferro, podendo ser visualizados o enterócito e a localização das proteínas envolvidas na absorção do ferro: Dcytb, DMT-1, HFE, TfR, hemoxigenase, ferroportina (FPN), hefaestina e a proteína transportadora do heme-1 (*haem carrier protein 1* (HCP-1)).

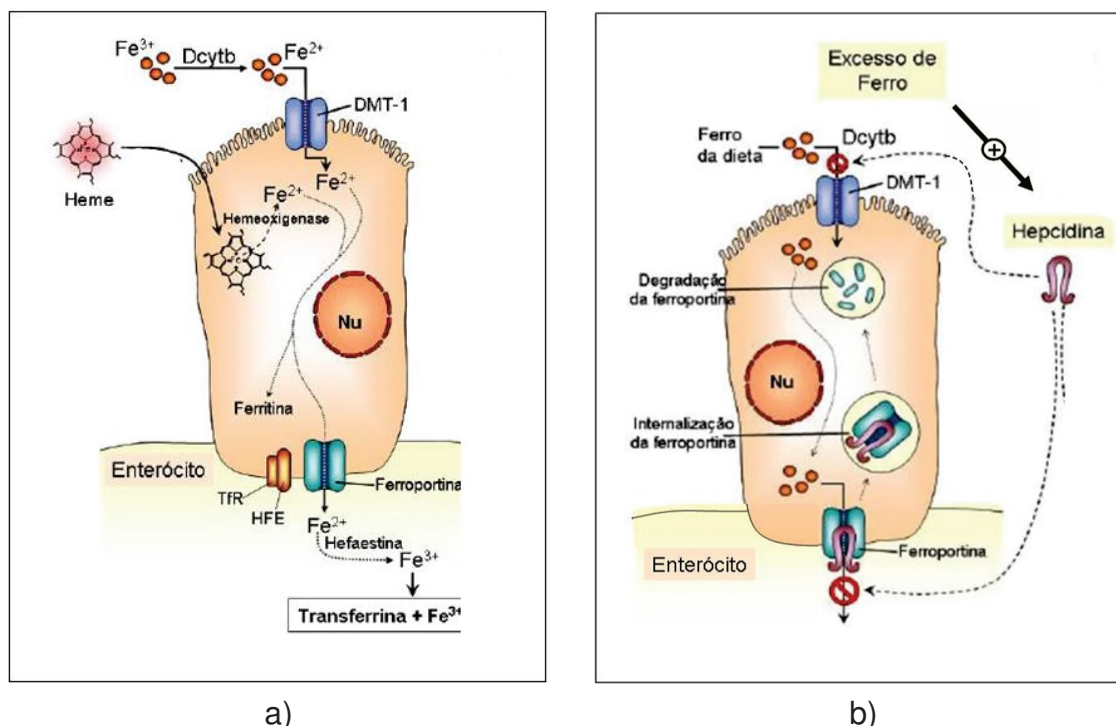
Tabela 1 – Proteínas envolvidas na absorção intestinal de ferro, função e expressão nos enterócitos e efeito para manter a homeostase do ferro em situações de depleção.

Proteína	Função	Expressão no enterócito*	Efeito na deleção de ferro
Hepcidina	Regulador de ferro	Não	Provável redução ¹
HFE	Regulador de ferro	Sim	Sem alteração
DcytB	Redução de ferro	Sim	Aumento
DMT1	Transporte de ferro	Sim	Aumento
Ferroportina	Exportador de ferro	Sim	Aumento
Hefaestina	Oxidação de ferro	Sim	Sem alteração
Transferrina	Transporte de ferro	Não	Aumento
TfR1	Receptor para transferrina	Sim	Aumento
Ferritina	Armazenamento de ferro	Sim	Redução

Dcytb, citocromo b duodenal redutase; DMT-1, proteína transportadora de metal divalente-1; TfR, receptor da transferrina; e HFE, proteína hemocromatose. * Expressão nos vilos e/ou nas criptas dos enterócitos. ¹Mao *et al.* (2019). Adaptado de Worwood (2001) e Santos (2010), pela autora (2021).

A absorção do ferro ocorre tanto na sua forma inorgânica, encontrado em leguminosas, ovos, cereais e em alimentos enriquecidos com ferro, quanto na forma heme, proveniente da quebra da hemoglobina e mioglobina das carnes (DOORN; GOSSE-LINK, 2012), Figura 2a. O mecanismo envolvido na absorção do ferro heme ainda é pouco compreendido (ANDERSON; FRAZER, 2017) e corresponde a apenas 1/3 do

Figura 2 – Mecanismos envolvidos na absorção do ferro alimentar no enterócito: (a) absorção de ferro pelo enterócito e transporte pela transferrina no plasma; (b) bloqueio da absorção de ferro no enterócito.



Legenda: Dcytb, citocromo b duodenal redutase; DMT-1, proteína transportadora de metal divalente-1; TfR, receptor da transferrina; Nu, núcleo; HFE, proteína hemocromatose. Fonte: Adaptado de Grotto (2008), pela autora (2021).

total de ferro proveniente da alimentação (HOFFBRAND *et al.*, 2006). A absorção do ferro hemínico (oriundo da hemoglobina e mioglobina) ocorre por endocitose no enterócito, mediada pela proteína HCP1. Nesse processo o heme é absorvido como molécula de metaloporfirina intacta, para em seguida a enzima heme oxigenase separar o ferro do anel de protoporfirina e somar ao ferro vindo das fontes não heme, contendo ferro inorgânico na forma de íons Fe^{+3} ou Fe^{+2} (GROTTO, 2008; FAIRBANKS, 2009).

Referente ao ferro não heme, pode-se observar na Figura 2a, que o ferro entra na circulação após atravessar a membrana apical do enterócito, via proteína transportadora de metal divalente-1 (DMT-1). Para exercer a sua função, a DMT-1 precisa que o ferro seja convertido do estado Fe^{+3} para o estado Fe^{+2} , processo que ocorre quando há necessidade de conversão, mediado pela Dcytb. A não necessidade de conversão pode ser uma das explicações da biodisponibilidade comumente mais alta de ferro na forma de íon Fe^{+2} (GROTTO, 2008; FAIRBANKS, 2009; LAPARRA *et al.*, 2009).

No interior do enterócito, o ferro fica armazenado na forma de ferritina, quando sua saturação plasmática estiver normal ou aumentada. Do contrário, é liberado para o plasma pela extremidade basolateral do enterócito via ferroportina (FPN1), na forma de Fe^{+2} .

Lembrando, que a Tf é dependente de receptores localizados nas membranas das células (TfR1) para que ocorra a internalização do ferro e possa transportá-lo, bem como a função da Tf, além do transporte, está em reduzir a sua reatividade e facilitar a sua liberação para os locais de ação e armazenamento.

A FPN1 é seletiva para o ferro na forma Fe^{+2} , assim como a DMT-1, porém a Tf tem afinidade pelo ferro na forma de íon Fe^{+3} , sendo necessária a ação da hefaestina oxidase mudando sua valência para ligar-se à Tf (Figura 2a), (GROTTO, 2008; ANDERSON; FRAZER, 2017).

Um estudo com cultura de células intestinais (*monolayers*), apresentado por E Kim *et al.* (2008), mostrou que a inibição na absorção de ferro não heme por determinados compostos bioativos de plantas pode ocorrer, e que parece acontecer na estrutura basolateral do enterócito, impedindo a saída do ferro via FPN e não pela redução da sua entrada na célula intestinal (membrana apical). Posteriormente, Lesjak *et al.* (2019) mostrou o mesmo comportamento para inibir a absorção do ferro, em modelo experimental com ratos, após 5 horas do consumo de alimento contendo isótopo de ferro ^{59}Fe e o composto fenólico quercetina, mostrando também, um notável aumento da entrada de ferro no enterócito pela membrana apical e um significativo decréscimo do efluxo de ferro pela membrana basal do enterócito.

Segundo os autores, o efeito é atribuído a uma ação quelante intracelular do ferro pelo composto fenólico e também consideram, que informações sobre os mecanismos envolvidos na influência de bioativos provenientes da alimentação sobre a absorção do ferro não heme *in vivo* são ainda escassos.

No enterócito, a proteína HFE parece programar a absorção de ferro ao interagir com o TfR1 para detectar o seu grau de saturação, sinalizando para uma maior ou menor liberação do hormônio hepcidina (Figura 2) (LEBRON *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2011). A hepcidina, como já mencionado, é um peptídeo circulante com papel fundamental para a homeostase do ferro (COFFEY; GANZ, 2017).

Quando o organismo está com elevada quantidade desse mineral, ocorre aumento na liberação de hepcidina, que se liga à FPN1 impedindo a absorção de ferro pelo enterócito (Figura 2b) e também a sua liberação pelos macrófagos. Em contrapartida, quando o organismo detecta necessidade em absorver ferro as concentrações de hepcidina ficam baixas, favorecendo a sua passagem pela membrana basolateral do enterócito via FPN1, liberação para o plasma e armazenamento (GUNSHIN *et al.*, 1997; LEBRON *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2011) (Figura 1 e Figura 2a).

Em conjunto, esses mecanismos revelam, mais uma vez, que a absorção de ferro no intestino delgado exerce função essencial para o controle da sua homeostase e tenderá a aumentar apenas quando existir deficiência do mesmo ou em fases específicas da vida, com maior necessidade para esse nutriente, como na gestação, lactação e puberdade (GROTTO, 2008).

No organismo o ferro absorvido é armazenado, predominantemente, na forma de ferritina (hidrofílica), que é uma proteína heterodimérica que estoca ferro (até 4500 átomos de Fe^{+3} na forma de hidroxifosfato férrico). Ela está presente principalmente no fígado, baço, medula óssea, e em menor concentração no plasma, como ferritina sérica. Seus valores se correlacionam aos níveis totais de ferro corporal e, por isso, é um dos meios para avaliar a presença ou não de sobrecarga de ferro. A outra forma de armazenamento é como hemossiderina (molécula hidrófoba) com agregados grosseiros de ferritina, encontrada principalmente em macrófagos, que obtém ferro pela fagocitose das hemácias senescentes (POWELL *et al.*, 2016; SOUTO *et al.*, 2016; ANDERSON; FRAZER, 2017).

As alterações genéticas relacionadas ao transporte e regulação do ferro no organismo, associadas à determinados fatores ambientais, podem resultar em comprometimento da sua homeostase. Um exemplo dessas alterações genéticas são as mutações do gene *HFE*, que poderão causar a redução na expressão do hormônio hepcidina, o que leva à não degradação da FPN e, conseqüentemente, a uma contínua absorção de ferro e o seu acúmulo progressivo no organismo, provocando o desenvolvimento da HH *HFE* (POWELL *et al.*, 2016; ANDERSON; FRAZER, 2017).

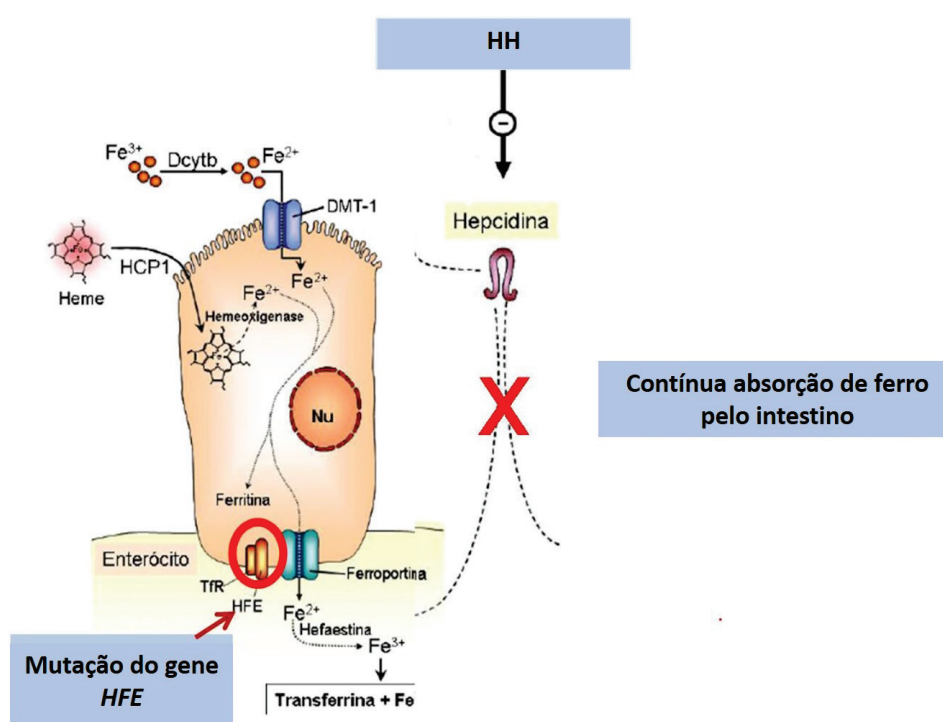
O envolvimento do gene *HFE* no controle do ferro, é recente e considerado uma das primeiras descobertas sobre a codificação genética envolvida em sua homeostase. O gene *HFE* foi localizado por Feder *et al.* (1996) no cromossomo 6p21.3 e codifica a proteína de membrana de 348 aminoácidos, denominada HFE e mutações no gene *HFE*, como é de se esperar, estão relacionados a alterações na homeostase desse mineral. Ressaltando que casos de hemocromatose, são classificados como uma sobrecarga de ferro primária ou secundária. A sobrecarga de ferro primária, conhecida como HH, é devido à alterações em genes de proteínas envolvidas no processo de regulação da homeostase do ferro no organismo, exemplo do gene *HFE*. Já a sobrecarga de ferro secundária, envolve doenças congênitas ou adquiridas como a anemia hemolítica; a síndrome mieloplásica; durante o tratamento com transfusões regulares na talassemia beta maior; a anemia falciforme; a anemia sideroblástica; a hepatite C; na intoxicação por sulfato ferroso e na síndrome dismetabólica da sobrecarga de ferro (DIAZ *et al.*, 2011; SOUTO *et al.*, 2016; RAMETTA *et al.*, 2020).

3.1.3 Hemocromatose hereditária

A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença genética autossômica recessiva, caracterizada pelo aumento de 3 a 4 vezes da absorção do ferro alimentar, o que resulta na deposição progressiva de ferro no organismo e no surgimento de lesões em vários órgãos e tecidos, como coração, articulações, pâncreas, tecido endócrino e fígado (TAVILL; ADAMS, 2006; ALLEN, K. J. *et al.*, 2008). Nessa desordem, a capacidade aumentada da absorção de ferro ocorre mesmo com o seu armazenamento

elevado no organismo. Na Figura 3 é possível visualizar a absorção do ferro alimentar em portadores de HH com mutação no gene *HFE*. A hepcidina, que desempenha um papel crítico na regulação da absorção do ferro, tem a sua produção inadequadamente baixa em pacientes com HH *HFE*, o que leva a esse aumento da absorção intestinal de ferro nesses indivíduos (POWELL *et al.*, 2016). Os efeitos da HH são agravados, como descrito anteriormente, pela ausência em seres humanos de um mecanismo específico para regular a sua excreção (GROTTO, 2008; VILLANI *et al.*, 2010; POWELL *et al.*, 2016; ANDERSON; FRAZER, 2017).

Figura 3 – A absorção do ferro alimentar em portadores de hemocromatose hereditária com mutação no gene *HFE*.

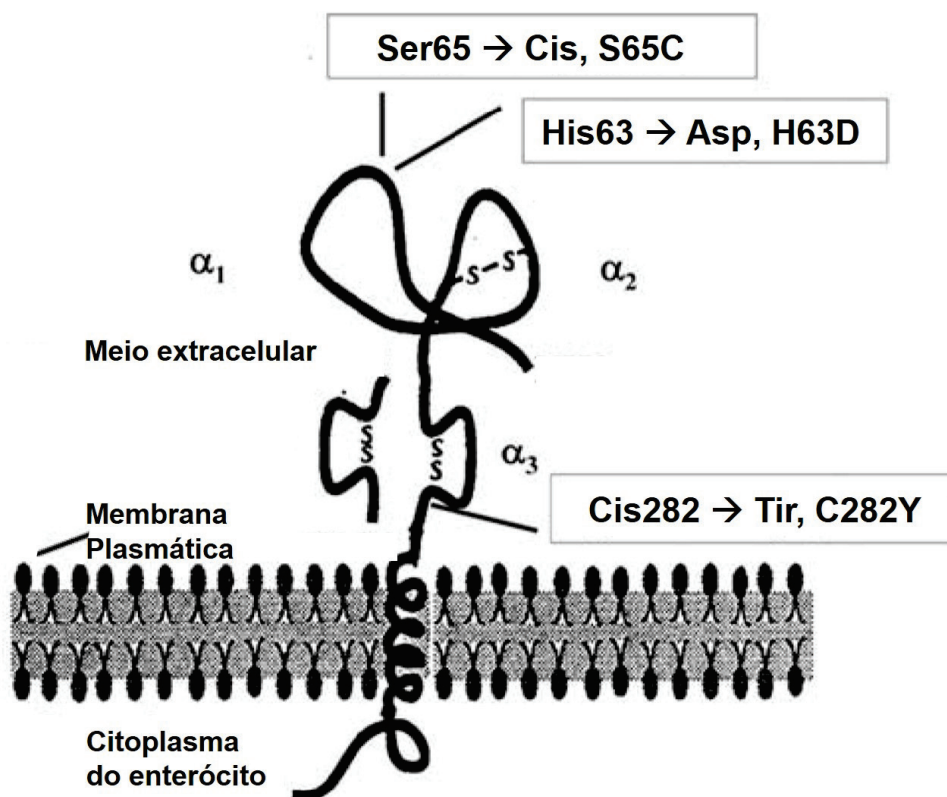


Legenda: HH, hemocromatose hereditária; Dcytb, citocromo b duodenal redutase; DMT-1, proteína transportadora de metal divalente-1; TfR, receptor da transferrina. Adaptado de Grotto (2008), pela autora, 2021.

A HH pode ou não estar associada a mutações ligadas ao gene *HFE*. Quando ligadas ao gene *HFE*, são definidas como tipo 1 e apresentam como principais mutações: C282Y, H63D e S65C. Na Figura 4 é possível identificar a localização das três principais mutações do gene *HFE*.

Mutações não relacionadas ao gene *HFE* são denominadas tipo 2A (mutação no gene da hemojuvelina - *HJV*) e tipo 2B (mutação no gene da hepcidina - *HAMP*), ambas encontradas na HH juvenil; tipo 3 (mutação no receptor da transferrina, TfR2) e tipo 4 (mutação no gene da ferroportina, *SLC40A1*, quando causa resistência à hepcidina). Embora todas essas mutações possam expressar o fenótipo para a HH, a

Figura 4 – Representação esquemática da proteína de membrana composta por 348 aminoácidos, denominada HFE, codificada pelo gene *HFE* e identificação das três principais mutações.



Legenda: C282Y - mutação do gene *HFE*, que ocorre no nucleotídeo 845, codificando para a substituição da cisteína (Cis) por tirosina (Tir) no aminoácido da posição 282 (C282Y) da proteína HFE. H63D - mutação do gene *HFE*, que ocorre no nucleotídeo 187, codificando para a substituição da histidina (His) por ácido aspártico (Asp) no aminoácido da posição 63 (H63D) da proteína HFE. S65C - mutação do gene *HFE*, que ocorre no nucleotídeo 193, codificando para a substituição da serina (Ser) por cisteína (Cis) no aminoácido da posição 63 (H63D) da proteína HFE (BENNETT *et al.*, 2000). Fonte: Bacon *et al.* (2011).

maioria dessas condições são tidas como muito raras, exceto para a HH *HFE*.

A HH relacionada ao gene *HFE* representa mais de 90% dos casos conhecidos e a maior parcela dos portadores de HH *HFE* apresenta mutação C282Y homozigoto. Segundo Bomford (2002), a mutação C282Y homozigoto é a responsável por mais de 80% dos casos de HH na população do norte da Europa, enquanto na Itália, de acordo com Piperno *et al.* (1998), a participação da mutação C282Y homozigoto é de aproximadamente 64% nos casos da doença. Ao sul do mesmo continente, as mutações envolvidas nos casos de HH tendem a ser mais heterogêneas. Em relação às demais mutações em casos de HH *HFE*, tem-se uma menor parcela para a presença da mutação duplo heterozigoto C282Y/H63D, em seguida para os casos envolvendo apenas a mutação H63D e uma minoria de portadores para a HH com a mutação

S65C (POWELL *et al.*, 2016; SANDHU *et al.*, 2018). A mutação C282Y homozigoto é associada ao maior risco para manifestar as condições clínicas da HH (WALLACE *et al.*, 2002; ADAMS *et al.*, 2005; FRANCHINI, 2006; PORTO *et al.*, 2016; POWELL *et al.*, 2016).

Na população em geral, a mutação H63D é a mais encontrada, porém, assim como a mutação S65C, tem uma baixa penetrância. Existe para essas duas mutações, dependência de um maior grau de exposição a fatores de risco ambientais para desenvolver a doença, exemplo de um hábito alimentar com o consumo constante de alimentos fortificados com ferro, o consumo excessivo de álcool e/ou a presença de síndrome metabólica, dentre outros fatores ainda não bem esclarecidos (SHAM *et al.*, 1997; BELL *et al.*, 2000; DEUGNIER *et al.*, 2019). De acordo com Cançado *et al.* (2007), indivíduos heterozigotos para o gene mutante podem expressar o fenótipo de HH semelhante aos indivíduos homozigotos, confirmando que a expressão fenotípica dessa doença autossômica recessiva pode ser bastante variável, em consequência da influência de fatores não genéticos, que refletiriam no seu curso clínico.

Na Figura 5 é possível observar os diferentes estágios relacionados com a expressão fenotípica para a HH, desde a elevação no índice de saturação da Tf e da concentração de ferritina sérica até sintomas clínicos, que diferem de acordo com cada portador (POWELL *et al.*, 2016). O teste genético para identificar mutações em genes envolvidos para a sobrecarga de ferro no organismo, auxilia consideravelmente para a identificação de portadores de HH, principalmente, em pacientes com reservas de ferro ainda pouco alteradas.

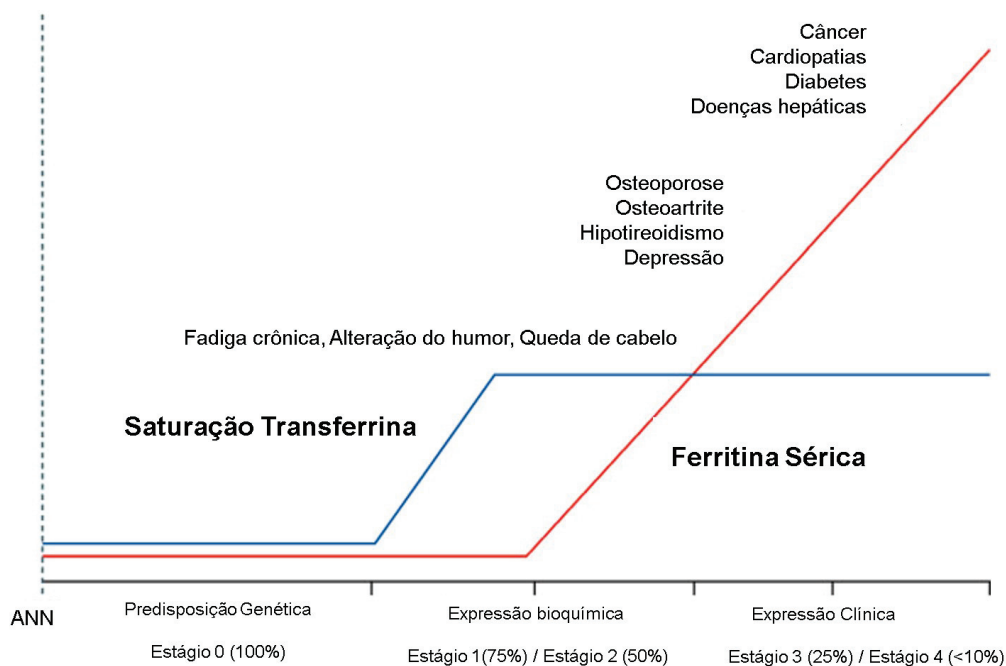
A HH é considerada uma das doenças genéticas mais comuns em caucasianos, normalmente descendentes de celtas e da população do norte da Europa (LUCOTTE, 1998; JACKOWSKI *et al.*, 2004; ADAMS *et al.*, 2005). Por consequência dos processos migratórios, a HH disseminou para outros locais, inclusive o Brasil.

Apesar de a HH continuar sendo bastante subdiagnosticada, estima-se que 0,3 a 0,8% dos indivíduos em diferentes populações com descendência nórdica ou celta apresentam HH *HFE* (EDWARDS *et al.*, 1988; PEREIRA *et al.*, 2001; ADAMS *et al.*, 2009; GARRISON, 2009; VILLANI *et al.*, 2010; AYMONE *et al.*, 2013; PORTO *et al.*, 2016).

Quando diagnosticada em fase inicial é possível antecipar a aplicação de medidas terapêuticas e como consequência, diminuir a evolução da doença e o aparecimento de comorbidades (VILLANI *et al.*, 2010; MARTINS, 2011; DOORN; GOSSELINK, 2012; MARTINS, 2012; AGUIAR *et al.*, 2014; DEUGNIER *et al.*, 2019).

No Brasil, embora existam poucas pesquisas sobre doenças genéticas que abordam a HH, os dados de Terada *et al.* (2009) com doadores de sangue, apresentando distribuição equilibrada entre caucasoides e não caucasoides em São Paulo, encontraram frequência para o alelo C282Y de 2,2% e 2,3% para homens e mulheres,

Figura 5 – Diferentes estágios para o fenótipo de hemocromatose hereditária.



Legenda: ANN, Acima do Nível Normal. Fonte: Adaptado de Powell *et al.* (2016), pela autora (2021).

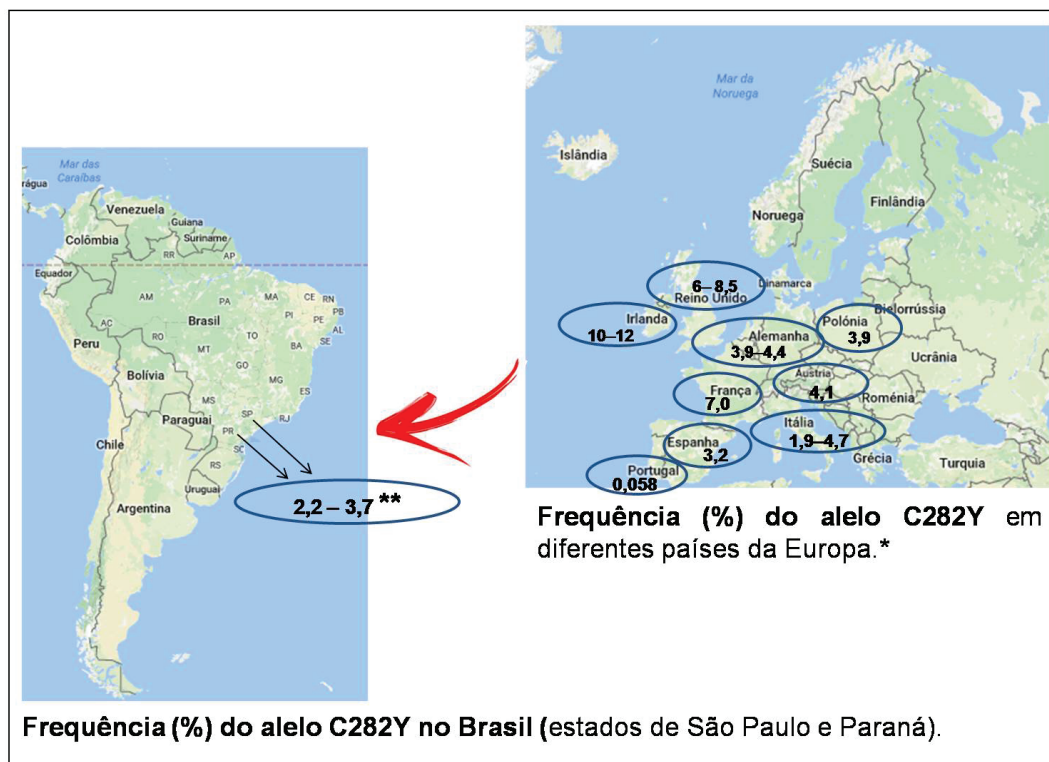
respectivamente. Na mesma região, também com doadores de sangue, Bueno *et al.* (2006) identificaram 2,7% para C282Y. Pereira *et al.* (2001) descreveram frequência de 3,7% para C282Y em descendentes de europeus. Na pesquisa de Jackowski *et al.* (2004), no estado do Paraná, a frequência para o alelo C282Y foi de 3,5% para pessoas naturais daquele estado e com origem caucasóide. A Figura 6 mostra a frequência dessas mutações, na população em geral, em países da Europa e no Brasil (CRAXI *et al.*, 2011).

Os resultados encontrados no Brasil, embora escassos, são semelhantes aos identificados para populações italiana, espanhola, alemã e superior àquela encontrada em Portugal para a frequência do alelo C282Y. Os respectivos países, juntamente com a América do Norte, Austrália e Nova Zelândia, consideram a HH um problema de saúde pública e a principal doença genética que atinge a sua população caucasóide (ADAMS, 2015; O'TOOLE *et al.*, 2015; GRAAFF *et al.*, 2016).

Nem todos que apresentam predisposição genética desenvolverão a doença. A expressão da HH é variável, ocorre de maneira precoce em algumas pessoas e tardiamente em outras. As manifestações clínicas são proporcionais ao grau de sobrecarga de ferro e influenciadas pelo sexo, alimentação e por outros fatores ainda desconhecidos (NEGHINA; ANGHEL, 2011; POWELL *et al.*, 2016; SANDHU *et al.*, 2018).

Nos primeiros anos de HH não há sinais ou sintomas. Porém, após algumas

Figura 6 – Distribuição do alelo C282Y em países da Europa e no Brasil.



*Dados conforme Cardoso *et al.* (2001) e Craxi *et al.* (2011). **Pesquisas no Brasil: Pereira *et al.* (2001), Jackowski *et al.* (2004), Bueno *et al.* (2006) e Terada *et al.* (2009).

Fonte: A autora, 2021.

décadas (normalmente entre 40 e 60 anos de idade para homens e após a menopausa para mulheres com HH *HFE*), quando os depósitos de ferro tornam-se elevados, iniciam os primeiros sinais, bastante inespecíficos como: fadiga crônica, queda de cabelo, artralgia, alteração de humor, dor abdominal e perda de peso. Existe uma menor penetrância da HH em mulheres, que tem sido atribuída às perdas fisiológicas de sangue durante a menstruação, à gestação, ao efeito antioxidante do estrogênio e por uma ocorrência natural para maiores concentrações de hepcidina em mulheres com sobrepeso (DESGRIPPES *et al.*, 2013).

Com a evolução da sobrecarga há maior comprometimento de órgãos e de sistemas, principalmente fígado, baço, miocárdio, glândulas endócrinas e medula óssea, aumentando o risco para desenvolver diabetes, cardiomiopatias, cirrose, artrites, hipogonadismo, hiperpigmentação da pele e câncer, dentre outras (WHITLOCK *et al.*, 2006; VILLANI *et al.*, 2010). De acordo com Bardou-Jacquet *et al.* (2020), o dano tecidual induzido pela sobrecarga de ferro, ao ocorrer no fígado, leva à fibrose hepática, a qual poderá evoluir para cirrose e elevar o risco para desenvolver carcinoma hepático. Em pacientes que tinham fibrose estágio 3 ou 4 quando diagnosticados com HH, a incidência de câncer de fígado foi de 32,8 por 1000 pessoas/ano. Em pacientes que tinham fibrose estágio 2 ou menos no momento do diagnóstico da HH, a incidência foi

de 2,3 por 1000 pessoas/ano.

Também existem estudos que apontam associação epidemiológica entre sobrecarga de ferro com problemas cardiovasculares e diabetes (KWAN *et al.*, 1998; BASULI *et al.*, 2014). O acúmulo de ferro, ao ocorrer no miocárdio, está associado a necrose de miócitos e fibrose, que pode provocar a dilatação ventricular, causando insuficiência cardíaca congestiva e arritmias. Tanto a deposição de ferro com a formação de danos oxidativos no fígado e no músculo esquelético (resultando em resistência à insulina), quanto a deposição de ferro em células de ilhotas pancreáticas, podem desencadear o *diabetes mellitus* (SANTOS, 2010; BASULI *et al.*, 2014). A detecção das mutações para HH contribuem não só para o seu diagnóstico e tratamento, bem como identifica populações de risco para outras complicações, com alto impacto à saúde pública.

Assim, quando a HH é diagnosticada precocemente e tratada, manifestações clínicas graves (Figura 5) tendem a ser evitadas (WHITLOCK *et al.*, 2006; VILLANI *et al.*, 2010; BRISSOT *et al.*, 2011; POWELL *et al.*, 2016). Segundo pesquisa envolvendo pacientes da França, Irlanda, Reino Unido e Estados Unidos, o caminho mais comum para o diagnóstico da HH ainda tem sido por acaso (42%). A maioria dos pacientes (87%) relatam sintomas associados à doença no momento do diagnóstico, sendo o principal sintoma a fadiga (74%), seguido da dor nas articulações (55%), mudanças na coloração da pele (25%) e problemas cardíacos (20%) (BRISSOT *et al.*, 2011). Esses dados evidenciam que o diagnóstico para a HH, ocorre tardiamente em muitos pacientes.

O diagnóstico da HH baseia-se na detecção da sobrecarga de ferro (ferritina sérica elevada e índice de saturação de transferrina elevada) associada à mutação do gene *HFE*, ou de outros genes, todos relacionados à homeostase do ferro. A concentração de ferritina sérica tem sido utilizada como valor preditivo para um maior risco de danos em órgãos e tecidos (POWELL *et al.*, 2016).

O tratamento clássico da HH iniciou em 1950 (DAVIS; ARROWSMITH, 1950) e ocorre por meio de flebotomias (sangrias terapêuticas). O tratamento com flebotomias está dividido em duas fases: fase inicial (depleção primária) e fase de manutenção. No início do tratamento, o número de flebotomias pode alcançar até oito vezes em um único mês, segundo Garrison (2009). O objetivo é induzir a um balanço negativo na concentração de ferro e remover o seu excesso acumulado nos tecidos (HUTCHINSON *et al.*, 2007). Ao retirar 500 mL de sangue do organismo, são removidos em torno de 250 mg de ferro das hemoglobinas. Para a síntese de novas moléculas de hemoglobina, o ferro armazenado precisará ser removido e, assim, gradualmente deplegado (WORWOOD, 2001). Caso as flebotomias iniciem antes do comprometimento de órgãos e tecidos (sem avançar para complicações mais graves, como cirrose e diabetes), a expectativa de vida dessas pessoas tem sido considerada normal (ADAMS, 2015).

A depleção primária dos estoques de ferro, pode levar de meses até 2 a 3 anos,

muitas vezes com um programa semanal de flebotomias para obter concentrações de ferritina séria e índice de saturação de transferrina dentro da normalidade. Após a depleção primária, inicia a fase de manutenção, onde são mantidas as flebotomias para evitar o novo acúmulo de ferro. A frequência ocorre conforme a necessidade de cada paciente, em geral uma flebotomia (400 a 500 mL) a cada 2 a 4 meses (BACON *et al.*, 1999; ALEXANDER; KOWDLEY, 2009; BACON *et al.*, 2011; CRAXI *et al.*, 2011; ADAMS, 2015). Nessa fase é preconizado manter a ferritina em concentrações séricas entre 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$, < 50 $\mu\text{g/L}$ ou dentro da faixa de normalidade para pessoas sem HH (322 $\mu\text{g/L}$ para homens e 291 para mulheres $\mu\text{g/L}$) (POWELL *et al.*, 2016). Nota-se, que não existe uma única referência para tal recomendação durante a fase de manutenção, segundo Powell *et al.* (2016). A concentração de ferritina sérica é conhecida por refletir a concentração de ferro armazenada no organismo, como mencionado anteriormente (1 $\mu\text{g/L}$ de ferritina sérica corresponde à 7,5 mg de ferro no organismo) e por isso a utilização desse marcador bioquímico para avaliar a efetividade do tratamento (BASSET *et al.*, 1984).

Embora haja efetividade no tratamento, nem todos os portadores de HH toleram a flebotomia de repetição e, em alguns casos, também chegam a desenvolver anemia (CANÇADO; CHIATTONE, 2010; KIM, K. H.; OH, 2016). As desvantagens associadas às flebotomias envolvem: frequentes visitas à instituições de saúde habilitadas para fazer o procedimento, exacerbação das dores articulares, dores excessivas, inconformismo, tonturas, fadiga, desmaios e recusa ao tratamento. Aproximadamente um em cada oito pacientes cogitam interromper o tratamento por flebotomia (BRISSOT *et al.*, 2011; TYAGI *et al.*, 2015). Terapias para aliviar a dor dos pacientes, durante o processo de flebotomia, como compressas quentes e frias, distrações e relaxamento, têm sido empregadas (MCCAFFERY *et al.*, 1994; KIM, K. H.; OH, 2016).

Outro aspecto negativo é que as flebotomias podem se tornar um estímulo para a absorção do ferro alimentar, requerendo a sua maior frequência (DIJK *et al.*, 2008). Como já foi descrito, a HH HFE está associada a uma menor expressão do hormônio hepcidina, levando ao aumento da concentração de ferritina sérica. Valores muito baixos de ferritina sérica, decorrentes das excessivas flebotomias, levam à supressão da concentração da hepcidina que já é baixa nesses pacientes, exacerbando a absorção de ferro pelos enterócitos (DIJK *et al.*, 2008). De acordo com o estudo de Lynch *et al.* (1989), quando a concentração de ferritina sérica de um paciente é baixa, exemplo de 14 $\mu\text{g/L}$, tende a ocorrer aumento de 42% na absorção do ferro, enquanto uma concentração de ferritina sérica igual a 538 $\mu\text{g/L}$ o aumento seria de 12%.

Para pacientes que não toleram o tratamento com flebotomias, o uso de agentes quelantes sintéticos de ferro pode ser oferecido. Tais quelantes sintéticos são prescritos para portadores de HH em último caso, devido aos seus efeitos nocivos, principalmente, hepáticos (TYAGI *et al.*, 2015) e menor efetividade comparado às fle-

botomias. O tratamento com flebotomias é, ainda, considerado como o mais seguro e eficaz (POWELL *et al.*, 2016), mesmo diante dos seus efeitos indesejáveis.

Brissot *et al.* (2011) investigaram a experiência de 201 pacientes, quanto a convivência com a HH e o tratamento com flebotomias. Segundo os autores, 30% eram pacientes em fase aguda, 49% eram pacientes em fase de manutenção e 22% nunca haviam recebido flebotomia. A maioria dos pacientes, embora considerassem importante o tratamento com flebotomias, relatavam preocupação sobre os seus efeitos colaterais e inconveniências, afetando frequentemente as suas vidas. Os resultados da investigação mostraram, que 52% dos pacientes em fase aguda e 37% dos pacientes em fase de manutenção apresentavam efeitos colaterais “sempre” ou na “maioria das vezes” após a flebotomia e 16% dos pacientes “definitivamente” ou “provavelmente” consideravam não receber flebotomia se opções alternativas estivessem disponíveis.

Como tratamentos alternativos e coadjuvantes, que favorecem a redução da frequência das flebotomias, têm sido investigado a ação de agentes naturais, através do consumo de plantas ricas em determinados compostos fitoquímicos, com capacidade de quelar o ferro alimentar e reduzir a sua absorção (CRAXI *et al.*, 2011; DOORN; GOSSELINK, 2012). Agentes quelantes permitem sequestrar os íons metálicos a nível extracelular ou intracelular, formando quelatos, que possibilitam a sua eliminação do organismo (CANÇADO *et al.*, 2007; TYAGI *et al.*, 2015; HEZAVEH; SHIDFAR, 2019; ORISAKWE *et al.*, 2020).

3.2 PLANTAS UTILIZADAS COMO QUELANTES NATURAIS EM CASOS DE EXCESSO DE FERRO NO ORGANISMO

Dentre os tratamentos alternativos e coadjuvantes para diminuir a absorção de ferro, encontra-se o uso de plantas na forma de infusões e/ou extratos vegetais com propriedades de quelar o ferro da alimentação (TYAGI *et al.*, 2015; ORISAKWE *et al.*, 2020). Diversos são os estudos *in vitro* e em animais indicando plantas com potencial para interferir no metabolismo do ferro e agirem como quelantes naturais, exemplo da *Curcuma longa* (JIAO *et al.*, 2006); *Camelia sinensis* (OMAR *et al.*, 2016); *Scutellaria baicalensis* - planta de origem chinesa (PEREZ *et al.*, 2009), *Epilobium hirsutum* - encontrada em Portugal (SHEIKH *et al.*, 2017), Tucum-do-cerrado, natural do Brasil (FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016); Folhas de Lotus, *Nelumbonucifera Gaertn* (PANGJIT *et al.*, 2016). Também foram encontradas por Ebrahimzadeh *et al.* (2008), atividade quelante contra o ferro em doze plantas medicinais utilizadas no Iran.

Menor número de plantas têm sido estudadas para verificar se o efeito quelante contra o ferro, encontrado em pesquisas *in vitro* e em modelos animais, realmente ocorreria em pessoas com sobrecarga deste mineral no organismo, como nos casos de HH (Tabela 2).

Tabela 2 – Estudos com plantas, que apresentaram efeito quelante sobre a absorção do ferro, no organismo de portadores de hemocromatose hereditária.

Referência/local	Desenho	Características do Estudo	Intervenção	Achados
Kaltwasser <i>et al.</i> (1998) País: Alemanha	Clínico cruzado e não randomizado	n = 18 HH (11 C282Y/C282Y e 07 sem teste genético). Todos fase de manutenção. Idade média (anos): 46,2 EPM 4,4.	1°, 7° e 14° dia; Tratamento 1: 250 mL água; Tratamento 2: 250 mL chá preto*; Refeição com ⁵⁹ Fe ¹ ; <i>Whashout</i> : 2 semanas.	↓ Fe sérico (70%) quando comparado com o controle (água); p < 0,001.
Hutchinson (2010) País: Inglaterra	Clínico cruzado e randomizado	n = 10 HH C282Y/C282Y. Todos em fase de manutenção. Idade média (anos): 56,8 EPM 3,1.	Basal e 0,5, 1, 2, 3 e 4 h após refeição ² ; Tratamento 1: 200 mL água; Tratamento 2: <i>Silybum marianum</i> em cápsula (140 mg de silibina); Tratamento 3: 200 mL chá preto* (170 mg de fenóis totais); <i>Whashout</i> : 1 semana.	↓ Fe sérico, quando comparado ao <i>S. marianum</i> em cápsula <i>versus</i> água; p < 0,05. Ao comparar, água <i>versus</i> chá preto, não ocorreu diferença significativa; p = 0,203.
Lobbes <i>et al.</i> (2020) País: França	Clínico cruzado duplo cego e randomizado	n = 20 HH C282Y/C282Y. Sem especificar a fase de tratamento. Idade média (anos): 55,4 DP 15,3.	Basal e 0,5, 1, 2, 3 e 4 h após refeição ³ ; Tratamento 1: Oligo-gin (prociandina 100 mg) ⁴ ; Tratamento 2: placebo; <i>Whashout</i> : 3 dias.	Extrato rico em prociandina não reduziu a absorção do Fe (p > 0,05).

**Camellia sinensis*¹ 5,9 mg Fe endógeno + 1 µg de ⁵⁹Fe; ² 3,9 mg Fe endógeno + 10 mg de Fe⁺³; ³ 43 mg de ferro endógeno (heme e não heme); ⁴ Cápsula com extrato rico em prociandina de casca de pinheiro marinho francês - *Pinus pinaster* Ait.; HH, hemocromatose hereditária; EPM, erro padrão da média; DP, desvio-padrão da média.

Fonte: A autora, 2021.

Pesquisas com o chá preto (*Camellia sinensis*) e com o cardo mariano (*Silybum marianum*) mostraram o potencial dessas plantas para reduzir a absorção do ferro alimentar em portadores de excesso de ferro (KALTWASSER *et al.*, 1998; HUTCHINSON *et al.*, 2010; HAGAG *et al.*, 2013). O efeito quelante parece ser proporcional, ou dependente, da concentração de compostos fenólicos encontrados nos extratos vegetais dessas plantas, como as catequinas (exemplo da epigalocatequina-3-galato) e as flavolignanas (destaque para a silibina) , respectivamente, sendo provavelmente os complexos formados com o ferro eliminados pelas fezes ou urina (LIVREA *et al.*, 1996; EBRAHIMZADEH *et al.*, 2008; SHEIKH *et al.*, 2017; HEZAVEH; SHIDFAR, 2019).

3.3 A ERVA-MATE: CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO E CONSUMO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

As folhas da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) são a parte da planta alvo da maioria dos estudos para investigar as suas características fitoquímicas e ação no organismo humano. Amplamente utilizada na forma de infusões pelos habitantes das regiões onde ocorre, a erva-mate também ocupa relevante importância na cultura local e na dimensão ambiental, social e econômica, sendo uma alternativa de renda a pequenos proprietários da agricultura familiar (HECK; DE MEJIA, 2007; TORRES; FARAH, 2017; KUJAWSKA, 2018).

Figura 7 – Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).



Fonte: A autora, 2018.

A erva-mate corresponde a uma planta arbórea (Figura 7), encontrada naturalmente em condição de sub-bosque (em meia sombra de árvores nativas de maior porte) no sul da América do Sul, envolvendo a Argentina, o Paraguai e o Brasil. No

Brasil a erva-mate está distribuída entre os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul e em pequenas áreas do estado de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (DA CROCE, 2000). A cadeia produtiva de erva-mate é classificada como uma atividade econômica de base florestal não madeireira e está entre os três principais produtos dessa atividade econômica (IBGE, 2020b). Envolve ervais de ocorrência natural (nativos) e formados a partir de sistema de reflorestamento, tendo que grande parte da produção deriva da retirada das suas folhas. A quantidade de folha verde de erva-mate vinda da sua extração de ervais nativos e cultivados, tem aumentado ao longo dos anos no Brasil. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020b), em 2002 correspondia a um total de 229.701 toneladas, no ano de 2012, 252.700 toneladas, em 2018 alcançou 392.962 toneladas e em 2019 a quantidade foi similar ao ano anterior, 362.545 toneladas, sendo a maioria da produção (99,98%), proveniente dos três estados do sul do país, também os principais responsáveis pelo seu consumo.

Porém, diante da descoberta da sua riqueza em constituintes bioativos e por estudos indicarem propriedades benéficas ao organismo humano, seu consumo tem expandido para outros países (HECK; DE MEJIA, 2007). O Brasil e a Argentina contribuem com mais de 93% das exportações de erva-mate, sendo que cada um participou com metade dessa quantidade exportada a nível mundial em 2019. Os principais países importadores são o Uruguai, Síria, Chile, Estados Unidos, Espanha, Alemanha e França (OEC, 2020).

As propriedades benéficas das bebidas preparadas com erva-mate têm sido atribuídas em grande parte aos seus compostos fenólicos, extraídos principalmente, das suas folhas (HECK; DE MEJIA, 2007), as quais revelam uma elevada solubilidade para a extração desses compostos com a água (PAGLIOSA *et al.*, 2010b). O efeito do preparo de uma infusão sobre a extração de compostos fenólicos tem sido reportado para produtos elaborados com folhas e talos de erva-mate e que foram submetidos à secagem com o uso de temperaturas elevadas (DA SILVEIRA *et al.*, 2014; GEBARA *et al.*, 2017).

De acordo com o modo de secagem e fragmentação empregados, a erva-mate é processada para ser a matéria-prima de bebidas tradicionais, que possuem uma proporção aproximada de talos/folhas de 30/70% (BRAGANÇA *et al.*, 2011). O *chimarrão* e o *tereré*, são bebidas elaboradas com água quente e fria, respectivamente, e o chá mate tostado, feito com as folhas e talos secos e torrados. As folhas e talos na erva-mate para *chimarrão* e na erva-mate para *tereré* passam, inicialmente, em contato a uma temperatura aproximada de 400 °C e uma secagem final entre 90 a 350 °C, enquanto na erva-mate para fazer o chá mate tostado é necessário seguir para mais uma etapa, a torrefação (120 °C por mais 15 minutos) (MACHADO *et al.*, 2007). No entanto, o emprego de temperaturas muito elevadas e o contato direto à fumaça da

queima de lenha durante o processamento, favorecem a formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (KAMANGAR *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2010; KAMANGAR *et al.*, 2016; OKARU *et al.*, 2018). Para minimizar a geração e a incorporação de HPAs na erva-mate durante o beneficiamento, empresas do setor ervateiro tem buscado melhorias no processo de secagem da erva-mate (NABECHIMA, 2006). Os HPAs correspondem a uma ampla classe de compostos orgânicos, considerados contaminantes ambientais, gerados naturalmente, (como pela queima de florestas), mas principalmente por atividades humanas voltadas à produção industrial, emprego de temperaturas muito elevadas e sistemas de transporte que utilizam combustíveis fósseis. Compostos, que conforme a estrutura química podem ser de baixa toxicidade (2–4 anéis), bem como de alta toxicidade (5–6 anéis) para o organismo humano (VIEIRA *et al.*, 2010; OKARU *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm enfatizado a importância em assegurar a oferta de plantas com propriedades benéficas ao organismo na forma de infusões, mas que sejam concomitantemente, seguras a um consumo prolongado para não levarem à uma exposição elevada do organismo a contaminantes químicos/ambientais (VIEIRA *et al.*, 2010; BRAGANÇA *et al.*, 2011; BARRELLA *et al.*, 2017; VALDUGA *et al.*, 2019). Um estudo de caso-controle no Uruguai (843 participantes com câncer de pulmão e 1466 participantes como controle), mostrou associação positiva para o maior risco de desenvolver câncer no pulmão, tanto devido ao consumo elevado de alimentos ricos em ferro, quanto pelo consumo elevado de *chimarrão* (> de 1 litro/dia). O risco atribuído ao *chimarrão* não estaria relacionado aos constituintes naturais da planta erva-mate, que inclusive teriam efeito protetor segundo os próprios autores, mas pela presença de contaminantes ambientais, como o HPA 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) e a temperatura muito elevada (> 65 °C) que essa bebida de erva-mate tem sido ingerida (OKARU *et al.*, 2018; RONCO *et al.*, 2019).

Assim como no chá verde e no chá preto, na erva-mate também existe o risco da presença de contaminantes provenientes do uso de agrotóxicos e de outras formas de poluição ambiental, como os metais tóxicos chumbo, cádmio, arsênio e mercúrio (BRAGANÇA *et al.*, 2011; BARRELLA *et al.*, 2017; VALDUGA *et al.*, 2019).

Os portadores de HH em tratamento com flebotomias na fase de manutenção (quando a reserva de ferro no organismo é mantida à níveis bastante baixos), seriam mais sensíveis ao acúmulo de cádmio, um metal tóxico divalente. Uma depleção elevada de ferro poderia imediatamente aumentar a absorção de metais tóxicos divalentes, incluindo o cádmio (AKESSON *et al.*, 2000; PARK, S. K. *et al.*, 2006). O sistema de cultivo orgânico, é uma maneira para reduzir o risco de contaminação de plantas por esses metais. No presente estudo, foi escolhida amostra de folhas de erva-mate proveniente de cultivo orgânico e sem a presença de HPAs.

3.3.1 Compostos fitoquímicos e propriedades biológicas da erva-mate

Somado aos compostos fenólicos, a erva-mate apresenta em sua composição metilxantinas, saponinas glicosídicas e óleos essenciais. Esses compostos são metabólitos secundários que garantem vantagens para a sobrevivência da planta e são constituintes promissores, quanto ao seu impacto positivo na saúde (SIMÕES *et al.*, 2004). A erva-mate também tem como constituintes, uma elevada concentração de minerais (macro-elementos e micro-elementos) (PAGLIOSA *et al.*, 2010a; RUSINEK-PRYSTUPA *et al.*, 2016; BARRELLA *et al.*, 2017).

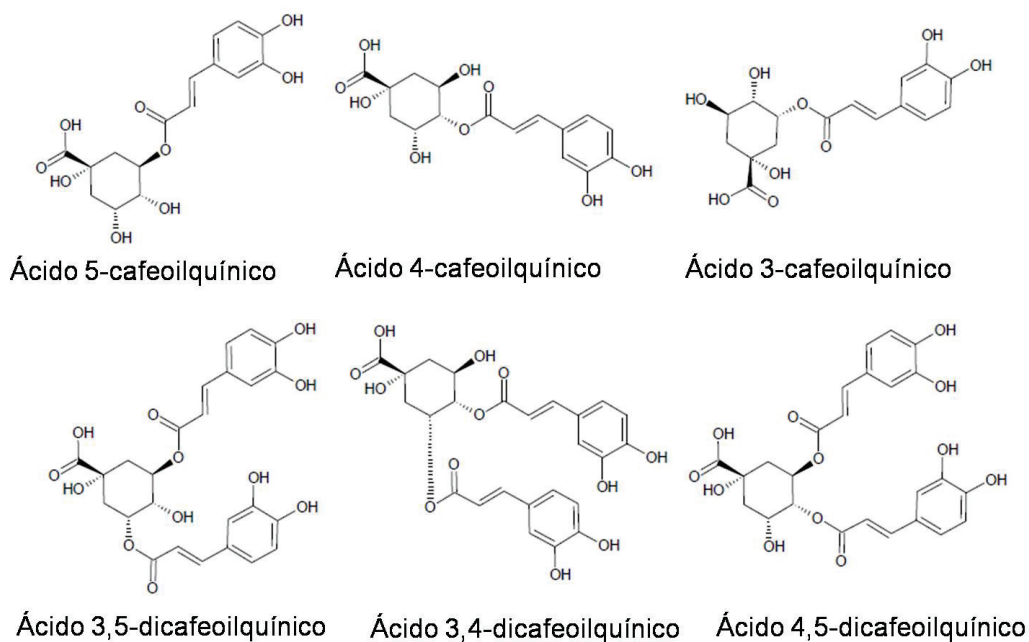
Para as infusões ou extratos de erva-mate são relatadas propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso central e sistema digestivo (GORZALCZANY *et al.*, 2001; MENDES, F. R.; CARLINI, 2007). As atividades antioxidante, hipocolesterolêmica e anti-inflamatória foram descritas em estudos *in vitro* e *in vivo* e indicam potencial para auxiliar na prevenção e/ou atenuar agravos relacionados a doenças crônico-degenerativas, como problemas cardiovasculares, diabetes e câncer (GUGLIUCCI, 1996; LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; DA SILVA *et al.*, 2008; DE MORAIS *et al.*, 2009; KLEIN *et al.*, 2011; BOAVENTURA *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2015; LUZ *et al.*, 2016; AMIGO-BENAVENT *et al.*, 2017) e complicações neurológicas (BRANCO *et al.*, 2013; GATTO *et al.*, 2015; BORTOLI *et al.*, 2017). A propriedade quelante da erva-mate contra o ferro foi estudada por Colpo *et al.* (2016) e Bordbar *et al.* (2018), mas até o momento, não foram encontrados na literatura, estudos sobre a atividade quelante da erva-mate *in vivo*, após o consumo de preparação alimentar rica em ferro.

Os efeitos da erva-mate benéficos para a saúde são, em grande parte, atribuídos à presença de seus compostos fenólicos, como já mencionado. Os principais ácidos fenólicos presentes na erva-mate são pertencentes ao grupo do ácido hidroxicinâmico, com destaque para os ácidos clorogênicos (ésteres de ácidos hidroxinâmicos e ácidos quínicos), como os ácidos 3,5-dicafeoilquínico (3,5-COQ), 3,4-dicafeoilquínico (3,4-COQ) e o ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-COQ) (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; BRAVO *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2016; TAJIK *et al.*, 2017), que podem ser observados na Figura 8.

No estudo de Bordbar *et al.* (2018), foi dissolvido ferro (Fe^{+2}) em uma bebida contendo folhas e talos de erva-mate (“*chimarrão*”), que foi ingerida por mulheres saudáveis. O delineamento da pesquisa mostrou que a complexação do ferro ocorreu na bebida, ou seja, antes da sua ingestão. No presente estudo, a intenção é investigar o potencial de uma infusão de folhas de erva-mate para inibir a absorção de ferro em portadores de HH, com base na resposta sérica de ferro, após a ingestão de uma refeição contendo alta quantidade de ferro biodisponível.

O estudo de Colpo *et al.* (2016), reportou a capacidade quelante da erva-mate contra o ferro *in vitro* e os mesmos não encontraram uma associação positiva entre a atividade quelante e o teor de compostos fenólicos. Por outro lado, estudos *in vitro* com

Figura 8 – Estrutura química dos principais ácidos fenólicos presentes na erva-mate.



ácidos fenólicos isolados atribuem a eles potencial quelante, principalmente, quando pertencentes aos derivados dos ácidos hidroxinâmicos e que em sua estrutura apresentam grupo catecol (grupos di-hidroxi ligados a um anel aromático na posição orto), com destaque para os ácidos cafeoilquínicos (KONO *et al.*, 1998; ANDJELKOVIC *et al.*, 2006; GULCIN, 2006; LI *et al.*, 2018).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos entre os que são derivados do ácido hidroxicinâmico (exemplo dos ácidos cafeico, ferúlico e dos ácidos cafeoilquínicos) e os que são derivados do ácido hidroxibenzoico (exemplo do ácido gálico e ácido siríngico). De acordo com Andjelkovic *et al.* (2006), para os derivados do ácido hidroxibenzoico, apenas aqueles que apresentam o grupo galoil tendem a mostrar efeito quelante contra o ferro, porém, de modo menos efetivo aos ácidos hidroxinâmicos com grupo catecol. Segundo os mesmos autores, o efeito quelante de ácidos fenólicos com a presença de grupo galoil ou grupo catecol seria possível em pH fisiológico, o que aumenta a relevância para investigar os efeitos de infusões que sejam fontes naturais desses compostos na saúde humana.

Referente a estabilidade de compostos fenólicos na erva-mate, embora existam estudos para as folhas inteiras e folhas em pó (YATSU *et al.*, 2011; MOLIN *et al.*, 2014), não foram encontrados na literatura, estudos para infusões com essa planta. Informações sobre a atividade quelante de ferro *in vitro* da infusão de erva-mate, em relação ao método de preparo e a estabilidade de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento, também não foram constatadas.

3.4 GRUPO DE RISCO PARA A HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA NO BRASIL

No Brasil, embora existam indicadores que apontam regiões com a frequência para as mutações no gene *HFE* equiparável a países que consideram a HH um problema de saúde pública, e também existam alertas sobre os riscos do aumento do número de casos com excesso de ferro na população brasileira relacionado a alimentação, faltam pesquisas e intervenções para este grupo (MENDES, J. F. R., 2008; MARTINS, 2011, 2012).

Desde o ano de 2000 está em vigor a legislação para o programa de fortificação mandatória de ferro em alimentos de amplo consumo (farinhas de trigo e de milho e seus subprodutos) a toda população brasileira, por causa da incidência elevada de anemia ferropênica em determinados grupos populacionais (BRASIL, 2000, 2002; ARAUJO *et al.*, 2016; BRASIL, 2017b). A legislação estabelece uma faixa de enriquecimento entre 4 a 9 mg de ferro /100 g de farinha (BRASIL, 2017b).

As políticas públicas que adotam a fortificação com ferro em alimentos amplamente consumidos pela população fazem com que as pessoas consumam diariamente alimentos fortificados com ferro, necessário ou não para elas. Na Região Sul, onde predominam descendentes de caucasianos, considerados com maior risco para desenvolver HH, corresponde também à região com o maior consumo *per capita* de farinha de trigo e de seus subprodutos (IBGE, 2010, 2020a), indicando uma maior exposição da região Sul do país a alimentos fortificados com esse mineral. Como a fortificação de alimentos com ferro, no Brasil exige o emprego de compostos com maior biodisponibilidade (sulfato ferroso ou fumarato ferroso), foi escolhido o composto sulfato ferroso para os testes *in vitro* que avaliaram a atividade quelante da erva-mate e para o seu emprego no ensaio clínico. É importante destacar, que esse composto tem validação da sua efetividade para avaliar a capacidade de absorção de ferro em seres humanos, comparável ao padrão ouro (isótopo de ferro) (HOPPE; HULTHEN, 2006).

Além do consumo de alimentos fortificados ser potencialmente perigoso a quem tem propensão a desenvolver HH (BEZWODA *et al.*, 1981; BELL *et al.*, 2000; ARANDA *et al.*, 2010; CRAXI *et al.*, 2011; DOORN; GOSSELINK, 2012; DEUGNIER *et al.*, 2019), Cook (2000) mostra, que se 20% da farinha de trigo consumida for fortificada, essa tenderá a ser responsável por 1-2 flebotomias a mais ao ano em pacientes em tratamento para a HH. Bell *et al.* (2000), em estudo na Noruega, mostrou que o consumo excessivo de ferro por pelo menos 5 anos tem uma associação positiva com a expressão clínica da hemocromatose em pacientes com mutação no gene *HFE* não C282Y/C282Y.

Vale notar que, globalmente, há um declínio no interesse para a suplementação de ferro em alimentos com amplo consumo, em parte, devido à prevalência do gene para a HH. A expressão clínica da HH nos pacientes não é uniforme e sugere que outros fatores além da presença das mutações C282Y, H63D e S65C no gene *HFE*, possam estar envolvidos, como o hábito de consumir alimentos fortificados com ferro

(BELL *et al.*, 2000; ARANDA *et al.*, 2010; HARE *et al.*, 2017; DEUGNIER *et al.*, 2019). Além disto, também há consequências para a saúde da população em geral sem deficiência desse mineral, por causa de uma exposição crônica a sua suplementação por meio de alimentos, muitas vezes sem necessidade (MARTINS, 2012; PELLETIER, 2015; ANDERSON; FRAZER, 2017). De acordo com vários outros estudos clínicos e epidemiológicos, o excesso de ferro no organismo humano, mesmo em locais sem políticas públicas para fortificação de ferro em alimentos de amplo consumo, se tornou um problema comum e que necessita de alternativas terapêuticas (MENDES, J. F. R., 2008; TAO; PELLETIER, 2009; ARANDA *et al.*, 2010; NEGHINA; ANGHEL, 2011; DOORN; GOSSELINK, 2012; MARTINS, 2012; AGUIAR *et al.*, 2014; TYAGI *et al.*, 2015).

Diante do exposto, um possível efeito da erva-mate em inibir a absorção do ferro em indivíduos com HH *HFE* merece ser investigado. Cabe destacar que o hábito de consumo diário da erva-mate é independente da classe social, estilo de vida e idade e, coincidentemente, predomina nas regiões de caucasianos descendentes de europeus, com risco aumentado para a HH e expostos ao consumo de alimentos enriquecidos com ferro ferroso.

4 MÉTODOS

4.1 ETAPAS DO ESTUDO

O estudo está dividido em duas etapas, primeiramente, um estudo *in vitro*, envolvendo análises fitoquímicas com a infusão de folhas de erva-mate e posteriormente o estudo clínico, randomizado, controlado e cruzado de três braços com portadores de HH HFE.

4.1.1 Estudo *in vitro*

4.1.1.1 Infusão de folhas de erva-mate

A infusão foi obtida de folhas adultas de erva-mate verde (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), fornecidas pela empresa Matebrás - Indústria do Mate do Brasil. A amostra foi identificada por um botânico e a exsicata da espécie encontra-se no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Botânica (código de acesso FLOR65601). As folhas que foram utilizadas no estudo são provenientes de cultivo orgânico em área sombreada (sub-bosque de floresta), na região centro-oeste do estado de Santa Catarina e foram coletadas de forma aleatória em árvores com mais de 20 anos de idade. Durante o beneficiamento, que ocorreu na indústria da empresa, as folhas passaram por um processo de secagem sem a formação de HPAs (VIEIRA *et al.*, 2010) e em seguida foram submetidas à etapa de trituração (aprox. 28 mesh).

Para garantir uma melhor conservação, a amostra de erva-mate foi embalada à vácuo em sacos de polietileno de alta densidade (embaladora a vácuo Selovac, modelo 200 B) e armazenada em freezer a -18 °C até o momento do preparo das infusões utilizadas nas análises fitoquímicas e no estudo clínico.

A infusão (100 mg/mL) foi preparada com água quente (80 °C), posteriormente filtrada e resfriada. Foi avaliado o efeito do tempo de infusão (2,5 min.; 5,0 min. e 10 min.) e o efeito do volume de água (50 mL; 100 mL e 300 mL), para a extração de fenóis totais e para a atividade quelante contra o ferro, e assim, foi definida a forma de preparo da infusão para o estudo clínico. Nessa etapa, para definir a forma de preparo, todas as infusões foram preparadas em Becker de vidro com igual capacidade, em triplicata e com água ultrapura a 80 °C. Após 10 minutos de contato das folhas com a água, a temperatura final também foi medida. A investigação do efeito do volume de água no preparo da infusão, ocorreu respeitando sempre a mesma proporção de folhas/água, no caso 100 mg/mL: 5 g/50 mL; 10 g/100 mL e 30 g/300 mL. Normalmente, ao preparar uma infusão para uma pessoa, utiliza-se 300 mL de água ou menos e existe o hábito de preparar infusões de erva-mate com diversas proporções de m/v, desde 8 - 20 mg/mL a 277 - 450 mg/mL (GEBARA *et al.*, 2017; PAGLIOSA *et al.*, 2009, 2010b; DA SILVEIRA *et al.*, 2014, 2016). No presente estudo foi utilizado 100 mg/mL por ser uma

concentração intermediária ao habitual para o consumo. O teor de sólidos solúveis nas infusões foi determinado por método gravimétrico (ASTILL *et al.*, 2001).

4.1.1.2 Compostos fenólicos totais em infusão de folhas de erva-mate

O teor de compostos fenólicos totais das infusões foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). Os compostos fenólicos presentes em diluições apropriadas de infusões de erva-mate foram oxidados pelo reagente Folin-Ciocalteu e a reação foi neutralizada com carbonato de sódio. A absorbância de cor azul resultante foi medida em 725 nm após 60 minutos (espectrofotômetro Spectrum SP2000 - Xangai, China). Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido clorogênico por mL de infusão. Para a quantificação dos compostos fenólicos, foi construída curva de calibração utilizando ácido clorogênico, concentrações de 7,8 a 500 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 = 0,99$).

4.1.1.3 Atividade quelante contra o ferro em infusão de folhas de erva-mate

A atividade quelante da erva-mate foi avaliada espectrofotometricamente em microplaca (Epoch Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA), segundo Dinis *et al.* (1994). Alíquotas de infusão de erva-mate (20 μL) foram adicionadas à solução de acetato de amônio 10% (250 μL) e à solução de sulfato ferroso 2 mM (15 μL). A reação foi iniciada com a adição de 5 mM de ferrozina (15 μL) e posteriormente, a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. A absorbância do complexo ferro-ferrozina foi medida em 562 nm e a percentagem de inibição da formação do complexo ferrozina- Fe^{+2} foi obtida pela fórmula: $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ (A_0 , absorbância do controle e A_1 , absorbância na presença de infusão de erva-mate). O controle continha todos os reagentes, exceto a infusão de erva-mate. O ácido diamino-tetra-acético sódico (Na_2 -EDTA) foi utilizado como controle positivo (200 mg/mL).

4.1.1.4 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos da infusão de folhas erva-mate para o estudo clínico

Após o preparo da infusão, alíquotas com concentração final de 1 mg/mL (m/v) foram centrifugadas (1 g x 10 min., 25 °C), filtradas com membrana (0,45 μ da marca Merck Millipor (USA)) e submetidas à análise de cromatografia líquida de alta eficiência, conforme metodologia de Farah *et al.* (2005), com modificações (ALVES, 2006). Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, CLAE (Shimadzu LC-10) equipado com coluna de fase reversa (Supelco C_{18} , 4,6 mm \varnothing x 250 mm, 5 μm) e pré-coluna Phenomenex C_{18} (4 mm \varnothing x 2 mm, 5 μ) em equipamento com injetor automático, conectado a degaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A e detector UV-visível (Shimadzu DAD SPD-M20A, \wedge 280 nm e \wedge 325 nm). Os compostos fenólicos foram

eluídos em gradiente linear: 0,01 min. (Fase A 100% v/v); 15 min. (Fase A 80% e Fase B 20% v/v); 25 min. (Fase A 80% e Fase B 20% v/v) e 30 min. (Fase A 100% v/v). Fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A fase A foi composta da mistura de ácido cítrico 10 mM e ácido clorídrico 6 N, pH 2,5 e metanol (4:1, v/v) e a fase B foi composta de metanol. O volume injetado foi de 20 µg/mL de amostra.

A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção dos padrões externos. A quantificação foi realizada com base nas curvas de calibração construídas para cada composto identificado na infusão (r^2 , de 0,99). Os padrões de ácidos fenólicos utilizados foram o 3-cafeoilquínico (3-CQA), 4-cafeoilquínico (4-CQA), 5-cafeoilquínico (5-CQA), 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) e 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA). Os resultados foram expressos em µg/mL da infusão de folhas de erva-mate. Um estudo *in silico* foi aplicado com o emprego do software PassOnline (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) (SRINIVAS *et al.*, 2014), para verificar se os ácidos cafeoilquínicos identificados na presente infusão de folhas de erva-mate, seriam possíveis candidatos para a complexação com o ferro.

4.1.1.5 Estabilidade da concentração de compostos fenólicos e do percentual de atividade quelante contra o ferro na infusão de folhas de erva-mate para o estudo clínico

A infusão de erva-mate que apresentou a maior extração de compostos fenólicos e atividade quelante contra o ferro, foi a utilizada para avaliar a estabilidade. Ocorreu a avaliação da estabilidade da quantidade de fenóis totais, dos principais ácidos fenólicos identificados e do percentual de atividade quelante contra o ferro. As infusões de erva-mate foram divididas em três alíquotas e analisadas imediatamente e após 24 h de armazenamento à temperatura ambiente (25 °C) ou sob refrigeração (8 °C), para avaliar se haveria ou não redução significativa dos compostos e da ação quelante contra o ferro (NISHIYAMA *et al.*, 2010).

Todos os reagentes utilizados para as análises fitoquímicas foram de grau analítico ou cromatográfico. Todas as análises ocorreram em triplicata.

4.1.2 Estudo clínico, randomizado, controlado e cruzado

4.1.2.1 Local e população em estudo

O estudo foi conduzido na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizada na cidade de Florianópolis. A população estudada foi composta por adultos portadores de hemocromatose hereditária (tanto homocigotos quanto heterocigotos) com mutação para o gene *HFE*, acompanhados em Florianópolis pelo Ambulatório do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Santa Catarina (HEMOSC) ou

pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC).

4.1.2.2 Cálculo do tamanho da amostra e processo de amostragem

O número mínimo de indivíduos na amostra necessários para detectar diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi determinado assumindo um poder de teste de 0,80. Para o cálculo foi considerada redução esperada de 20% na absorção de ferro alimentar e desvio-padrão de 17%, considerando os valores para a área sob a curva de ferro sérico (AUC). O tamanho mínimo da amostra estimado foi de, pelo menos, doze indivíduos por grupo (HUTCHINSON *et al.*, 2010), sendo que os mesmos indivíduos passaram pelos três tipos de tratamento, denominados "grupo"(estudo cruzado). Tendo em vista possíveis perdas e desistências, foi considerado acréscimo de 20% (MIOT, 2011), totalizando 14 indivíduos por tratamento (grupo).

Para o estudo, utilizou-se de amostragem intencional (Apêndice C), apresentando os seguintes critérios de inclusão: serem adultos com HH para o gene *HFE* em fase de manutenção, ausência de anemia (hemoglobina e hematócrito dentro dos valores de referência: hemoglobina para o sexo masculino 13,2 a 18,0 g/dl e para o sexo feminino 11,5 a 16,5 g/dl; hematócrito para o sexo masculino 39,0 a 51,0% e para o sexo feminino 36,0 a 48,0%), intervalo mínimo de 1 mês da última flebotomia, ausência do uso de medicação que possa afetar o metabolismo do ferro e estar de acordo para o consumo da refeição oferecida nos dias de intervenção. Os critérios de exclusão foram a idade inferior a 19 anos, o uso de substâncias quelantes 24 horas antes do estudo, infecção aguda ou crônica, diagnóstico de câncer, hemocromatose secundária (o que também incluem portadores da síndrome da sobrecarga de ferro dismetabólica), alterações em enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), alteração na concentração de proteína C reativa e mulheres na fase menstrual do ciclo ou em tratamento com estrogênio (HURRELL *et al.*, 1999; HUTCHINSON *et al.*, 2010).

4.1.2.3 Delineamento do estudo

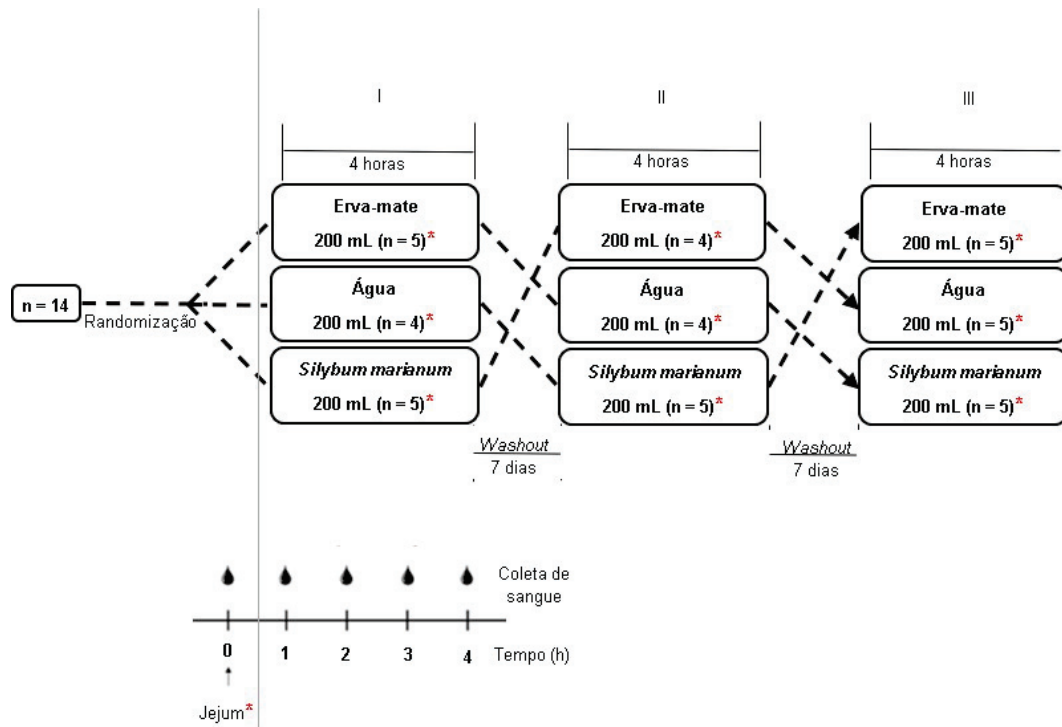
O estudo foi conduzido em duas partes, sendo a primeira parte um estudo piloto com três voluntários adultos considerados saudáveis, uma mulher e dois homens sem diagnóstico para HH (Dois estudantes e um servidor da Universidade Federal de Santa Catarina), a fim de obter resultados preliminares e verificar a necessidade ou não de ajustes no delineamento experimental. Na segunda parte, foi realizado o estudo de intervenção com os 14 portadores de HH para o gene *HFE*. Como o estudo preliminar mostrou a não necessidade de ajustes, o estudo com os portadores de HH ocorreu nos mesmos moldes, seguindo o mesmo protocolo experimental, sendo avaliados os mesmos desfechos e com o mesmo tempo de intervenção.

Os voluntários foram distribuídos de forma randomizada quanto ao consumo das bebidas e consumiram 200 mL de infusão de folhas de erva-mate (preparada com 300 mL de água à temperatura de 80 ± 1 °C e em contato com 30 g de folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. por 10 minutos), 200 mL de água (controle negativo) ou 200 mL de água com a suspensão de *Silybum marianum* com 140 mg de silibina (14 mL Legalon®; controle positivo) (HUTCHINSON *et al.*, 2010). Ou seja, considerando que foi realizado um estudo cruzado de três braços, todos os voluntários passaram pelas três bebidas (erva-mate, água e *Silybum marianum*). Entre a ingestão de cada bebida foi mantido um período de sete dias de *washout* (HUTCHINSON *et al.*, 2007). A randomização foi realizada com o auxílio do programa *Latin square generator* (<http://hamsterandwheel.com/>), de acordo com o método quadrado Latino (3x3), três bebidas e três períodos de intervenção para cada participante (SOUSA *et al.*, 2007). Os indivíduos, após serem identificados numericamente foram designados para um dos três grupos de tratamento em cada dia de intervenção (exemplo: infusão de folhas de erva-mate = A; água = B; *Silybum marianum* = C), conforme a sequência aleatória obtida. Na Figura 9 é possível observar a representação esquemática do desenho do estudo clínico, randomizado, controlado e cruzado.

Os participantes iniciaram a intervenção entre 07h30min. e 08h00min. da manhã, tendo os mesmos, antes permanecido em jejum de 10 a 12 h e sem a ingestão de água após a meia-noite do dia anterior à intervenção. No dia anterior ao estudo mantiveram o seu hábito alimentar, porém sem o consumo de bebidas alcoólicas, café, chimarrão, chá mate, chá preto, chá verde, extrato de (*Silybum marianum*), refrigerantes, açafrão da terra (*Curcuma longa*), bem como sem o consumo de medicamentos que possam afetar a absorção de ferro (antiácidos, suplemento de cálcio, suplemento de zinco, cloranfenicol, alopurinol, vitamina E, ácido ascórbico (vitamina C) e medicamentos quelantes contra o ferro). Os participantes foram orientados para terem uma boa noite de sono, ficaram sem praticar exercícios físicos na manhã do estudo e no dia consumiram toda a preparação alimentar servida (HOPPE *et al.*, 2004; CONWAY, R. E. *et al.*, 2006; HUTCHINSON *et al.*, 2010). Todos os participantes foram orientados, verbalmente e por escrito, sobre o dia da intervenção e protocolo a seguir no dia anterior (Apêndice D).

Na manhã do estudo, os participantes permaneceram sentados por 15 min. para regular o fluxo sanguíneo de repouso. Em seguida, amostras de 4 mL (um tubo de coleta para soro) de sangue venoso periférico foram coletadas, por técnico laboratorial habilitado, em jejum e após 1, 2, 3 e 4 h da ingestão da refeição padronizada contendo 10 mg de sulfato ferroso (Essential Pharma®, Santa Catarina, Brasil) e cada um dos tratamentos: infusão de folhas de erva-mate, água ou suspensão de *Silybum marianum* (Legalon®, silibina 140 mg, comercializado sob licença de Rottapharm/Madaus, Dublin, Irlanda e registrado no Brasil para comercialização por Maylan Laboratory Ltda, RJ,

Figura 9 – Representação esquemática do desenho do estudo clínico, randomizado, controlado e cruzado.



I = primeiro dia de intervenção; II = segundo dia de intervenção; III = terceiro dia de intervenção. *Coleta de sangue: jejum e após 1 h, 2 h, 3 h e 4 h do consumo da refeição padronizada, seguido da ingestão do tratamento (erva-mate ou água ou *Silybum marianum*.) A infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) e a solução com suspensão de *Silybum marianum* foram preparados no dia da intervenção. A refeição padronizada continha 11,36 mg de ferro não heme (1,36 mg intrínseco, mais 10 mg extrínseco na forma de ion ferroso (Fe^{+2})).

Fonte: A autora, 2021.

Brasil.) (HUTCHINSON *et al.*, 2010). Os pacientes esperavam consumir uma das três bebidas, mas desconheciam qual delas iriam consumir em cada dia de teste. Para cada participante, ocorreu um total de 5 coletas de sangue por manhã de intervenção. Cada amostra de sangue, devidamente codificada, foi centrifugada (1000 x g, 10 min., a 4°C) para a obtenção do soro. As análises foram imediatamente realizadas por um profissional independente e cegado (o mesmo desconhecia a decodificação para cada amostra) e o ferro sérico foi determinado de acordo com o método colorimétrico Ferrozine em equipamento automatizado (Dimension RXL Max – Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Deerfield, IL, USA), minimizando o risco de viés para os resultados (devido ao cegamento e pela análise de ferro sérico não ter ocorrido por teste manual).

A refeição padronizada foi elaborada na noite anterior ao estudo e armazenada sob refrigeração. A mesma consistiu em um purê de batata (batata inglesa, óleo de girassol e sal), com um total de 365 kcal; 20 g de gorduras totais; 4,2 g de proteínas, 42 g carboidratos, com base na tabela brasileira de composição de alimentos, TACO

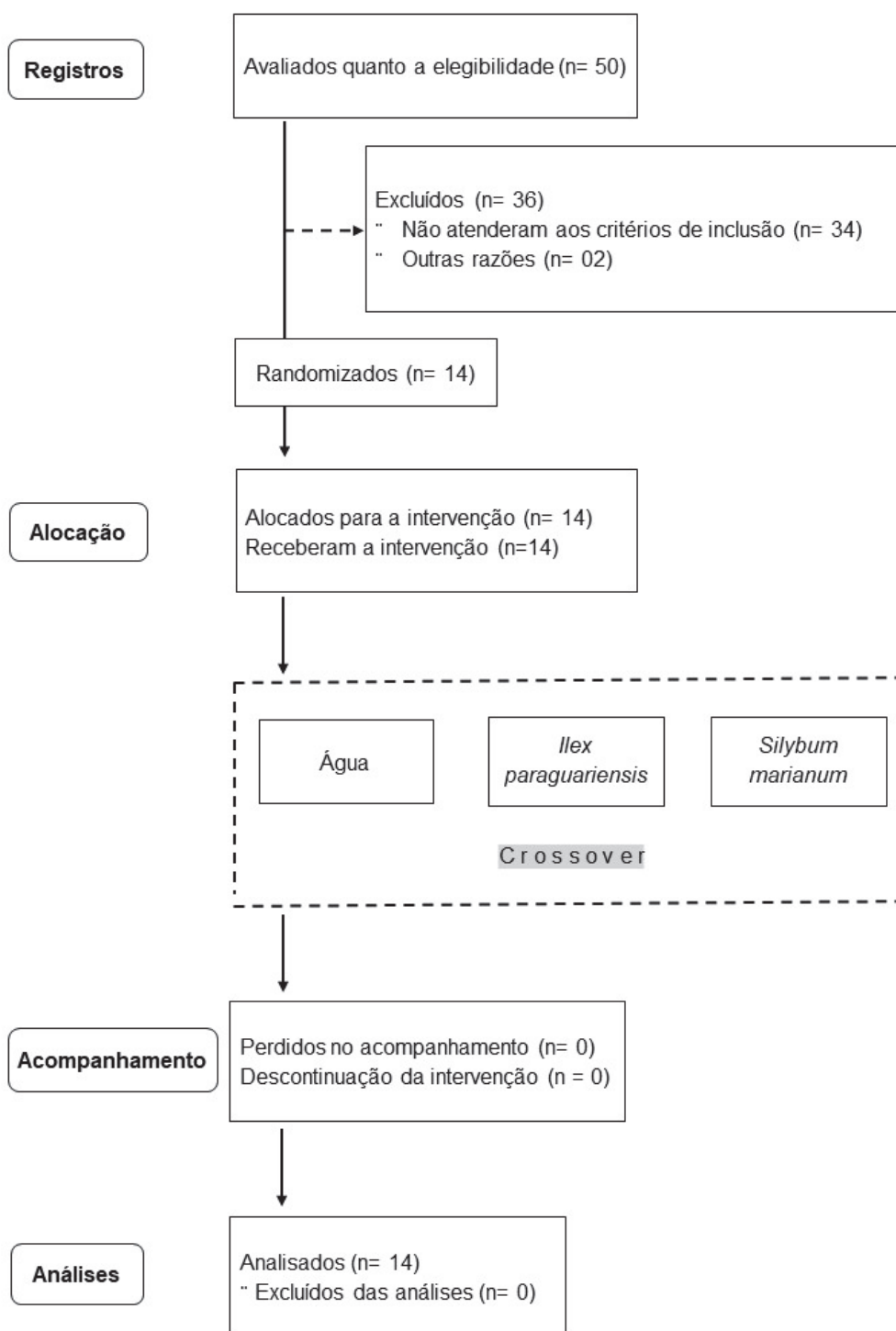
(LIMA *et al.*, 2011) e 11,4 mg de ferro não heme (AOAC, 2016) (1,4 mg de ferro endógeno e 10 mg de ferro ferroso Essential Pharma®). O sulfato ferroso foi adicionado à preparação após reaquecimento em forno de micro-ondas e imediatamente antes de servir. Durante o período de 4 h após a refeição, os participantes permaneceram sentados e foi permitido o consumo de água, apenas. A preparação padronizada foi consumida, dentro de um período máximo de 15 minutos, seguido dos diferentes tratamentos: a) 200 mL de infusão de folhas de erva-mate; b) 200 mL de água e; c) 200 mL água contendo suspensão de *Silybum marianum* (HOPPE *et al.*, 2004; CONWAY, R. E. *et al.*, 2006; HUTCHINSON *et al.*, 2010) (Figura 9). Nenhum efeito colateral foi relatado pelos participantes, quando questionados diretamente, após o consumo da infusão de erva-mate, pois pessoas sensíveis aos componentes dessa planta podem sentir irritação gástrica, tremores, insônia ou irritabilidade.

Cinquenta portadores de HH se voluntariaram para participar da pesquisa. Desse, 16 preencheram todos os critérios e foram incluídos na amostra. Ao longo do estudo, dois indivíduos desistiram da participação por razões pessoais. O fluxo de participantes durante o estudo está representado na Figura 10. A intervenção seguiu os passos preconizados pelo CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*), que fornece uma lista de checagem composta de um conjunto mínimo de recomendações para relatar o desenho, análise e resultados de um ensaio clínico randomizado (MOHER *et al.*, 2010).

Para a caracterização biodemográfica e clínica dos participantes, foram utilizadas informações existentes nos prontuários do banco de dados do HEMOSC e do HU-UFSC quanto à idade; sexo; data do diagnóstico para HH; tipo de mutação; concentração de ferritina sérica na data do diagnóstico e no último exame e o número de flebotomias/ano até alcançar a fase de manutenção. Também foram obtidas informações sobre o volume da última flebotomia; o uso ou não de substâncias quelantes (sintéticas ou naturais) contra o ferro; a presença ou não de outras doenças; a alteração ou não no hábito alimentar após o diagnóstico; o hábito ou não de consumir erva-mate; o consumo ou não de bebidas alcoólicas e o hábito ou não de fumar; como pode ser observado no Apêndice C.

Além disto, foram realizados os seguintes exames bioquímicos e hematológicos: concentração de ferritina sérica, índice de saturação de transferrina, ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro (CLTF), hemoglobina, hematócrito, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e proteína C reativa ultra sensível (PCR-us) para a caracterização do grupo. No primeiro dia do estudo foram, ainda, aferidos o peso e a altura para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), segundo Organização Mundial da Saúde (WHO, 1995). Em cada fase da intervenção foi aplicado, por profissional treinado, o Recordatório Alimentar do dia anterior (CONWAY, J. M. *et al.*, 2003) para verificar o seguimento das orientações de ingestão. Desde que

Figura 10 – Fluxo de participantes durante o estudo.



Fonte: A autora, 2021 (conforme CONSORT 2010).

seguissem as orientações, os participantes puderam seguir os seus hábitos alimentares.

4.2 PROCESSO DE COLETA DE DADOS

A coleta de dados para a triagem dos candidatos ocorreu no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Santa Catarina - HEMOSC e no Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina - HU-UFSC.

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose no Departamento de Análises Clínicas, UFSC e no Hospital Universitário da UFSC. As bebidas (infusão de folhas de erva-mate, água com suspensão de *Silybum marianum* e água) e a preparação alimentar padronizada foram elaboradas no Laboratório de Técnica Dietética, Departamento de Nutrição - UFSC e em sala anexa ao referido laboratório, ocorreu a coleta das amostras de sangue. O soro, como mencionado anteriormente, foi obtido com a centrifugação das amostras de sangue (1000 x g, 10 min., 4 °C) e as amostras obtidas foram imediatamente analisadas. Alíquotas foram transferidas e armazenadas em microtubos (Eppendorf Safe-Lock®) a -80 °C, caso houvesse a necessidade de uma análise posterior.

4.2.1 Refeição padronizada e infusão de folhas de erva-mate com concentração de ferro conhecida

Para o presente estudo clínico, foi escolhido servir um purê de batata por ser uma refeição com baixa concentração de compostos fitoquímicos, evitando assim, a interferência da preparação na absorção do ferro adicionado (10 mg de ferro elementar, na forma de sulfato ferroso), adquirido da empresa Essential Nutrition® (HOPPE *et al.*, 2004; CONWAY, R. E. *et al.*, 2006; HUTCHINSON *et al.*, 2010). A preparação foi elaborada sempre do mesmo modo e utilizando utensílios de vidro e de plástico descartável para evitar a contaminação por metais. Os ingredientes foram sempre da mesma procedência.

As concentrações de ferro, na refeição servida aos participantes do estudo (ferro intrínseco, mais o ferro elementar adicionado) e na infusão de folhas de erva-mate, foram determinadas por análise química, segundo a metodologia 944.02a da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2016). A análise ocorreu em triplicata, a partir da digestão ácida das cinzas seguida pela análise em espectrofotometria de absorção atômica (Perkin-Elmer Analyst 300).

Os demais nutrientes da refeição padronizada (gordura total, proteínas e carboidrato total) e a quantidade de calorias foram determinados com o uso do software Dietpro® com base na tabela brasileira de composição de alimentos (LIMA *et al.*, 2011).

Deste modo, a refeição padronizada que foi consumida pelos participantes apresentou a concentração de calorias, macronutrientes e de ferro, que foram descritos no item 4.1.2.3: 365 kcal, 20 g de gorduras totais, 4,2 g de proteínas, 42 g carboidratos e $11,4 \pm 0,26$ mg de ferro não heme. Enquanto a infusão de folhas de erva-mate apresentou $0,330 \pm 0,06$ mg/200 mL de ferro.

Para o preparo das infusões de folhas de erva-mate e para a diluição da suspensão de *Silybum marianum*, também foram utilizados unicamente utensílios de vidro e/ou de plástico descartável para evitar a contaminação por metais, mais especificadamente, por ferro.

4.2.2 Parâmetros bioquímicos séricos e hematológicos

4.2.2.1 Variáveis bioquímicas séricas e hematológicas

Foram realizados exames laboratoriais bioquímicos e hematológicos para a caracterização do grupo de estudo: ferritina sérica, índice de saturação de transferrina, capacidade total de ligação do ferro, hemoglobina e hematócrito, proteína C reativa ultra-sensível e as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

A determinação da concentração sérica de ferritina foi realizada por método imunoturbidimétrico enzimático, utilizando partículas de dióxido de cromo revestidas com anticorpos monoclonais específicos para ferritina e um reagente conjugado, formando um complexo partícula/ferritina/conjugado. O reagente conjugado do complexo foi combinado a um substrato cromogênico, que ao hidrolisar liberou um cromóforo, permitindo assim, a determinação da concentração de ferritina sérica no soro. A análise foi realizada com o uso de reagentes obtidos da empresa Siemens (Siemens Healthcare Diagnostic Inc - EUA) em analisador automatizado (Dimension RXL Max Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Deerfield, IL, USA), segundo as instruções do fabricante.

Para determinar a concentração de ferro sérico, os íons férrico foram dissociados da transferrina por ação de um tampão de pH ácido e reduzidos a íons ferroso, que formam um complexo de cor azul com o sal dissódico do Ferene®. Por técnica bicromática ocorreu a leitura da quantidade de ferro na amostra de soro. A análise foi realizada com o uso de reagentes obtidos da empresa Siemens (Siemens Healthcare Diagnostic Inc - EUA) em analisador automatizado (Dimension RXL Max Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Deerfield, IL, USA), segundo as instruções do fabricante.

A capacidade total de ligação do ferro foi determinada com a adição de uma quantidade saturante de ferro à amostra, com o objetivo de saturar os sítios de ligações da transferrina. O excesso de ferro não ligado foi determinado por fotometria. O ferro ligado à transferrina foi, então, liberado com a adição de ácido ascórbico, para em seguida ser analisado com o acréscimo do cromogênio Ferene®. Através dessa

metodologia e juntamente com a medida do ferro sérico foi possível calcular a capacidade total de ligação do ferro e também o índice de saturação da transferrina (IST). A análise foi realizada com o uso de reagentes obtidos da empresa Siemens (Siemens Healthcare Diagnostic Inc - EUA) em analisador automatizado (Dimension RXL Max Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Deerfield, IL, USA), segundo as instruções do fabricante.

Para a determinação da concentração de hemoglobina e hematócrito foi utilizado um analisador hematológico automatizado (Sysmex XE-2100D, Sysmex Corporation, Kobe, Japão).

A proteína C reativa ultra-sensível (PCR-us) foi quantificada por imunonefelometria com o uso de anticorpos monoclonais específicos, em aparelho automatizado Nefelômetro Behring BN II (Siemens Healthcare Diagnostics Products GMBH - Alemanha), utilização de reagentes Siemens Healthcare Diagnostic Inc - EUA e conforme as instruções do fabricante.

As enzimas, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas pela metodologia cinética-UV, com o uso de reagentes obtidos da empresa Siemens (Siemens Healthcare Diagnostic Inc - EUA) e as análises realizadas em equipamento automatizado Dimension (Dimension RXL Max Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Deerfield, IL, USA), segundo as instruções do fabricante.

4.2.2.2 Efeito da infusão de folhas de erva-mate na absorção do ferro

A absorção do ferro foi estimada com base na concentração de ferro sérico após o consumo da refeição padronizada, que continha 1,4 mg de ferro não heme intrínseco e 10 mg de ferro extrínseco (Fe^{+2}) na forma de sulfato ferroso, com base em métodos validados para seres humanos (HOPPE *et al.*, 2004; CONWAY, R. E. *et al.*, 2006; HUTCHINSON *et al.*, 2007, 2010).

As amostras de sangue foram coletadas antes (tempo 0) e após 1, 2, 3 e 4 h e a concentração de ferro foi quantificada utilizando o método espectrofotométrico descrito no item 4.2.2.1. Os indicadores para a absorção do ferro sérico foram determinados por parâmetros derivados das curvas de ferro sérico (corrigidos pelo valor de ferro sérico basal de cada indivíduo): (1) cálculo da área sob a curva de ferro sérico (AUC) pelo período de 4 h (AUC_{0-4}); (2) pico máximo de absorção do ferro, Δ_{max} e (3) percentual de recuperação do ferro no pico máximo, $\%Fe_{max}$. O $\%Fe_{max}$ foi calculado com base na fórmula de Henley (1956) mostrada na equação 1.

$$\%Fe_{max} = \frac{\Delta_{max} \times VP}{TFI} \times 100 \quad (1)$$

Sendo necessário, primeiramente, determinar o volume de plasma (VP) de cada participante com a equação 2.

$$VP = \frac{VS \times (1 - Ht)}{1000} \quad (2)$$

Onde:

VP = volume de plasma em L

VS = volume de sangue em mL

(estimado considerando que em humanos temos $69,6 mL/kg$ de massa corporal, segundo Lentner (1984))

Ht = hematócrito em número decimal

TFI = Total de ferro ingerido em μmol

Δ_{max} em $\mu mol/mL$

Todos os reagentes para as análises bioquímicas foram de grau analítico ou cromatográfico.

4.3 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UFSC (número CAAE: 64252017.2.0000.0121). Apenas os indivíduos selecionados e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), participaram do estudo. O parecer substanciado do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos e o TCLE podem ser visualizados no ANEXO A e no ANEXO B, respectivamente. O ensaio clínico foi registrado na plataforma Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (código RBR-5nrrwc), como pode ser observado no ANEXO C e tem como instituições coparticipantes o HEMOSC e o Serviço de Hemoterapia do HU-UFSC. O estudo está de acordo com as normas para pesquisas com seres humanos - Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

4.4 TRATAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os tratamentos com a infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), o Cardo mariano (*Silybum marianum*) e a água, representam as variáveis independentes do estudo clínico.

Para as análises *in vitro*, as variáveis dependentes foram a atividade quelante contra o ferro da infusão de erva-mate, a concentração de sólidos solúveis, a concentração de fenóis totais e a concentração dos ácidos fenólicos 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA na infusão de folhas de erva-mate.

No estudo clínico as variáveis dependentes analisadas foram os indicadores da absorção do ferro alimentar, AUC_{0-4} , $\%Fe_{max}$ e Δ_{max} .

As variáveis de controle foram a idade; sexo; jejum padronizado; tipo de gene com mutação para HH; tempo desde a última flebotomia; atividade física na manhã da intervenção; consumo de alimentos\bebidas, suplementos e medicamentos

que poderiam interferir na absorção do ferro alimentar (conforme descrito no item 4.1.2.3), variáveis hematológicas e bioquímicas (ferritina sérica, ferro sérico, índice de saturação de transferrina, concentração de hemoglobina, hematócrito, AST, ALT, CTLF e PCR-us), tempo desde o diagnóstico, ferritina sérica ao iniciar o tratamento e número de flebotomias até alcançar a fase de manutenção.

Para o estudo foi considerado como variável interveniente (confundimento), a dieta. Com o objetivo de reduzir o efeito da variável interveniente nos resultados, foi aplicada a randomização para a alocação nos grupos de tratamento.

Os dados contínuos foram descritos como média e desvio-padrão, média e erro padrão da média ou mediana (intervalo interquartil). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi aplicada a transformação logarítmica e repetida a análise de normalidade.

No estudo *in vitro*, para as variáveis que apresentaram distribuição Gaussiana (direta ou após transformação logarítmica), foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Tukey*. Também associações bivariadas foram verificadas através do coeficiente de correlação de *Pearson*.

Referente ao ensaio clínico, o teste *t de Student* ou o teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparar as características basais dos pacientes, estratificadas de acordo com as mutações no gene *HFE* (C282Y/C282Y vs. não C282Y/C282Y) ou níveis séricos de ferritina ($< 50 \mu\text{g/L}$ vs. $> 50 \mu\text{g/L}$). Para a análise de variância de medidas repetidas a um fator (ou *one-way*) (ANOVA-MR) foram aplicados, o pressuposto da simetria composta da matriz de covariâncias e o teste de esfericidade de *Mauchly* para medir a homocedasticidade. A correção de *Greenhouse-Geisser* foi utilizada quando a esfericidade não foi atendida.

A ANOVA-MR foi utilizada para detectar diferenças entre as bebidas (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., água e *Silybum marianum*) para os parâmetros derivados das curvas de ferro sérico para todo o grupo de pacientes; nos pacientes estratificados de acordo com as mutações no gene *HFE* (C282Y/C282Y vs. não C282Y/C282Y) e estratificados segundo a concentração de ferritina sérica ($< 50 \mu\text{g/L}$ vs. $> 50 \mu\text{g/L}$). A ANOVA de medidas repetidas de modelo misto foi aplicada para testar o efeito dos tratamentos (bebidas) (fator intra-indivíduo) e as interações com o tipo de mutação no gene *HFE* ou com a concentração de ferritina sérica (fator entre-indivíduos) para a absorção de ferro. A correção de *Bonferroni* foi utilizada para testes *post hoc* múltiplos em pares.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 20.0 e as diferenças significativas foram estabelecidas ao nível de 5% de significância. A AUC_{0-4} foi calculada a partir da regra do trapézio, usando o programa GraphPad Prism v. 6.01 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO *IN VITRO* COM A INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE E ESTUDO PRELIMINAR *IN VIVO*

Nessa seção serão apresentados os resultados para a atividade quelante contra o ferro e para a concentração de fenóis, considerando o efeito do tempo e do volume de água no preparo da infusão de folhas de erva-mate; a estabilidade na concentração dos compostos fenólicos e da atividade quelante contra o ferro e um estudo preliminar *in vivo* para a absorção do ferro no organismo.

5.1.1 Efeito do tempo de infusão na extração de fenóis totais, sólidos solúveis e na atividade quelante contra o ferro

Ao comparar os tempos de contato das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) com a água, apresentados na Tabela 3, observa-se que para o tempo de 10 min. há um aumento significativo da extração de sólidos solúveis totais ($p < 0,02$) e de fenóis totais na infusão ($p < 0,0001$).

A atividade quelante contra o ferro de 94% foi alcançada com o tempo de infusão, 2,5 min. e com uma significativa elevação para o tempo de extração de 10 min. ($> 99\%$; $p < 0,05$). Esse valor da atividade quelante contra o ferro, próximo a 100%, foi equiparável ao resultado para o controle positivo Na₂EDTA (99,55%; $p > 0,05$), Tabela 3.

Tabela 3 – Efeito do tempo de infusão na extração de sólidos solúveis, de fenóis totais e na atividade quelante contra o ferro de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).

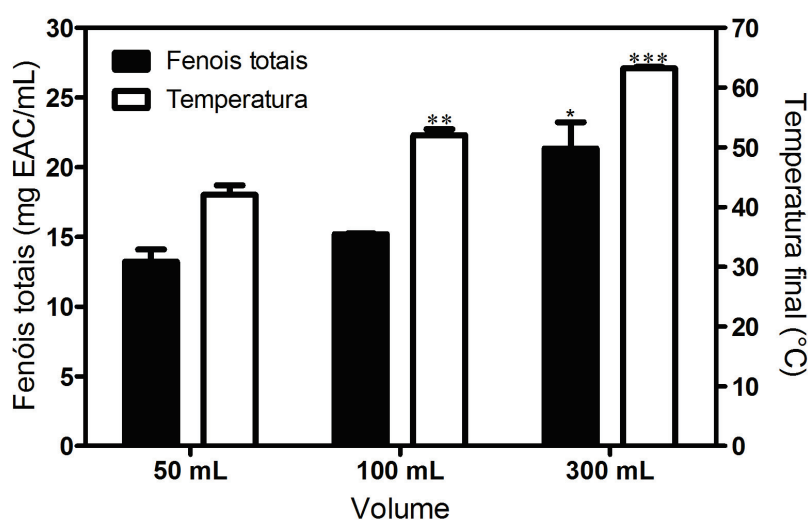
Tempo de infusão (min.)	Sólidos solúveis (mg/mL)*	Fenóis totais (mg EAC/mL)**	Atividade quelante ¹ (%)***
2,5	19,53 ± 0,94 ^a	5,40 ± 0,58 ^a	94,37 ± 1,55 ^a
5,0	23,56 ± 0,98 ^b	7,03 ± 0,65 ^a	97,17 ± 2,24 ^{ab}
10,0	29,24 ± 1,80 ^c	18,48 ± 2,52 ^b	99,06 ± 1,70 ^b
Controle positivo (200mg /mL Na ₂ EDTA)	—	—	99,55 ± 0,20 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão de três determinações em triplicata. Valores médios com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos, *($p < 0,02$); **($p < 0,0001$); ***($p < 0,05$); ANOVA e teste de Tukey. Água ultrapura à 80 ± 1 °C (100 mL) adicionada sobre 10 g de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). EAC, equivalente de ácido clorogênico. ¹Atividade quelante contra o ferro.

5.1.2 Efeito do volume de água para a extração de compostos fenólicos em infusão com folhas de erva-mate

Embora todas as infusões tivessem a mesma proporção, 100 mg/mL e a mesma temperatura inicial da água 80 °C em 10 min. de infusão, a concentração de fenóis totais foi significativamente maior para o volume de água de 300 mL, comparado aos volumes de 50 mL e 100 mL ($p < 0,002$). Além disso, a temperatura final da infusão (após 10 min.) foi significativamente maior ($63,2 \pm 1,0$ °C) para a infusão com 300 mL de água ($p < 0,0001$) (Figura 11).

Figura 11 – Efeito do volume de água para a extração de compostos fenólicos em infusão com folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).



As extrações foram preparadas com a mesma proporção m/v (100 mg/mL): 5 g/50 mL; 10 g/100 mL e 30 g/300 mL. Resultados expressos em média \pm desvio-padrão de três determinações em triplicata. A temperatura inicial para todas as infusões foi de 80 ± 1 °C. ** $p < 0,002$ comparado ao volume de 50 mL, *, *** $p < 0,0001$ comparado ao volume de 50 e 100 mL (ANOVA, teste de Tukey). EAC, equivalente de ácido clorogênico.

Fonte: A autora, 2021.

Com base nos resultados, o modo de preparo da infusão com 300 mL de água quente e em contato com as folhas por 10 min., foi o escolhido para as demais análises *in vitro* e para os ensaios clínicos, por ter alcançado a maior concentração de compostos fenólicos e a máxima atividade quelante contra o ferro (99,06%).

5.1.3 Estabilidade da concentração de fenóis totais e da atividade quelante contra o ferro na infusão de folhas de erva-mate

Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam um significativo decréscimo na concentração de fenóis totais após 24 h, quando comparado ao controle (tempo zero), independente da temperatura de armazenamento (22,5 % a 8 °C e 24,5 % a 25 °C; $p <$

0,05). Também pode-se observar uma redução de até 24,5 % (18,1 para 13,7 mg/mL) na concentração de fenóis totais da infusão com folhas de erva-mate, sem refletir na alteração da sua ação quelante contra o ferro.

Tabela 4 – Estabilidade da concentração de fenóis totais e da atividade quelante contra o ferro em infusão com folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).

Tempo (h)	Fenóis totais (mg EAC/mL)	Atividade quelante ¹ (%)
Zero (controle)	18,11 ± 0,27 ^a	99,38 ± 1,78 ^a
Após 24 h (8 °C)	14,04 ± 0,52 ^b	99,12 ± 1,53 ^a
Após 24 h (25 °C)	13,68 ± 0,89 ^b	100,00 ± 0,00 ^a

Resultados expressos em média ± desvio padrão de três determinações em triplicata. Valores médios com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$). RM-ANOVA e teste de Tukey. Água ultrapura a 80 ± 1 °C (300 mL) adicionada sobre 30 g de folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (100mg /mL). EAC, equivalente de ácido clorogênico. ¹Atividade quelante contra o ferro.

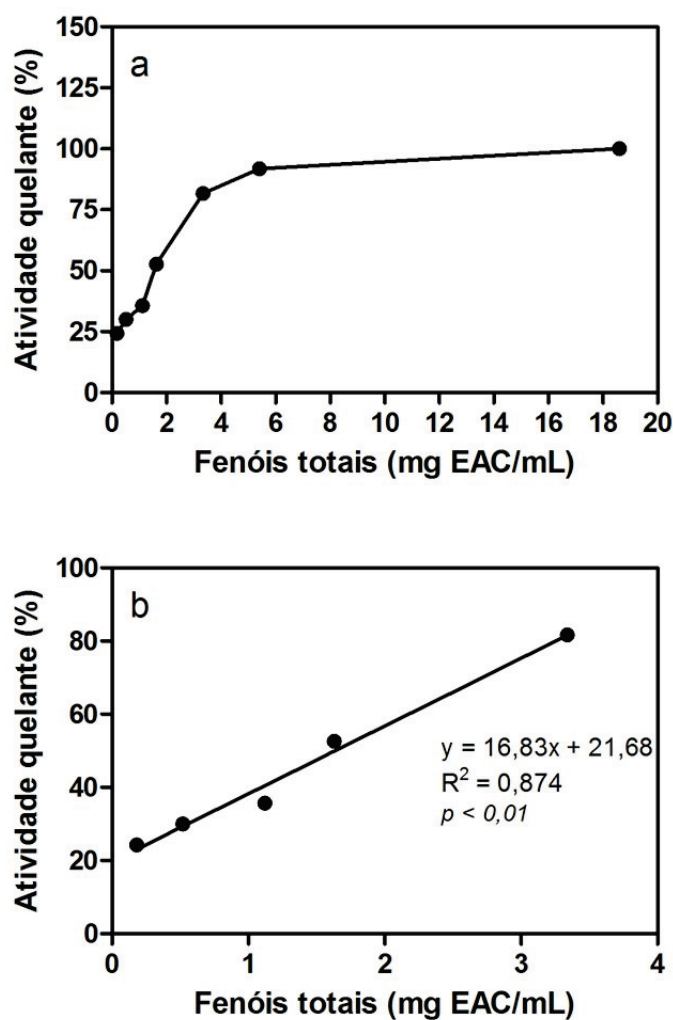
Fonte: A autora, 2021.

A Figura 12a apresenta a relação entre a concentração de fenóis totais (mg EAC/mL) com a atividade quelante contra o ferro (%) de infusões com diferentes concentrações de folhas de erva-mate. Pode-se observar uma saturação do efeito dos compostos fenólicos para a atividade quelante contra o ferro após determinada concentração de fenóis totais (3,34 mg/mL em equivalente de ácido clorogênico). A análise de regressão linear (Figura 12b), revelou uma significativa associação entre fenóis totais e a atividade quelante contra o ferro ($r^2 = 0,87$; $p < 0,01$), para infusões contendo até 3,34 mg EAC/mL ($y = 16,83.x + 21,68$).

5.1.4 Concentração e estabilidade dos ácidos clorogênicos em infusão com folhas de erva-mate

Os ácidos clorogênicos foram identificados e quantificados na infusão preparada com 30 g de folhas da planta para 300 mL de água a 80 °C (100 mg/mL) e com tempo de extração de 10 minutos. O ácido 3-cafeoilquínico foi o encontrado com a maior concentração ($9,99 \pm 0,66$ mg/mL), seguido do ácido 3,5-di-cafeoilquínico ($5,64 \pm 0,26$ mg/mL) ($p < 0,002$). Os ácidos 5-cafeoilquínico ($2,17 \pm 0,27$ mg/mL), 4-cafeoilquínico ($2,45 \pm 0,3$ mg/mL) e 4,5 di-cafeoilquínico ($1,74 \pm 0,19$ mg/mL) apresentaram concentração similar ($p < 0,05$). As concentrações e os tempos de retenção dos respectivos compostos estão apresentados no Apêndice E1. O cromatograma representativo do perfil de ácidos clorogênicos (325 nm) da infusão de folhas de erva-mate, imediatamente após o preparo (tempo zero), encontra-se no Apêndice F1 e os espectros de absorção DAD dos ácidos clorogênicos identificados na infusão, estão no Apêndice G.

Figura 12 – Concentração de fenóis totais (mg EAC/mL) e a atividade quelante contra o ferro (%) de infusões com folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).



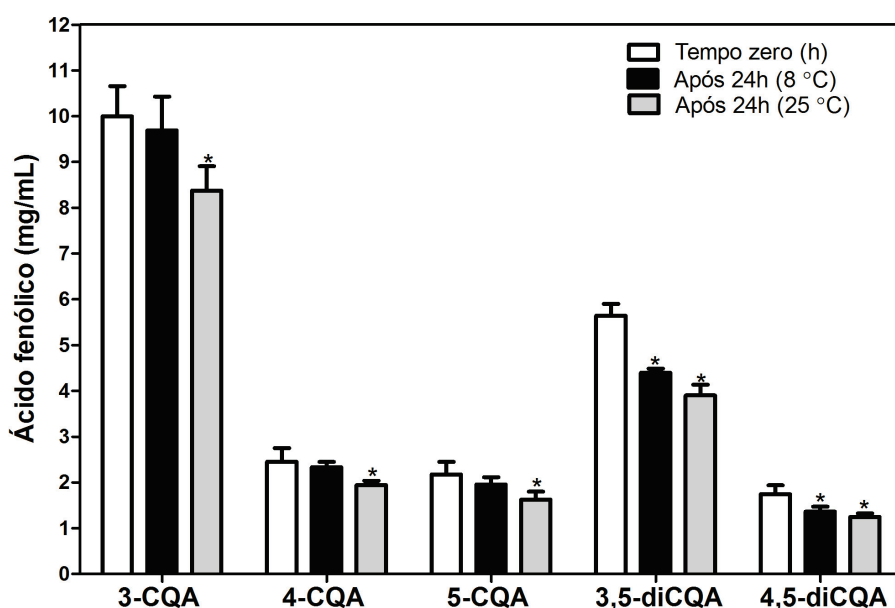
Resultados expressos em média \pm desvio-padrão de três determinações em triplicata. Infusões preparadas com proporções de folha/água entre 2,5-100 mg/mL. (a) associação; (b) regressão linear. EAC, equivalente de ácido clorogênico.

Fonte: A autora, 2021.

Na Figura 13 é possível verificar a estabilidade dos ácidos clorogênicos, de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento. Os três ácidos mono-cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA e 5-CQA) permaneceram com a sua concentração estável a 8 °C por 24 horas. Entretanto, ao comparar o tempo zero com o tempo após 24 h, à temperatura ambiente (25 °C), todos os ácidos mono-cafeoilquínicos apresentaram redução significativa, entre 16,0% e 25,2% ($p < 0,05$).

Para os ácidos di-cafeoilquínicos, independente da temperatura de armazenamento (8 °C e 25 °C), uma significativa redução foi observada após 24h comparado ao tempo zero ($p \leq 0,01$), ácido 3,5-diCQA (entre 21,9% e 30,6%) e para o ácido 4,5-diCQA (entre 21,6% e 27,9%).

Figura 13 – Concentração dos ácidos mono-cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA e 5-CQA) e ácidos di-cafeoilquínicos (3,5-diCQA e 4,5-diCQA) da infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) no tempo zero e após 24h a 8 °C e 25 °C .



Resultados expressos em média \pm desvio padrão de três determinações em triplicata. * $p < 0,05$ comparado ao tempo zero (RM-ANOVA e teste de Tukey). Sem diferença significativa entre 8 °C e 25 °C. Água ultrapura a 80 ± 1 °C (300 mL) adicionada sobre 30 g de folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

Fonte: A autora, 2021.

A comparação após 24 h entre as duas temperaturas (8 °C e 25 °C) não mostrou diferença significativa para o declínio da concentração, tanto de ácidos mono-cafeoilquínicos, quanto de di-cafeoilquínicos ($p > 0,05$). No Apêndice F2 e F3 estão os cromatogramas representativos do perfil de ácidos clorogênicos (325 nm) da infusão de folhas de erva-mate, após 24 h em temperatura de refrigeração (8 °C) e ambiente

(25 °C), enquanto no Apêndice E2, podem ser visualizadas as concentrações dos ácidos fenólicos (mg/mL), identificados na infusão em estudo.

5.1.5 Estudo preliminar *in vivo* do efeito da infusão de folhas de erva-mate na absorção do ferro

Anteriormente à intervenção com os portadores de HH, o mesmo desenho de estudo (ensaio clínico, randomizado, controlado e cruzado), foi realizado com três indivíduos saudáveis. No Apêndice H são apresentadas as características biodemográficas e os parâmetros bioquímicos e hematológicos basais dos participantes. Todos os participantes não apresentavam alterações nas enzimas hepáticas, nos marcadores hematológicos e na concentração de proteína C-reativa.

As curvas de ferro sérico, apresentadas para os três tratamentos (água, infusão de erva-mate e suspensão de *Silybum marianum*) estão na Figura 14 e os parâmetros derivados das curvas de ferro sérico, utilizados como indicadores da absorção do ferro na Tabela 5. Esses resultados, sugeriram que a infusão de folhas de erva-mate tende a promover uma expressiva redução da absorção do ferro. Como pode ser observado na Tabela 5, o consumo da refeição enriquecida com ferro, juntamente com a ingestão de água (controle) apresentou uma concentração de ferro sérico com AUC_{0-4h} de $608,9 \pm 194,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto a ingestão da refeição com a infusão de folhas de erva-mate a concentração de ferro sérico foi menor, com diminuição da AUC_{0-4h} para 1/5 (AUC_{0-4h} $118,4 \pm 51,8 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$). Na suspensão de *Silybum marianum* houve uma redução de apenas 2/3 da AUC_{0-4h} ($391,0 \pm 127,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) quando comparado com a água.

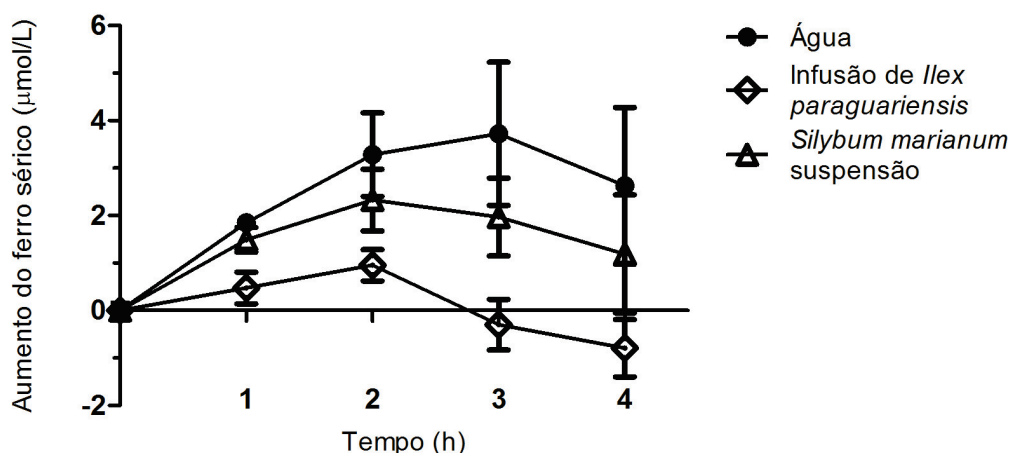
Tabela 5 – Parâmetros derivados das curvas de ferro sérico utilizados como indicadores da absorção do ferro alimentar em pessoas saudáveis (n = 3).

Parâmetros	Água	<i>Silybum marianum</i> suspensão*	<i>Ilex paraguariensis</i> infusão **
AUC_{0-4h} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$)	$608,90 \pm 194,40$	$391,0 \pm 127,2$	$118,40 \pm 51,8$
Δ_{max} ($\mu\text{mol/L}$)	$3,84 \pm 0,75$	$2,5 \pm 0,72$	$0,78 \pm 0,24$
$\%Fe_{max}$ (% no pico máximo)	$5,13 \pm 0,87$	$3,47 \pm 1,03$	$1,11 \pm 0,37$

Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 3). *200 mL de água com suspensão de *Silybum marianum* (Legalon®; 140 mg de silibina) **Infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), preparada na proporção 30 g folhas/300 mL de água com 18,1 mg/mL de fenóis totais. AUC_{0-4h} : área de baixo da curva; Δ_{max} : aumento máximo da absorção de ferro sérico. Teste estatístico não aplicado, devido ao tamanho reduzido da amostra.

Fonte: A autora, 2021.

Figura 14 – Curvas de ferro sérico após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme por adultos saudáveis.



Curvas de ferro sérico em pessoas saudáveis ($n = 03$), após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme (1,4 mg endógeno e 10 mg adicionado na forma de ferro ferroso). Valores de ferro sérico expressos em média \pm desvio-padrão. ● água; Δ suspensão de *Silybum marianum* e \diamond infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). Infusão preparada com 30 g folhas/300 mL água, contendo 18,1 mg/mL de fenóis totais.

Fonte: A autora, 2021.

5.2 EFEITO DA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE, NA ABSORÇÃO DE FERRO EM PORTADORES DE HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA *HFE*

Participaram deste estudo clínico, pacientes com HH *HFE* em fase de manutenção, portadores das mutações homocigoto C282Y/C282Y e heterocigotos (C282Y/H63D ou C282Y/-), e com valores variáveis de ferritina sérica (20-180 $\mu\text{g/L}$) decorrentes das condutas clínicas estabelecidas para cada paciente em fase de manutenção. Dessa forma, considerando possíveis efeitos das variações genéticas e do nível de ferro armazenado no organismo (que pode ser estimado pela concentração de ferritina sérica) sobre a absorção do ferro, no presente estudo os pacientes foram estratificados em C282Y/C282Y e não C282Y/C282Y, e pelo nível de ferritina sérica $< 50 \mu\text{g/L}$ e $\geq 50 \mu\text{g/L}$. O ponto de corte de 50 $\mu\text{g/L}$ foi escolhido com base nos diferentes valores de ferritina sérica encontrados na literatura para pacientes em fase de manutenção $< 50 \mu\text{g/L}$, 50 – 100 $\mu\text{g/L}$ e $< 300 \mu\text{g/L}$ (BACON *et al.*, 2011; BRISSOT *et al.*, 2011; PORTO *et al.*, 2016; POWELL *et al.*, 2016; MILMAN *et al.*, 2019; KOWDLEY *et al.*, 2019).

Os dados biodemográficos e laboratoriais dos 14 participantes que completaram o estudo estão apresentados na Tabela 6. Os pacientes homocigotos (C282Y/C282Y) são mais jovens ($p = 0,003$), assim como aqueles com concentração sérica de ferritina $< 50 \mu\text{g/L}$ ($p = 0,05$). Embora não significativo ($p = 0,064$), o número de flebotomias por

ano, até alcançar a fase de manutenção, foi 66,7% maior nos pacientes C282Y/C282Y comparado aos pacientes do subgrupo C282Y/H63D e C282Y/-. Sendo que a concentração de ferritina sérica no momento do diagnóstico ($\sim 1000,0 \mu\text{g/L}$) não diferiu entre os pacientes, independentemente do subgrupo. Os demais parâmetros basais também foram similares para os pacientes, quando categorizados pelo tipo de mutação no gene *HFE* e pela concentração de ferritina sérica ($p > 0,05$), exceto, como esperado o valor de ferritina sérica, para os subgrupos estratificados pelo nível de ferritina.

Tabela 6 – Características biodemográficas e parâmetros laboratoriais dos portadores de HH-HFE (n = 14).

Parâmetros	HH-HFE	Mutações do gene HFE		Ferritina sérica
	n = 14	Homozigoto C282Y/C282Y (n=09)	Heterozigoto C282Y/H63D e C282Y/- (n=05) ^a	> 50µg/l (n=09) < 50µg/l (n=05) ^b
Idade (anos)	52,4 ± 3,3	45,8 ± 3,4	64,2 ± 1,9*	57,1 ± 3,6 43,8 ± 4,9**
Hemoglobina (g/L)	144,4 ± 4,0	144,7 ± 5,9	143,0 ± 3,0	146,0 ± 4,0 140,6 ± 8,7
Hematócrito (%)	42,4 ± 0,9	41,9 ± 1,3	43,2 ± 0,5	43,4 ± 1,0 40,5 ± 1,4
Ferritina sérica (µg/L)	76,2 ± 13,8	68,9 ± 20,6	89,3 ± 10,8	103,4 ± 14,4 27,3 ± 6,5*
Ferro sérico (µmol/L)	22,9 ± 2,8	23,6 (17,1)	19,5 (14,0)	26,1 ± 3,5 17,1 ± 3,9
CTLF (µmol/L)	52,5 ± 2,6	53,0 (17,0)	46,2 (20,1)	53,8 ± 2,9 50,2 ± 5,4
IST (%)	40,7 ± 5,2	43,3 ± 7,9	36,0 ± 2,5	46,8 ± 6,6 29,8 ± 6,2
AST (U/L)	26,6 ± 2,9	27,3 ± 3,0	25,4 ± 6,3	25,4 ± 3,5 28,8 ± 5,3
ALT (U/L)	35,4 ± 4,4	36,2 ± 6,3	34,0 ± 5,8	32,3 ± 4,9 41,0 ± 8,7
PCR-us (mg/L)	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,6 ± 0,3 1,9 ± 0,5
IMC (kg/m ²)	29,4 ± 1,6	28,4 ± 1,2	31,1 ± 4,0	31,1 ± 2,1 26,3 ± 1,5
Tempo desde o diagnóstico (anos)	5,14 ± 1,3	5,0(10,9)	2,3(2,0)	3,0(9,7) 1,2(5,2)
Ferritina sérica (µg/L) ao iniciar tratamento	1008,0 ± 127,7	1012,2 ± 194,3	1005,0 ± 112,3	1019,5 ± 129,9 987,3 ± 296,0
Número de flebotomias/ano ^c	11,5 ± 1,6	14,0 ± 2,2	8,4 ± 1,0	10,1 ± 1,3 13,7 ± 3,5

Resultados expressos em média ± erro padrão da média ou mediana (intervalo interquartil). HH, hemocromatose hereditária; CTLF, contagem total de ligação do ferro; IST, índice de saturação de transferrina; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; PCR-us, proteína C-reativa ultra-sensível; IMC, Índice de massa corporal. ^aSubgrupo heterozigoto C282Y/H63D e C282Y/-: 04 pacientes heterozigoto composto (C282Y/H63D) e 01 paciente C282Y heterozigoto (C282Y/-). ^b Todos os pacientes C282Y homozigoto (C282Y/C282Y). ^c Número de flebotomias na fase de indução até alcançar a fase de manutenção (≤ 4 flebotomias/ano). * $p \leq 0,003$; ** $p = 0,05$ (Student *t* test).

Fonte: A autora, 2021.

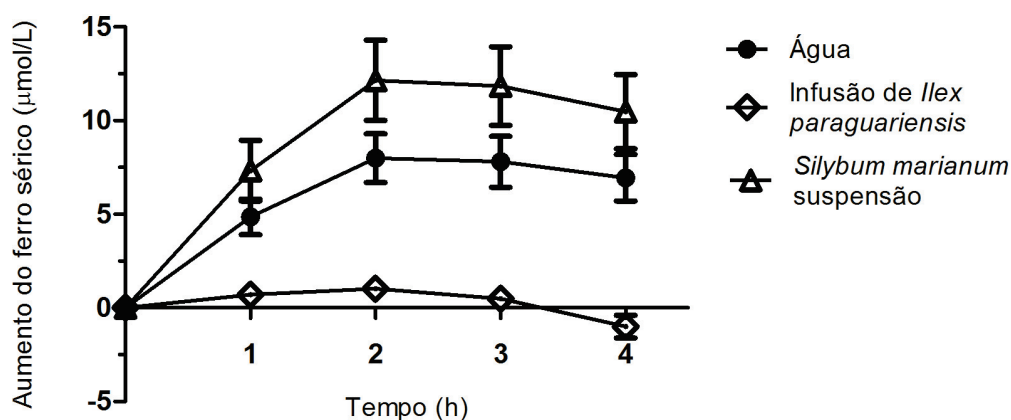
São apresentadas informações complementares sobre as características dos pacientes no Apêndice I, onde pode ser observado que o volume de sangue removido na última flebotomia foi entre 400 a 500 mL; nenhum paciente relatou o hábito de utilizar substâncias quelantes contra o ferro (sintéticas ou naturais) e apenas um apresentava o hábito de fumar. Dois participantes relataram o hábito de consumir bebida à base de erva-mate diariamente (chimarrão) e em horários distantes das refeições. Após o diagnóstico para a HH *HFE*, oito pacientes modificaram o hábito alimentar com a redução do consumo de carnes vermelhas e/ou vegetais verde escuros ou com a redução no consumo de feijão. Nenhum participante mencionou evitar o consumo de alimentos fortificados com ferro. Dentre os quatorze participantes, seis não tinham o hábito de consumir bebidas alcoólicas e os demais afirmaram consumir socialmente.

Na Figura 15 estão apresentadas as curvas de ferro sérico dos pacientes com HH *HFE* para a ingestão de água, da suspensão de *Silybum marianum* e da infusão de folhas de erva-mate. Ao observar os parâmetros derivados das curvas de ferro sérico das três bebidas, AUC_{0-4h} , Δ_{max} e o $\%Fe_{max}$ (Tabela 7), verifica-se que a absorção do ferro foi baixa, com a ingestão da infusão de folhas de erva-mate, sendo significativamente menor que a água ($p \leq 0,001$) e que o *Silybum marianum* ($p \leq 0,001$). Nenhuma diferença significativa ocorreu entre os tratamentos, água e *Silybum marianum* ($p \geq 0,225$).

A diminuição na absorção de ferro pela ingestão da infusão de folhas de erva-mate foi independente da mutação no gene *HFE* (C282Y/C282Y vs. C282Y/H63D ou C282Y/-) e dos níveis de ferritina sérica ($< 50 \mu\text{g/L}$ vs. $> 50 \mu\text{g/L}$), mantendo os valores para a AUC_{0-4h} sempre abaixo de $200 \mu\text{g/L}$, como pode ser observado na Tabela 8. As curvas de ferro sérico para os pacientes estratificados, segundo as mutações do gene *HFE* e as concentrações séricas de ferritina podem ser visualizadas no Apêndice J1 e J2. Os demais parâmetros derivados das curvas de ferro sérico, além da AUC_{0-4h} , estratificados de acordo com o tipo de mutação e a concentração de ferritina sérica estão na Tabela do Apêndice K1 e K2.

Curiosamente, os pacientes com níveis de ferritina sérica $< 50 \mu\text{g/L}$, mostraram um aumento de 2 vezes na absorção de ferro com água ou suspensão de *Silybum marianum*, comparado àqueles com níveis de ferritina sérica $> 50 \mu\text{g/L}$. Esse comportamento resultou em um efeito significativo da ferritina sérica ($p = 0,020$) e um efeito significativo da interação tratamento vs. ferritina ($p = 0,039$; Tabela 8).

Figura 15 – Curvas de ferro sérico após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme por portadores de HH *HFE*.



Curvas de ferro sérico em portadores de hemocromatose hereditária *HFE* (n = 14), após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme (1,4 mg endógeno e 10 mg adicionado na forma de ferro ferroso). Valores de ferro sérico expressos em média \pm desvio-padrão. • água; Δ suspensão de *Silybum marianum* e \diamond infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). Infusão preparada com 30 g folhas/300 mL água, contendo 18,1 mg/mL de fenóis totais.

Fonte: A autora, 2021.

Tabela 7 – Parâmetros derivados das curvas de ferro sérico e utilizados como indicadores da absorção do ferro alimentar em portadores de hemocromatose hereditária (n = 14).

Parâmetros	Água	<i>Silybum marianum</i> suspensão	<i>Ilex paraguariensis</i> infusão*
AUC _{0-4h} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$)	1449,4 \pm 241,5 ^b	2195,2 \pm 399,9 ^b	173,3 \pm 44,7 ^a
Δ_{max} ($\mu\text{mol/L}$)	9,1 \pm 1,4 ^b	12,5 \pm 2,2 ^b	1,3 \pm 0,3 ^a
%Fe _{max} (% no pico máximo)	16,2 \pm 2,6 ^b	21,7 \pm 3,6 ^b	2,4 \pm 0,5 ^a

Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 14). * Infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). Valores médios com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA-MR; $p < 0,05$). Valores de significância foram ajustados pela correção de Bonferroni para múltiplos testes ($p < 0,05$). AUC_{0-4h}: área de baixo da curva; Δ_{max} : aumento máximo da absorção de ferro sérico; %Fe_{max}: percentual de recuperação do ferro no pico máximo.

Fonte: A autora, 2021.

Tabela 8 – Absorção do ferro, de acordo com a mutação no gene *HFE* e a concentração de ferritina sérica.

Tratamentos	Mutações do gene <i>HFE</i>		P*	Ferritina sérica		P*
	AUC _{0-4h} μmol.min ⁻¹ .L ⁻¹	Heterozigoto C282Y/H63D e C282Y/- (n=05)		AUC _{0-4h} μmol.min ⁻¹ .L ⁻¹	>50 μg/L (n=09)	
<i>Ilex paraguariensis</i> ^a	197,5 ± 62,2**	129,8 ± 59,3**	0,409	173,4 ± 46,5**	173,2 ± 66,7 **	0,998
Água	1769,9 ± 325,0	872,5 ± 145,3	0,073	2146,0 ± 402,3	1062,3 ± 223,7	0,024
<i>Silybum marianum</i> (suspensão)	2328,9 ± 487,9	1954,4 ± 759,7	0,672	3247,9 ± 486,9	1610,3 ± 467,6	0,044
p ANOVA	Efeito tratamento	0,000		Efeito tratamento	0,000	
modelo misto	Efeito mutação	0,295		Efeito ferritina sérica	0,020	
	Tratamento × mutação	0,433		Tratamento × ferritina sérica	0,039	

Resultados expressos em média ± erro padrão da média. ANOVA de modelo misto, tratamento (bebidas) como fator intra-indivíduo e mutações no gene *HFE* ou níveis séricos de ferritina como fator entre-indivíduos ($p < 0,05$). * Comparações estabelecidas entre pares para fator entre-indivíduos. ** Comparações estabelecidas entre pares para fator intra-indivíduo com diferença significativa. Valores de significância foram ajustados pela correção de Bonferroni para múltiplos testes ($p < 0,05$). AUC_{0-4h}: parâmetro derivado da curva de ferro sérico, utilizado como indicador de absorção do ferro. ^a Infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Fonte: A autora, 2021.

6 DISCUSSÃO

Essa sessão inicia com as discussões dos resultados *in vitro* para a capacidade da infusão de folhas de erva-mate em quelar o ferro e dos resultados do estudo preliminar *in vivo*. Posteriormente, discute os resultados do ensaio clínico, randomizado, controlado e cruzado com os portadores de HH HFE.

6.1 ATIVIDADE QUELANTE CONTRA O FERRO DA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE EM ESTUDO *IN VITRO* E EM ESTUDO PRELIMINAR *IN VIVO*

Existem plantas com elevada atividade quelante contra o ferro e que têm sido estudadas para auxiliar no tratamento de doenças relacionadas à sobrecarga desse mineral no organismo humano. A atividade quelante parece ser decorrente da ação de determinados compostos fenólicos e da sua concentração na planta (KALTWASSER *et al.*, 1998; IMAM *et al.*, 2017; ORISAKWE *et al.*, 2020).

Os resultados encontrados para o tempo de infusão mostrados na Tabela 3, indicam que a solubilidade em água dos compostos fenólicos da erva-mate dependem de um longo contato das folhas com a água. Esse comportamento está de acordo ao que foi encontrado para o chá mate tostado (DA SILVEIRA *et al.*, 2017) e para a bebida tradicional preparada com folhas e talos de erva-mate, "*chimarrão*" ou "*mate*" (GEBARA *et al.*, 2017). Vale também notar, que as infusões envolvendo folhas de plantas são, normalmente, consumidas após o contato da planta com a água quente por 10 min. ou menos (NISHIYAMA *et al.*, 2010; BAEZA *et al.*, 2018).

Quanto à atividade quelante contra o ferro, a presente pesquisa mostrou um valor considerado elevado na infusão com folhas de erva-mate de 99,06% (Tabela 3). O resultado foi coerente com o estudo de Colpo *et al.* (2016), onde foi constatada uma atividade quelante de aproximadamente 80%, em extrato aquoso de erva-mate preparado na forma de "*chimarrão*".

Somado ao tempo de infusão, os resultados para o modo de preparo sugerem que um maior volume de água na infusão também otimiza a extração dos compostos fenólicos, devido a uma redução menos expressiva da sua temperatura inicial. O efeito é semelhante ao que foi descrito para o chá de *Camellia sinensis* (NISHIYAMA *et al.*, 2010).

Os dados da presente pesquisa também confirmam a elevada solubilidade dos compostos fenólicos da erva-mate em água quente, conforme os achados de Gebara *et al.* (2017). Entretanto, existem evidências para o aumento do risco de câncer, como de esôfago e faringe pelo consumo de bebidas a partir de erva-mate, café e chás, quando em temperatura acima de $> 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (OKARU *et al.*, 2018). Tendo em vista essas considerações e os resultados encontrados, o método de preparo de infusão com folhas de erva-mate em 300 mL de água por 10 min. à temperatura inicial de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, pro-

posto neste trabalho, proporciona uma elevada concentração de compostos fenólicos, máxima atividade quelante contra o ferro e com uma temperatura final, imediatamente após o preparo, que é segura ao consumo (63,2 °C).

Em relação à estabilidade da concentração de fenóis totais, existem estudos com plantas com elevada concentração de ácidos fenólicos, como o café (VICENTE *et al.*, 2014) e a farinha de batata doce diluída em água (TAKENAKA *et al.*, 2006), que relatam ser o oxigênio o fator mais importante para a perda de fenóis totais e que a temperatura também pode contribuir. Na presente pesquisa, o tempo de armazenamento de 24 h teve maior relevância para afetar a estabilidade da concentração de fenóis totais comparado à temperatura, o que sugere a influência do oxigênio durante o período de armazenamento (Tabela 4).

A habilidade em quelar íons de ferro tem sido atribuída a determinados compostos fenólicos, como os ácidos clorogênicos que estão na erva-mate (KONO *et al.*, 1998; TUNTIPOPIPAT *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2018; LOKESH *et al.*, 2018). A estabilidade da atividade quelante contra o ferro encontrada na infusão após 24 h, pode ser explicada pela saturação do efeito dos compostos fenólicos da erva-mate sobre a ação quelante para uma quantidade relativamente baixa desses compostos (Figura 12a). Por outro lado, a análise de regressão linear (Figura 12b) mostrou uma significativa associação entre a concentração de fenóis totais e a atividade quelante contra o ferro para infusões de erva-mate contendo até 3,34 mg EAC / mL de compostos fenólicos, indicando que boa parte da atividade quelante contra o ferro da planta em estudo, poderia ser atribuída ao efeito dos seus compostos fenólicos. Com base nesses resultados pode-se justificar a ausência de uma associação significativa entre a concentração de fenóis totais e a atividade quelante contra o ferro de extratos aquosos de erva-mate reportado por Colpo *et al.* (2016), uma vez que os autores utilizaram extratos com elevada quantidade de compostos fenólicos.

Referente aos ácidos clorogênicos encontrados e a concentração dos mesmos, estão coerentes com o que é reportado na literatura para a erva-mate (FILIP *et al.*, 2001; GEBARA *et al.*, 2017; HECK; DE MEJIA, 2007; PAGLIOSA *et al.*, 2010b). Há instabilidade na concentração da maioria dos ácidos clorogênicos da infusão de folhas de erva-mate após 24 h a 25 °C, que no caso são os ácidos mono-cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA e 5-CQA) e di-cafeoilquínicos (3,5-CQA e 4,5-CQA). Os dados encontrados são coerentes aos resultados da estabilidade dos fenóis totais por método colorimétrico (Tabela 4). Takenaka *et al.* (2006) também mostraram que a concentração de ACGs (ácidos mono- e di-cafeoilquínicos) em farinha de batata doce dissolvida em água decrescem à temperatura ambiente após 1 hora.

As perdas encontradas para o teor de ácidos clorogênicos após 24 h a 25 °C, indicam que infusões de erva-mate são mais sensíveis à temperatura ambiente e, por esse motivo, essa infusão deve ser armazenada sob refrigeração (8 °C) ou consumida

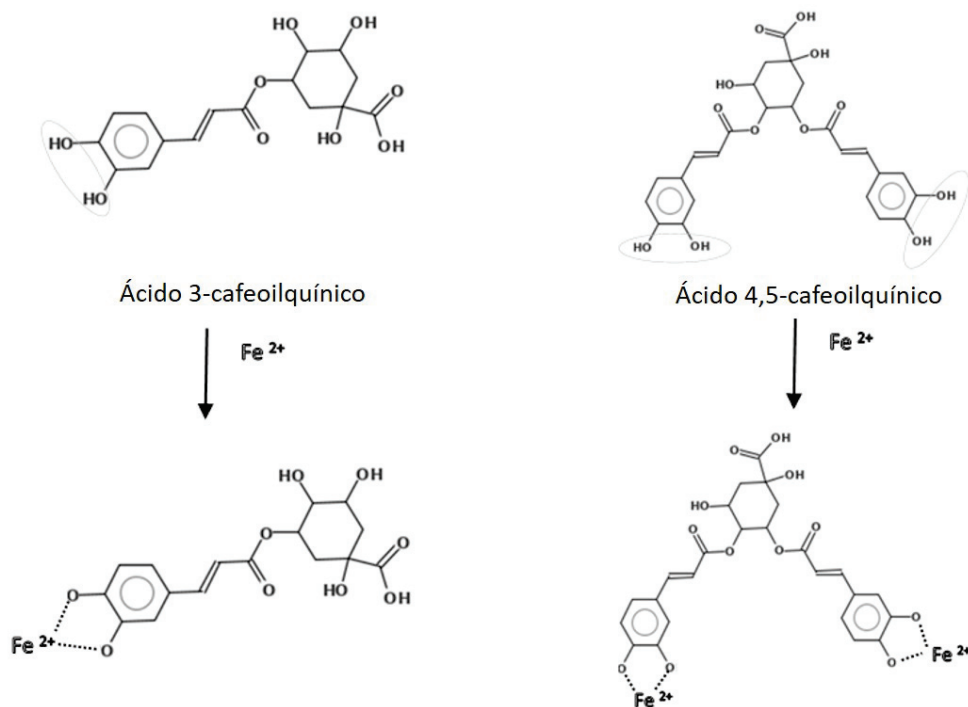
o mais rápido possível para preservar a maior parte dos ACGs (Figura 13). No entanto, com o propósito de quelar íons de ferro, como nos casos de doenças por sobrecarga desse mineral, e com base nos resultados *in vitro*, parece irrelevante a temperatura de armazenamento para o seu consumo.

A aplicação do estudo *in silico* com o software PassOnline, mostrou que os ácidos cafeoilquínicos 3-, 4-, 5-, 3,5- e 4,5 são fortes candidatos para a complexação com o ferro, como pode ser verificado no Apêndice L. Os ácidos fenólicos da família dos ácidos clorogênicos têm efeito antioxidante atribuído, em grande parte, à propriedade de quelar o ferro (KONO *et al.*, 1998; ANDJELKOVIC *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2018). Pois, de fato, a complexação do ferro com os ácidos cafeoilquínicos pode ser considerado um mecanismo antioxidante, uma vez que o ferro complexado não tem a capacidade de promover a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) formado na reação de Fenton (KONO *et al.*, 1998; IMAM *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018). Avaliando as habilidades de quelação de ferro de compostos fenólicos, Andjelkovic *et al.* (2006) mostraram que os ácidos hidroxicinâmicos (exemplo dos ácidos cafeoilquínicos), têm maior capacidade quelante quando comparado aos ácidos hidroxibenzóicos (como os ácidos gálico e protocatecuico).

A propriedade quelante contra o ferro dos ácidos mono-cafeoilquínicos e ácidos di-cafeoilquínicos é comprovada na literatura, através de estudos conduzidos com espectroscopia UV-visível, espectroscopia paramagnética eletrônica (EPR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Essa propriedade é atribuída: (1) a uma estrutura mais complexa em comparação a outros ácidos fenólicos (exemplo dos derivados do ácido hidroxibenzoico), o que envolve um ou mais ésteres do ácido cafeico ligado(s) ao ácido quínico; (2) ao grupo etileno presente na estrutura dos ácidos cafeoilquínicos, que influencia positivamente na capacidade dos mesmos para quelar metais e (3) a presença de grupos hidroxila, com capacidade para doar elétrons (KONO *et al.*, 1998; ANDJELKOVIC *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2018). A quantidade e a posição dos grupos hidroxila também afetam a atividade quelante contra o ferro desses ácidos fenólicos. Os grupos di-hidroxila ligados a um anel aromático na posição orto, referido como grupo catecol, melhoram a atividade quelante contra o ferro (ANDJELKOVIC *et al.*, 2006). Os ácidos cafeoilquínicos na infusão de folhas de erva-mate contêm grupos di-hidroxila que possuem essas características e são o sítio de ligação do ferro nas moléculas, como pode ser observado na Figura 16. Os ácidos fenólicos sem nenhum grupo catecol para derivados de ácidos hidroxicinâmicos ou sem nenhum grupo galóil para os derivados de ácido hidroxibenzóico não mostram qualquer complexação com o ferro (ANDJELKOVIC *et al.*, 2006). Além disso, o ácido 4,5-cafeoilquínico é um ácido di-cafeoilquínico adjacente. Os ácidos di-cafeoilquínicos que contêm porções cafeoil na posição adjacente mostram uma atividade quelante de ferro mais eficaz. Esses ácidos têm melhor capacidade para circundar o ferro da reação de quelação em comparação

com os ácidos di-cafeoilquínicos não adjacentes (LI *et al.*, 2018).

Figura 16 – Estrutura de dois ácidos cafeoilquínicos encontrados na infusão de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) e o sítio de ligação para o ferro, proposto pela literatura (KONO *et al.*, 1998; ANDJELKOVIC *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2018).



Fonte: A autora, 2021, de acordo com Kono *et al.* (1998), Andjelkovic *et al.* (2006) e Li *et al.* (2018).

Embora os metais de transição, além do Fe²⁺ (por exemplo: Zn²⁺, Cu²⁺ e Mn²⁺) possam ser complexados por compostos com propriedade quelante de metais (DEHARIYA *et al.*, 2020), a quantidade de íons metálicos e de compostos fenólicos e as diferenças na solubilidade dos mesmos entre as fontes alimentares, podem causar efeitos diferenciados na complexação de metais de transição (AFSANA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2018; LOBBES *et al.*, 2020). Afsana *et al.* (2004), mostraram o efeito da ingestão de ácido tânico na diminuição da absorção do ferro, mas não na absorção de zinco, cobre e manganês. Borowska *et al.* (2020), revelaram que o extrato das bagas de Aronia, bem como os compostos cianidina 3-O-β-galactosídeo e a quercetina, podem se ligar ao Zn²⁺ e ao Cu²⁺, mas apenas em pH 5,5. A complexação do chumbo (metal tóxico) pelo 5-CQA foi demonstrada em solução aquosa por meio de espectroscopia de absorção visível por UV juntamente a cálculos químicos quânticos (CORNARD *et al.*, 2008). Ao considerar a importância biológica dos metais de transição, quando em concentrações adequadas no organismo, seria importante investigar se a erva-mate, bem como os ácidos cafeoilquínicos encontrados nesta planta, têm afinidade por outros metais de transição.

Referente ao estudo preliminar *in vivo*, envolvendo três voluntários saudáveis, até o momento não foram encontrados estudos com humanos sobre o potencial da erva-mate em inibir a absorção do ferro, após a ingestão de uma refeição com elevada biodisponibilidade desse mineral. Os valores de ferro sérico antes e após 4 h da ingestão de uma refeição rica em ferro com cada tratamento, sugeriram que a infusão de folhas de erva-mate tende a promover uma expressiva redução da absorção do ferro (Figura 14), quando comparado ao controle (água). Em média, 81% considerando a AUC_{0-4h} , 80% para o Δ_{max} e 78% para $\%Fe_{max}$ (Tabela 5).

Ao considerar a variável, $\%Fe_{max}$, os resultados encontrados para a infusão de erva-mate (1,11%) e para o controle (5,13%) mostrados na Tabela 5, foram bastante similares ao estudo de Hurrell *et al.* (1999), que avaliou a inibição da absorção do ferro não heme em infusão de *Camelia sinensis* (chá preto), em 10 voluntários saudáveis (6 homens e 4 mulheres). Na pesquisa de Hurrell *et al.* (1999), o consumo de pão fortificado com ferro ferroso seguido de água, mostrou $\%Fe_{max}$ igual a 4,46% e no momento em que a ingestão ocorreu com o chá preto, o resultado foi de 0,92%. Considerando que a concentração de ferritina sérica pode interferir na resposta do organismo para a absorção do ferro (HURRELL *et al.*, 1999; STUART *et al.*, 2003), torna-se importante mencionar, que tanto na pesquisa de Hurrell *et al.* (1999), quanto no presente estudo, os participantes saudáveis apresentavam um semelhante valor desse marcador hematológico para a reserva de ferro, valor médio de ferritina sérica de 61 $\mu\text{g/L}$ (faixa entre 13 - 193 $\mu\text{g/L}$) e de 61,7 $\mu\text{g/L}$ (faixa entre 28 - 89 $\mu\text{g/L}$), respectivamente (Apêndice H).

O ferro é encontrado na alimentação, principalmente na forma não heme (COZZOLINO, 2005), e as plantas ou infusões, com capacidade para reduzir a sua absorção em mais de 50% em humanos são considerados potenciais inibidores da absorção desse mineral (HURRELL *et al.*, 1999), o que poderia ser interessante para o tratamento de casos de sobrecarga de ferro.

Os ácidos cafeoilquínicos são substâncias bioativas largamente distribuídas em plantas, que também são fontes importantes de minerais, incluindo os metais de transição, como o ferro (PAGLIOSA *et al.*, 2010a; MORAES *et al.*, 2020). Ao considerar que o organismo de um adulto, em condições normais, precisa absorver apenas 10% do que consome em média de ferro (10 -20 mg/dia), sendo 2/3 proveniente de plantas (HOFFBRAND *et al.*, 2006; ANDERSON; FRAZER, 2017), a presença de ácidos cafeoilquínicos em alimentos/bebidas proveniente de vegetais poderiam favoravelmente contribuir na modulação da absorção do ferro, sem afetar a sua homeostase, tendo em vista que o organismo não possui um mecanismo eficiente para a sua excreção (ANDERSON; FRAZER, 2017; ALLEN, R. P. *et al.*, 2018). No presente estudo, a extração de compostos das folhas de erva-mate foi otimizada com o objetivo de aumentar a ação quelante contra o ferro dessa planta.

A infusão de folhas de erva-mate estudada promoveu a complexação com o

ferro *in vitro*, com o provável envolvimento de ácidos cafeoilquínicos e sugere-se que efeito similar possa ocorrer *in vivo*, reduzindo a absorção desse mineral em indivíduos saudáveis. O tempo e o volume de água comumente utilizados para infusões afeta a extração de compostos fenólicos e a atividade quelante de ferro, a qual apresentou efeito saturante a uma baixa quantidade de fenóis totais. Conseqüentemente, a infusão de folhas de erva-mate foi altamente estável tanto à temperatura de refrigeração quanto ambiente para a atividade quelante de ferro. A partir desses resultados, foi investigado o efeito da infusão de folhas de erva-mate (30 g de folhas /300 mL de água a 80 °C e tempo de infusão de 10 min.) para reduzir a absorção do ferro em portadores de HH *HFE*.

6.2 EFEITO DA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE NA ABSORÇÃO DE FERRO EM PACIENTES COM HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

Com uma redução de 88% da AUC_{0-4h} do ferro sérico comparado ao controle (água), o estudo mostrou um significativo efeito inibitório da infusão de folhas de erva-mate (100 mg/mL) para a absorção do ferro em pacientes com HH *HFE*. Um estudo prévio envolvendo pacientes com a mesma doença indicou que o consumo agudo de chá preto, rico em catequinas, tem capacidade para limitar a absorção desse mineral, comparado à ingestão de água (KALTWASSER *et al.*, 1998). Após, foi reportado por Hutchinson *et al.* (2010), que a ingestão de cápsulas contendo *Silybum marianum* (Legalon® silibina 140 mg) seriam mais eficientes ao chá preto para reduzir a absorção de ferro férrico em casos de HH *HFE*. Por outro lado, Lobbes *et al.* (2020) revelaram, que o extrato rico no composto fenólico procianidina, obtido a partir da casca de pinheiro marinho Francês - *Pinus pinaster* Ait. (Oligopin® procianidina 100 mg) não foi efetivo para reduzir a absorção de ferro em pacientes com HH *HFE*, o que poderia estar relacionado ao tipo e à quantidade de polifenóis usados. No caso da infusão com folhas de erva-mate, os resultados do presente estudo, evidenciaram uma elevada ação para inibir a absorção de ferro, enquanto a suspensão de *Silybum marianum* (Legalon® silibina 140 mg), não apresentou a mesma habilidade.

O excessivo aumento da absorção do ferro alimentar nos pacientes com HH *HFE* é verificado nesse estudo pela ampliação média da AUC_{0-4h} em 2,4 vezes, ao comparar os controles (intervenção com água) dos indivíduos saudáveis, mesmo sendo dados preliminares, com os portadores de HH *HFE*.

A não redução da absorção de ferro pela suspensão de *Silybum marianum* nos pacientes com HH *HFE* é contrária ao resultado descrito por Hutchinson *et al.* (2010), onde os pacientes com HH, ingeriram o *Silybum marianum* na forma de cápsula (Legalon®, 140 mg de silibina) e com refeição contendo ferro férrico. Uma hipótese para a diferença nos resultados é que a presença do excipiente ácido ascórbico na formulação da suspensão, pode ter sido responsável pela elevação da absorção de ferro, particu-

larmente do ferro ferroso presente na refeição (COOK; MONSEN, 1977; HALLBERG *et al.*, 1989; LYNCH *et al.*, 1989; SIEGENBERG *et al.*, 1991). O efeito estimulador do ácido ascórbico para a absorção de ferro ferroso, na quantidade presente na suspensão, pode ter sido somado aos estímulos já existentes nos pacientes com HH (mutação no gene *HFE* e tratamento com flebotomias em fase de manutenção). A potencialização da absorção do ferro ferroso pelo ácido ascórbico é ainda maior em indivíduos com mutação no gene *HFE*, comparado a indivíduos sem mutação para o gene *HFE*. O estudo de Lynch *et al.* (1989), mostrou que indivíduos sem mutação no gene *HFE*, ao ingerirem refeição com adição de 20 mg de sulfato ferroso e 100 mg de ácido ascórbico, absorveram apenas 0,80 mg de ferro, enquanto indivíduos heterozigotos para o gene *HFE* a absorção foi de 2,15 mg. Assim, também explica-se porque a tendência para um efeito similar não teria sido observado nos indivíduos saudáveis. A ausência desses estímulos nos indivíduos saudáveis, torná-los-iam menos sensíveis ao efeito do ácido ascórbico na absorção do ferro ferroso e mais susceptíveis à ação quelante do *Silybum marianum* na suspensão.

Embora existam estudos que registraram a capacidade da erva-mate e do *Silybum marianum* para quelar o ferro ferroso *in vitro* (KOKSAL *et al.*, 2009; COLPO *et al.*, 2016), não foram encontradas pesquisas em portadores de HH sobre o efeito dessas plantas para inibir a absorção do ferro na forma de íon ferroso.

Considerando que o ferro férrico precisa ser reduzido a ferro ferroso, forma mais solúvel para ser absorvido, a biodisponibilidade do ferro ferroso é considerada melhor que a do ferro férrico. Essa redução, ocorre por uma ação combinada envolvendo a presença do ácido clorídrico, que estabiliza as moléculas de ferro férrico (que ficam ligadas à mucina no estômago), para depois no intestino o citocromo Dcytb localizado na membrana apical dos enterócitos converter o mesmo a ferro ferroso (STUART *et al.*, 2003; PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2017). Tendo em vista que a suplementação mandatória de alimentos amplamente consumidos com ferro de maior biodisponibilidade, exemplo na forma de íon ferroso, foi estabelecida como política nacional por alguns países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2017a), a fim de prevenir casos de anemia ferropênica, essa estratégia pode representar um risco para o aumento da sobrecarga de ferro em pacientes com HH. Também pode ser um fator ambiental para favorecer e/ou acelerar a expressão fenotípica da hemocromatose, inclusive para as mutações no gene *HFE* não C282Y/C282Y (BEZWODA *et al.*, 1981; OLSSON *et al.*, 1997; TAO; PELLETIER, 2009; BELL *et al.*, 2000; SALIOU *et al.*, 2015).

Todos os pacientes do presente estudo, vêm consumindo diariamente alimentos fortificados com ferro por, pelo menos, 20 anos. Apesar da raridade da frequência de HH *HFE* não C282Y/C282Y segundo a literatura (POWELL *et al.*, 2016; KOWDLEY *et al.*, 2019), cinco dos 14 pacientes avaliados nesse ensaio clínico apresentam mutações não C282Y/C282Y, sugerindo algum possível efeito da alimentação. Sabe-se que

a mutação C282Y/C282Y leva a uma sobrecarga de ferro mais severa no organismo (POWELL *et al.*, 2016) e nesse ensaio clínico, os pacientes com essa mutação tiveram absorção de ferro (ao consumir a refeição com água) duas vezes maior do que os pacientes não C282Y/C282Y, porém sem diferença significativa ($p = 0,073$). De qualquer maneira, a infusão de folhas de erva-mate inibiu de forma similar a absorção de ferro em todos os pacientes com HH *HFE* em fase de manutenção, independente dos tipos de mutação.

O nível médio de ferritina sérica nos pacientes, no momento do diagnóstico, foi em torno de 1000,0 $\mu\text{g/L}$. Entretanto, com base nos indicadores idade, tempo desde o diagnóstico e número de flebotomias por ano, a intensidade do acúmulo de ferro mostrou tendência a ser mais elevada nos pacientes C282Y/C282Y, o que é esperado (POWELL *et al.*, 2016). Os pacientes com mutação no gene *HFE* não C282Y/C282Y também apresentaram sobrecarga de ferro expressiva, porém, parece ocorrer de modo menos severo. Os pacientes C282Y/C282Y manifestaram excessivo acúmulo de ferro no organismo quando mais novos e, por isso, estão há mais tempo em tratamento. Nesses pacientes, também houve propensão para um maior número de flebotomias/ano até alcançar a fase de manutenção. Cabe lembrar que existe a influência de outros fatores, além do tipo de mutação, para a frequência de flebotomias/ano, como os sintomas e as respostas ao tratamento de cada paciente, a exposição a fatores ambientais, o diagnóstico ser ou não precoce e o valor de ferritina sérica no diagnóstico (MILMAN *et al.*, 2019).

As manifestações clínicas na HH *HFE* tendem a ser proporcionais à sobrecarga de ferro (POWELL *et al.*, 2016). As doenças avançadas na HH, como diabetes tipo 2 e cardiomiopatias, são usualmente observadas em indivíduos com ferritina sérica acima de 1000 $\mu\text{g/L}$ (quando aumenta o risco para danos teciduais pela deposição de ferro) e/ou na presença de outros cofatores, como a síndrome metabólica (POWELL *et al.*, 2016; SANDHU *et al.*, 2018). De fato, no presente estudo os pacientes C282Y/C282Y apresentaram outras comorbidades, como diabetes tipo 2 (01), síndrome metabólica (01), doença cardiovascular (01) e hipertensão (03). Porém, pacientes não C282Y também apresentaram diabetes tipo 2 (01), síndrome metabólica (01) e hipertensão (02), indicando que as comorbidades não foram exclusivas da mutação homocigótica C282Y. Desordens relacionadas a artropatias e artrites foram as mais relatadas pelos pacientes (artralgia: (03) C282Y/C282Y e (03) não C282Y/ C282Y), e segundo Sandhu *et al.* (2018), são as que ocorrem com maior frequência na HH *HFE* e nem sempre amenizam durante a fase de manutenção. No Apêndice M é possível visualizar a Tabela com os dados para as comorbidades dos pacientes que participaram do estudo.

A absorção intestinal de ferro depende de várias proteínas-chave, incluindo a proteína transportadora de metal divalente, DMT1 e a proteína exportadora de ferro, FPN1 (STUART *et al.*, 2003; ANDERSON; FRAZER, 2017), que em um estudo envol-

vendo pacientes com HH *HFE* mostraram uma associação inversa com a concentração de ferritina sérica (STUART *et al.*, 2003). Portanto, é esperado o aumento verificado na absorção de ferro nos pacientes com ferritina sérica < 50 µg/L, comparado aos pacientes com ferritina sérica > 50 µg/L quando consumiram a refeição rica em ferro com água. A ferritina sérica é utilizada como um marcador da concentração de ferro armazenada no organismo (1,0 µg/L equivale a 7,5 mg de ferro no organismo) (BASSET *et al.*, 1984) e a baixa quantidade desse mineral no organismo estimula, ainda mais, a absorção de ferro nos pacientes com HH *HFE* (STUART *et al.*, 2003; LESJAK *et al.*, 2019). Somado a esse efeito, a terapia de flebotomias também pode estimular a redução da expressão da proteína hepcidina, que já é baixa nos pacientes com HH (e fica ainda mais reduzida ao manter a ferritina sérica < 50 µg/L), potencializando o reacúmulo de ferro e o aumento da ferritina sérica (STUART *et al.*, 2003; DIJK *et al.*, 2008). É interessante destacar, conforme indicado pela significativa interação ferritina *versus* tratamento, que a infusão de folhas de erva-mate inibiu a absorção de ferro independentemente do nível de ferritina sérica nos pacientes com HH *HFE* em terapia de flebotomia na fase de manutenção.

Os mecanismos para reduzir a absorção do ferro não heme no organismo, por extratos de determinadas plantas ricas em compostos fenólicos, não são bem compreendidos. Porém, estudos *in vitro* e *in vivo* sinalizam que o efeito agudo de ácidos fenólicos e flavonoides na absorção do ferro, está relacionado a um efeito quelante (KALTWASSER *et al.*, 1998; STUART *et al.*, 2003; ANDJELKOVIC *et al.*, 2006; LESJAK *et al.*, 2019) e que essa ação quelante pode ocorrer à nível intracelular (STUART *et al.*, 2003; LESJAK *et al.*, 2019). Entre os ácidos fenólicos estudados por Andjelkovic *et al.* (2006), o ácido clorogênico (3-CQA) foi o que apresentou a atividade quelante contra o ferro *in vitro* mais relevante e esse é o principal ácido fenólico encontrado na infusão de folhas de erva-mate. O estudo corrobora tanto com os achados *in vitro* com a infusão de folhas de erva-mate, quanto com os dados alcançados no ensaio clínico com os portadores de HH *HFE*.

A planta erva-mate se destaca pela concentração de macromelementos como magnésio, potássio e cálcio e microelementos como ferro, zinco e manganês (PAGLIOSA *et al.*, 2010a; RUSINEK-PRYSTUPA *et al.*, 2016). A absorção de metais divalentes, além do ferro, requerem a mesma proteína transportadora (DMT1) e, assim a biodisponibilidade dos mesmos poderia ser diferenciada nos pacientes em fase de manutenção (ORISAKWE *et al.*, 2020). A infusão consumida pelos participantes continha 0,330 mg/200 mL de ferro e o fato dessa concentração não ter sobreposto à ação dos seus compostos com potencial quelante (3,6 g/200 mL de fenóis totais), indica que esse mineral não estaria biodisponível (seja pela quantidade ou maneira que a folha foi processada) e portanto, não haveria risco do seu acúmulo pelo consumo prolongado dessa infusão. Por outro lado, considerando que o tratamento adjuvante

com a infusão de folhas de erva-mate deverá ser de longa duração, é importante, que ocorram estudos adicionais de longo prazo, sobre a biodisponibilidade, para verificar se o efeito quelante da infusão para o ferro se mantêm e sobre algum efeito de inibição ou de toxicidade dos demais minerais (zinco, manganês e magnésio) para a saúde dos portadores de HH em fase de manutenção.

Como limitação deste estudo clínico, pode-se mencionar, que decorrente da ausência de um grupo homogêneo em relação às mutações no gene *HFE* e à concentração de ferritina sérica, foi necessária a estratificação dos pacientes em C282Y/C282Y e não-C282Y/C282Y e pela concentração de ferritina sérica, resultando em um pequeno número amostral por subgrupo. Um pequeno número amostral também ocorreu no teste preliminar com os indivíduos saudáveis. Além disso, a limitação para oferecer as bebidas às cegas poderia causar margem de viés para os desfechos do estudo. Porém, se desconhece material inerte apropriado, compatível sensorialmente à infusão de folhas de erva-mate e à suspensão de *Silybum marianum*. Assim, para minimizar esse viés foi aplicada a randomização das bebidas.

Entretanto, o estudo apresenta pontos fortes, principalmente pela robusta resposta da infusão de folhas de erva-mate para inibir a absorção de ferro nos pacientes durante a fase de tratamento de manutenção. O resultado do estudo também foi obtido a partir de um ensaio clínico cruzado, para que as variações particulares no metabolismo do ferro de cada indivíduo não interferissem no desfecho final (cada participante funcionou como seu próprio controle) e a estratificação dos pacientes proporcionou a verificação do efeito favorável da infusão de erva-mate na inibição da absorção de ferro em todos os pacientes com HH *HFE*, independente de mutações genéticas ou concentração de ferritina sérica. O fato de ser um estudo cruzado e apenas com pacientes com concentrações normais de PCR-us, minimizou o risco de viés para o eventual aumento da concentração de ferritina sérica por inflamação. Para finalizar, teve-se o cuidado com a padronização das refeições e com a concentração de ferro, confirmada por análise laboratorial; com a escolha da amostra de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) e o uso inovador dessa planta, com a quantificação da sua concentração de fenóis totais e ferro total.

7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados da presente tese revelaram uma elevada complexação do ferro por uma infusão de folhas de erva-mate, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

A infusão de folhas de erva-mate estudada, rica em compostos fenólicos, promoveu uma complexação com o ferro *in vitro* com o provável envolvimento de ácidos cafeoilquínicos. Foi constatado que o tempo de infusão de 10 min. somado ao volume de água de 300 mL, foram adequados para garantir a obtenção de uma bebida com elevada atividade quelante contra o ferro e com maior extração de compostos fenólicos.

Uma elevada associação foi encontrada entre a concentração de fenóis totais e a atividade quelante contra o ferro na erva-mate, porém com um efeito saturante a uma baixa quantidade de fenóis totais. Assim, a infusão de folhas de erva-mate (30 g de folhas /300 mL de água a 80 °C e tempo de infusão de 10 min.) foi altamente estável para a atividade quelante de ferro, tanto à temperatura de refrigeração quanto à temperatura ambiente, assegurando a quem apresenta HH, não ser imprescindível consumir essa infusão imediatamente após o seu preparo ou mantê-la em refrigeração para conservar a sua propriedade quelante.

Os resultados fitoquímicos para a infusão de folhas de erva-mate consumida pelos portadores de HH *HFE* no ensaio clínico, também confirmaram o predomínio dos ácidos fenólicos: 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5- dicafeoilquínico e que com 24 h de armazenamento, principalmente à temperatura ambiente, existem perdas para a concentração, tanto de fenóis totais quanto de ácidos cafeoilquínicos sem interferir na propriedade quelante.

A partir dos dados encontrados no ensaio clínico randomizado, controlado e cruzado, conclui-se que a infusão de folhas de erva-mate (preparada com 30 g de folhas de erva-mate para 300 mL de água a 80 °C e 10 min. de tempo de infusão) diminui significativamente a absorção de ferro em pacientes com HH *HFE* em fase de manutenção. A redução da absorção foi independente da concentração sérica de ferritina e do tipo de mutação para o gene *HFE*. Assim, a infusão de folhas de erva-mate, consumida logo após as refeições, tem potencial para reduzir a absorção de ferro em pacientes com HH *HFE* e poderia ser utilizada como um adjuvante no tratamento da HH.

Essa é uma inovadora área de pesquisa para a infusão de folhas de erva-mate, como um agente quelante natural de ferro, e a constatação do potencial da erva-mate para quelar o ferro em portadores de HH *HFE* foi a principal contribuição científica do estudo, alcançando novas perspectivas relacionadas ao tratamento adjuvante da mesma.

Como considerações, primeiramente, sugere-se que ensaios clínicos de longo prazo tornem-se importantes para investigar a redução do ferro armazenado no orga-

nismo de portadores de HH *HFE*, pela infusão de folhas de erva-mate.

Referente ao *Silybum marianum* é apresentada como consideração, verificar em investigações futuras, se a forma de apresentação das formulações fitoterápicas (suspensão *versus* cápsula) interferem para o seu efeito sobre a absorção de ferro. Com base nos resultados do estudo clínico, sugere-se cautela na ingestão de *Silybum marianum* na forma de suspensão (Legalon®, 140 mg) por pacientes com HH, principalmente, enquanto não ocorrerem estudos adicionais.

Sabe-se que a quantidade e biodisponibilidade de compostos fitoquímicos, em uma mesma planta e em seus extratos/infusões, podem diferir consideravelmente de acordo com a origem, parte da planta e estação do ano, forma de cultivo, modo de beneficiamento e preparo. Diante dessa consideração, o presente estudo mostra a capacidade para inibir a absorção do ferro em portadores de HH *HFE*, para uma infusão de folhas de erva-mate, com as condições especificadas para essa amostra vegetal e sua forma de preparo.

Por fim, o que foi apresentado nessa tese soma-se à outros estudos que consideram as investigações para o uso de uma terapia adjuvante combinada às flebotomias, como uma ação que deve ser considerada relevante para o tratamento da hemocromatose hereditária.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P C. Epidemiology and diagnostic testing for hemochromatosis and iron overload. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 37, S1, p. 25–30, 2015.
- ADAMS, P C *et al.* Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 17, p. 1769–1778, 2005.
- ADAMS, P C *et al.* Screening for iron overload: lessons from the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. 11, p. 769–772, 2009.
- AFSANA, K; SHIGA, K; ISHIZUKA, S; HARA, H. Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 584–592, 2004.
- AGUIAR, K M; COLARES, T D S; XAVIER, M A de S; XAVIER, A R E de O. Mutações genéticas, métodos diagnósticos e terapêuticas relacionadas à hemocromatose hereditária. **Biotemas**, v. 27, n. 1, p. 133–142, 2014.
- AKESSON, A; STAL, P; VAHTER, M. Phlebotomy increases cadmium uptake in hemochromatosis. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 4, p. 289–291, 2000.
- ALEXANDER, J; KOWDLEY, K V. *HFE*-associated hereditary hemochromatosis. **Genetics in Medicine**, v. 11, n. 5, p. 307, 2009.
- ALLEN, K J *et al.* Iron-overload-related disease in *HFE* hereditary hemochromatosis. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 3, p. 221–230, 2008.
- ALLEN, R P *et al.* Evidence-based and consensus clinical practice guidelines for the iron treatment of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease in adults and children: an IRLSSG task force report. **Sleep Medicine**, v. 41, p. 27–44, 2018.
- ALVES, T L. **Detecção de metabólitos do ácido clorogênico e metilxantinas em plasma e urina de indivíduos saudáveis após a ingestão de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.Hil).** 2006. Diss. (Mestrado) – Universidade Federal de Santa

Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Florianópolis.

AMIGO-BENAVENT, M; WANG, S; MATEOS, R; SARRIÁ, B; BRAVO, L.

Antiproliferative and cytotoxic effects of green coffee and yerba mate extracts, their main hydroxycinnamic acids, methylxanthine and metabolites in different human cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 125–138, 2017.

ANDERSON, G J; FRAZER, D M. Current understanding of iron homeostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, Supplement 6, 1559s–1566s, 2017.

ANDJELKOVIC, M; VAN CAMP, J; DE MEULENAER, B; DEPAEMELAERE, G; SOGACIU, C; VERLOO, M; VERHE, R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 23–31, 2006.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 20th ed. USA, 2016.

ARANDA, N; VITERI, F E; MONTSERRAT, C; ARIJA, V. Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. **Annals of hematology**, v. 89, n. 8, p. 767–773, 2010.

ARAUJO, A C M F de; DUTRA, E G; INUMARU, L E. Relatório do grupo de trabalho da Anvisa para revisão da Resolução RDC n. 344/2002, que aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ácido fólico e Ferro. **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Gerência de Pós Registro de Alimentos e Gerência-Geral de Alimentos. Brasília, DF, v. 1, n. 1, p. 1–107, 2016.

ARRUDA, L F. **Influência do teor de ferro dietético na expressão de genes reguladores do metabolismo de ferro, estresse oxidativo e marcadores do envelhecimento em ratos adultos**. 2013. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Departamento de Ciências da Saúde, Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Brasília.

ASTILL, C; BIRCH, M R; DACOMBE, C; HUMPHREY, P G; MARTIN, P T. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5340–5347, 2001.

- AYDINOK, Y. Iron chelation therapy as a modality of management. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 261–275, 2018.
- AYMONE, W C; VALIATI, V; RESEM, M G F S; PERES, W *et al.* Hemocromatose hereditária. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 101, n. 6, p. 27–33, 2013.
- BACON, B R; ADAMS, P C; KOWDLEY, K V; POWELL, L W; TAVILL, A S. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 54, n. 1, p. 328–343, 2011.
- BACON, B R; POWELL, L W; ADAMS, P C; KRESINA, T F; HOOFNAGLE, J H. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. **Gastroenterology**, v. 116, n. 1, p. 193–207, 1999.
- BAEZA, G; SARRIÁ, B; BRAVO, L; MATEOS, R. Polyphenol content, in vitro bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 4, p. 1397–1406, 2018.
- BARDOU-JACQUET, E *et al.* Regression of Fibrosis Stage With Treatment Reduces Long-Term Risk of Liver Cancer in Patients With Hemochromatosis Caused by Mutation in *HFE*. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 8, p. 1851–1857, 2020.
- BARRELLA, M V; HERINGER, O A; CARDOSO, P M M; PIMENTEL, E F; SCHERER, R; LENZ, D; ENDRINGER, D. Metals Content in Herbal Supplements. **Biological Trace Element Research**, v. 175, n. 2, p. 488–494, 2017.
- BASSET, M L; HALLIDAY, J W; FERRIS, R A; POWELL, L W. Diagnosis of hemochromatosis in young subjects: predictive accuracy of biochemical screening tests. **Gastroenterology**, v. 87, n. 5, p. 628–633, 1984.
- BASULI, D; STEVENS, R G; TORTI, F M; TORTI, S V. Epidemiological associations between iron and cardiovascular disease and diabetes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 117, 2014.
- BELL, H *et al.* The Clinical Expression of Hemochromatosis in Oslo, Norway: Excessive Oral Iron Intake May Lead to Secondary Hemochromatosis Even in *HFE* C282Y Mutation Negative Subjects. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 35, n. 12, p. 1301–1307, 2000.

- BENNETT, M J; LEBRON, J A; BJORKMAN, P J. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. **Nature**, v. 403, p. 46–53, 2000.
- BEZWODA, W R; BOTHWELL, T H; DERMAN, D P; MACPHAIL, A P; TORRANCE, J D; CHARLTON, R W. Effect of diet on the rate of iron accumulation in idiopathic haemochromatosis. **South African Medical Journal**, February, p. 219–222, 1981.
- BOAVENTURA, B C B; DI PIETRO, P F; KLEIN, G A; STEFANUTO, A; MORAIS, E C de; ANDRADE, F de; WAZLAWIK, E; SILVA, E L da. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1057–1064, 2013.
- BOMFORD, A. Genetics of haemochromatosis. **The Lancet**, v. 360, n. 9346, p. 1673–1681, 2002.
- BORDBAR, M; PASALAR, M; SAFAEI, S; KAMFIROOZI, R; ZAREIFAR, S; ZEKAVAT, O; HAGHPANAH, S. Complementary and alternative medicine use in thalassemia patients in Shiraz, southern Iran: A cross-sectional study. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 8, p. 141–146, 2018.
- BOROWSKA, S; TOMCZYK, M; STRAWA, J W; BRZÓSKA, M M. Estimation of the chelating ability of an extract from *Aronia melanocarpa* L. Berries and its main polyphenolic ingredients towards ions of zinc and copper. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1–15, 2020.
- BORTOLI, P M *et al.* *Ilex paraguariensis*: Potential antioxidant on aluminium toxicity, in an experimental model of Alzheimer's disease. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2017.
- BRAGANÇA, V L C; MELNIKOV, P; ZANONI, L Z. Trace elements in different brands of yerba mate tea. **Biological Trace Element Research**, v. 144, n. 1, p. 1197–1204, 2011.
- BRANCO, C S *et al.* Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v. 92, p. 60–68, 2013.

BRASIL. **Portaria número 344 de 01 de fevereiro de 2017. Dispõe sobre o preenchimento do quesito raça/cor nos formulários dos sistemas de informação em saúde.** Brasília: Brasília/DF: Imprensa Nacional, 01 de fevereiro de 2017., 2017a.

BRASIL. **Resolução número 150 de 13 de abril de 2017. Dispõe sobre o enriquecimento das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico.** Brasília: Brasília/DF: Imprensa Nacional, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 13 de abril de 2017., 2017b.

BRASIL. **Resolução número 152 de 21 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre a fortificação de ferro em farinhas de trigo e milho.** Brasília: Brasília/DF: Imprensa Nacional, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 21 de fevereiro de 2000., 2000.

BRASIL. **Resolução número 344 de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinha de milho com ferro e ácido fólico.** Brasília: Brasília/DF: Imprensa Nacional, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 13 de dezembro de 2002., 2002.

BRAVO, L; GOYA, L; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 393–405, 2007.

BRICKS, L F. Ferro e Infecções. Atualização. **Jornal de Pediatria**, v. 16, n. 1, p. 34–43, 1994. ISSN 21773459.

BRISSOT, P; BALL, S; ROFAIL, D; CANNON, H; JIN, W V. Hereditary hemochromatosis: patient experiences of the disease and phlebotomy treatment. **Transfusion**, v. 51, p. 1331–1338, 2011.

BUENO, S; DUCH, C R; FIGUEIREDO, M S. Mutations in the *HFE* gene (C282Y, H63D, S65C) in a Brazilian population. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 4, p. 293–295, 2006.

CANÇADO, R D; CHIATTONE, C S. Visão atual da hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6, p. 469–75, 2010.

CANÇADO, R D; GUGLIELMI, A C O; VERGUEIRO, C S V; ROLIM, E G; FIGUEIREDO, M S; CHIATTONE, C S. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene *HFE* em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 351–360, dez. 2007.

CARDOSO, C S; OLIVEIRA, P; PORTO, G; OBERKANINS, C; MASCARENHAS, M; RODRIGUES, P; KURY, F; SOUSA, M de. Comparative study of the two more frequent *HFE* mutations (C282Y and H63D): significant different allelic frequencies between the North and South of Portugal. **European Journal of Human Genetics**, v. 9, p. 843–848, 2001.

CLIFFORD, M N; RAMIREZ-MARTINEZ, J R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 13–21, 1990.

COFFEY, R; GANZ, T. Iron homeostasis: An anthropocentric perspective. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 31, p. 12727–12734, 2017.

COLPO, A C *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, v. 209, p. 185–195, 2016.

CONWAY, J M; INGWERSEN, L A; VINYARD, B T; MOSHFEGH, A J. Effectiveness of the US Department of Agriculture 5-step multiple-pass method in assessing food intake in obese and nonobese women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1171–1178, 2003.

CONWAY, R E; GEISSLER, C A; HIDER, R C; THOMPSON, R P H; POWELL, J J. Serum iron curves can be used to estimate dietary iron bioavailability in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1910–1914, 2006.

COOK, J D. Hemochromatosis: effect of iron fortification of foods. **Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment**, p. 535–543, 2000.

COOK, J D; MONSEN, E R. Vitamin C, the common cold, and iron absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 235–241, 1977.

CORNARD, J; LAPOUGE, C; DANGLETERRE, L; ALLET-BODELOT, C. Complexation of lead (II) by chlorogenic acid: Experimental and theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 48, p. 12475–12484, 2008.

COZZOLINO, S M F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. [S.l.: s.n.], 2005.

CRAZI, A *et al.* European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 55, 2011.

DA CROCE, D M. **Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: erva-mate**. [S.l.]: Epagri, 2000.

DA SILVA, E L; NEIVA, T J C; SHIRAI, M; TERAOKA, J; ABDALLA, D S P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973–979, 2008.

DA SILVEIRA, T F F; MEINHART, A D; BALLUS, C A. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study. **Food Research International**, v. 60, p. 241–245, 2014.

DA SILVEIRA, T F F; MEINHART, A D; DE SOUZA, T C L; CUNHA, E C E; DE MORAES, M R; FILHO, J T; T, Godoy H. Optimization of the preparation conditions of yerba mate tea beverage to maximize chlorogenic acids extraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, p. 219–223, 2017.

DA SILVEIRA, T F F; MEINHART, A D; DE SOUZA, T C L; TEIXEIRA F, J; GODOY, H T. Phenolic compounds from yerba mate based beverages - A multivariate optimisation. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1159–1167, 2016.

DANIAL, N N; KORSMEYER, S J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, january 23, p. 205–219, 2004.

DAVIS, W D; ARROWSMITH, W R. The effect of repeating bleeding in hemochromatosis. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 36, n. 5, p. 814–815, 1950.

- DE MORAIS, E C; STEFANUTO, A; KLEIN, G A; BOAVENTURA, B C B; DE ANDRADE, F; WAZLAWIK, E; DI PIETRO, P F; MARASCHIN, M; SILVA, E L da. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316–8324, 2009.
- DEHARIYA, R; CHANDRAKAR, J; DUBEY, S; OJHA, K; K, Dixit A. Scavenging and metal chelating potential of *Carthamus tinctorius* L. extracts. **Current Botany**, v. 11, p. 43–50, 2020.
- DESGRIPPES, R; LAINÉ, F; MORCET, J; PERRIN, M; MANET, G; JEZEQUEL, C; BARDOU-JACQUET, E; ROPERT, M; DEUGNIER, Y. Decreased iron burden in overweight C282Y homozygous women: Putative role of increased hepcidin production. **Hepatology**, v. 57, n. 5, p. 1784–1792, 2013.
- DEUGNIER, Y; MORCET, J; LAINÉ, F; HAMDİ-ROZE, H; BOLLARD, A; GUYADER, D; MOIRAND, R; BARDOU-JACQUET, E. Reduced phenotypic expression in genetic hemochromatosis with time: Role of exposure to non-genetic modifiers. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 70, n. 1, p. 118–125, 2019.
- DIAZ, M; CABRERIZO, S; DOCAMPO, P C. Intoxicación grave con un medicamento de empleo frecuente. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 109, n. 1, p. 1–3, 2011.
- DIJK, B A C V; LAARAKKERS, C M M; KLAVER, S M; JACOBS, E M G; TITS, L J H V; JANSSEN, M C H; SWINKELS, D W. Serum hepcidin levels are innately low in HFE-related haemochromatosis but differ between C282Y- homozygotes with elevated and normal ferritin levels. **British Journal of Haematology**, v. 142, p. 979–985, 2008.
- DINIS, T C P; MADEIRA, V M C; ALMEIDA, Leonor M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 315, n. 1, p. 161–169, 1994.
- DIXON, S J; STOCKWELL, B R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p. 9–17, 2014.
- DOORN, G M van; GOSSELINK, I M G. **Dietary advice in HFE-hemochromatosis**. [S.l.], 2012.

EBRAHIMZADEH, M A; POURMORAD, F; BEKHRADNIA, A R. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 18, 2008.

EDWARDS, C Q; GRIFFEN, L M; GOLDFAR, D; DRUMMOND, C; SKOLNICK, M H; KUSHNER, J P. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. **New England Journal of Medicine**, v. 318, n. 21, p. 1355–1362, 1988.

FAIRBANKS, V F. **Ferro em Medicina e Nutrição**. [S.l.: s.n.], 2009.

FARAH, A; PAULIS, T de; TRUGO, L C; MARTIN, P R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1505–1513, 2005.

FEDER, J N *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nature Genetics**, v. 13, n. 4, p. 399, 1996.

FILIP, R; LOPEZ, P; GIBERTI, G; COUSSIO, J; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774–778, 2001.

FRANCHINI, M. Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. **American Journal of Hematology**, v. 81, n. 3, p. 202–209, 2006.

FUSTINONI-REIS, A M; ARRUDA, S F; DOURADO, L P S; CUNHA, M S B da; SIQUEIRA, E. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) consumption modulates iron homeostasis and prevents iron-induced oxidative stress in the rat liver. **Nutrients**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 8, n. 2, p. 38, 2016.

GANZ, T. Systemic Iron Homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 4, p. 1721–1741, 2013.

GARRISON, C. **Iron Disorders Institute guide to hemochromatosis**. [S.l.]: Sourcebooks, Inc., 2009.

GATTO, E M; MELCON, C; PARISI, V L; BARTOLONI, L; GONZALEZ, C D. Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case–control study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 356, n. 1, p. 163–167, 2015.

GEBARA, K S; GASPAROTTO-JUNIOR, A; SANTIAGO, P G; CARDOSO, C A L; SOUZA, L M; MORAND, C; COSTA, T A; CARDOZO, J E. Daily intake of chlorogenic acids from consumption of Maté (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) traditional beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017.

GORZALCZANY, S; R, Filip; DEL ROSARIO A, M; MINO, J; FERRARO, G E; ACEVEDO, C. Choleric effect and intestinal propulsion of mate (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2-3, p. 291–294, 2001.

GOSWAMI, T; ANDREWS, N C. Hereditary Hemochromatosis Protein, HFE, Interaction with Transferrin Receptor 2 Suggests a Molecular Mechanism for Mammalian Iron Sensing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 39, p. 28494–28498, 2006.

GRAAFF, B de; NEIL, A; SANDERSON, K; YEE, K C; PALMER, A J. Quality of life utility values for hereditary haemochromatosis in Australia. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 14, n. 1, p. 31, 2016.

GRIVICICH, I; REGNER, A; DA ROCHA, A B. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GROTTO, H Z W. Metabolismo do ferro: uma revisao sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 390–397, out. 2008.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant Effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDLin Vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 2, p. 338–344, 1996.

GULCIN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2-3, p. 213–220, 2006.

GUNSHIN, H; MACKENZIE, B; BERGER, U V; GUNSHIN, Y; ROMERO, M F; BORON, W F; NUSSBERGER, S; GOLLAN, J L; HEDIGER, M A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, v. 388, n. 6641, p. 482, 1997.

HAGAG, A A; ELFRARGY, M S; GAZAR, R A; EL-LATEEF, A E A. Therapeutic value of combined therapy with deferasirox and silymarin on iron overload in children with beta thalassemia. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, 2013.

HALLBERG, L; BRUNE, M; ROSSANDER, L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 140–144, 1989.

HARE, D J; CARDOSO, B R; SZYMLEK-GAY, E A; BIGGS, B. Neurological effects of iron supplementation in infancy: finding the balance between health and harm in iron-replete infants. **Nature Partner Journals, Parkinson's diseases**, v. 4642, n. 17, p. 1–13, 2017.

HECK, C I; DE MEJIA, E G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2007.

HENLEY, E D. Absorption of iron from the gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 4, p. 600–618, 1956.

HEZAVEH, Z S; SHIDFAR, F. View of hydrophilic phytochelators in iron overload condition. **Journal of Nutrition and Food Security**, v. 4, n. 2, p. 142–151, 2019.

HOFFBRAND, A V; PETTIT, F E; MOSS, P A H. Hypochromic anaemias and iron overload. *In: ESSENTIAL Haematology*. [S.l.: s.n.], 2006.

HOPPE, M; HULTHEN, L. Validattion of the clinical approach of using the induce serum iron increase after 1 h as a measure of iron absorption. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 163–165, 2006.

HOPPE, M; HULTHÉN, L; HALLBERG, L. The validation of using serum iron increase to measure iron absorption in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 485–488, 2004.

HURRELL, R F; REDDY, M; COOK, J D. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 4, p. 289–295, 1999.

HUTCHINSON, C; BOMFORD, A; GEISSLER, C A. The iron-chelating potential of silybin in patients with hereditary haemochromatosis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 10, p. 1239, 2010.

HUTCHINSON, C; GEISSLER, C A; POWELL, J J; BOMFORD, A. Proton pump inhibitors suppress absorption of dietary non-haem iron in hereditary haemochromatosis. **Gut**, v. 56, n. 9, p. 1291–1295, 2007.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro: Centro de Documentação e Disseminação de Informações., 2010. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/pof/Antropometria%20e%20estado%20nutricional%20de%20crianas_adolescentes%20e%20adultos%20no%20Brasil_2008_2009.pdf. Acesso em: 17 jul. 2018.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: Avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil**. Rio de Janeiro: Centro de Documentação e Disseminação de Informações., 2020a. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101704.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2021.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 1990-2019, 2020**. Rio de Janeiro: Banco de dados agregados, sistema IBGE de recuperação automática SIDRA., 2020b. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 abr. 2021.

IMAM, M U; ZHANG, S; MA, J; WANG, H; WANG, F. Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress. **Nutrients**, v. 9, n. 7, 2017.

JACKOWSKI, D; REBELLO, E S; FAUCZ, F R. Análise da frequência da mutação C282Y na população paranaense. **Estudos de Biologia**, v. 26, n. 55, 2004.

JIAO, Y; WILKINSON, J I V; PIETSCH, E C; BUSS, J L; WANG, W; PLANALP, R; TORTI, F M; TORTI, S V. Iron chelation in the biological activity of curcumin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 7, p. 1152–1160, 2006.

- KALTWASSER, J; WERNER, E; GOTTSCHALK, R; HANSEN, C; SEIDL, C; SCHALK, K; KALTWASSER, J P. Clinical trial on the effect of regular tea drinking on iron accumulation in genetic haemochromatosis. **Gut**, v. 43, n. 1, p. 699–704, 1998.
- KAMANGAR, F; SCHANTZ, M M; ABNET, C C; FAGUNDES, R B; DAWSEY, S M. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 17, n. 5, p. 1262–1268, 2008.
- KAMANGAR, F; SCHANTZ, M M; ABNET, C C; FAGUNDES, R B; DAWSEY, S M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) traditional infusions (mate and terere). **Food Control**, v. 60, p. 215–220, 2016.
- KIM, E; HAM, S; SHIGENAGA, M K; HAN, O. Bioactive dietary polyphenolic compounds reduce nonheme iron transport across human intestinal cell monolayers. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 9, p. 1647–1651, 2008.
- KIM, K H; OH, K Y. Clinical applications of therapeutic phlebotomy. **Journal of Blood Medicine**, v. 7, p. 139, 2016.
- KLEIN, G A *et al.* Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 320–332, 2011.
- KOKSAL, E; GULÇIN, I; BEYZA, S; SARIKAYA, O; BURSAL, E. In vitro antioxidant activity of silymarin. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 395–405, 2009.
- KONO, Y; KASHINE, S; YONEYAMA, T; SAKAMOTO, Y; SHIBATA, H. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 22–27, 1998.
- KOWDLEY, K V; BROWN, K E; AHN, J; SUNDARAM, V. ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 114, n. 8, p. 1202–1218, 2019.
- KRAUSE, A; NEITZ, S; MAGERT, H; SCHULZ, A; FORSSMANN, W; SCHULZ-KNAPPE, P; ADERMANN, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Letters**, v. 480, n. 2000, p. 147–150, 2000.

KUJAWSKA, M. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Beverage: Nutraceutical Ingredient or Conveyor for the Intake of Medicinal Plants? Evidence from Paraguayan Folk Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

KWAN, T; LEBER, B; AHUJA, S; CARTER, R; GERSTEIN, H C. Patients with type 2 diabetes have a high frequency of the C282Y mutation of the hemochromatosis gene. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 21, n. 6, p. 251, 1998.

LAPARRA, J M; GLAHN, R P; MILLER, D D. Effect of tea phenolics on iron uptake from different fortificants by Caco-2 cells. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 974–981, 2009.

LEBRON, J A; WEST, A P; BJORKMAN, P J. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor11 Edited by I. A. Wilson. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 1, p. 239–245, 1999. ISSN 0022-2836. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3252>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283699932527>.

LEI, P; BAI, T; SUN, Y. Mechanisms of Ferroptosis and Relations With Regulated Cell Death: A Review. **Frontiers in Physiology**, v. 10, february, p. 1–13, 2019.

LENTNER, C. Hypochromic anaemias and iron overload. *In*: PHYSICAL chemistry, composition of blood, haematology, somatometric data. [S.l.: s.n.], 1984.

LESJAK, M; BALESARIA, S; SKINNER, V; DEBNAM, E S; SRAI, S K S. Quercetin inhibits intestinal non-haem iron absorption by regulating iron metabolism genes in the tissues. **European Journal of Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 743–753, 2019.

LI, X; LI, K; XIE, H; XIE, Y; LI, Y; ZHAO, X; JIANG, X; CHEN, D. Antioxidant and Cytoprotective Effects of the Di-O-Caffeoylquinic Acid Family: The Mechanism, Structure–Activity Relationship, and Conformational Effect. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 222, 2018.

LIMA, D M; PADOVANI, R M; RODRIGUEZ-AMAYA, D B J; FARFAN, A; NONATO, C T; DE LIMA, M T; SALAY, E; CALUGNATI, F A B; GALEAZZI, M A M. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO**. [S.l.: s.n.], 2011.

LIVREA, M A; TESORIERE, L; PINTAUDI, A M; CALABRESE, A; MAGGIO, A; FREISLEBEN, H J; D'ARPA, D; D'ANNA, R; BONGIORNO, A. Oxidative stress and

antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. **Blood**, v. 88, n. 9, p. 3608–3614, 1996.

LOBBES, H; GLADINE, C; MAZUR, A; PEREIRA, B; DUALÉ, C; CARDOT, J; RUIVARD, M. Effect of procyanidin on dietary iron absorption in hereditary hemochromatosis and in dysmetabolic iron overload syndrome: A crossover double-blind randomized controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 2020, p. 97–103, 2020.

LOKESH, K N; CHANNARAYAPPA, V M; GOWTHAM, R G; PATIL, H; DAVE, H. Augmentation of antioxidant and iron(III) chelation properties of tertiary mixture of bioactive ligands. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 45, n. 2018, p. 114–124, 2018.

LUCOTTE, G. Celtic origin of the C282Y mutation of hemochromatosis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 24, n. 4, p. 433–438, 1998.

LUNCEFORD, N; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419–427, 2005.

LUZ, A B G; SILVA, C H B da; NASCIMENTO, M V P S; CAMPOS F B M, de; BARATTO, B; FRODE, T S; REGINATTO, F H; DALMARCO, E M. The anti-inflammatory effect of Ilex paraguariensis A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 165–172, 2016.

LYNCH, S R; SKIKNE, B S; COOK, J D. Food iron absorption in idiopathic hemochromatosis. **Blood**, v. 74, n. 6, p. 2187–2193, 1989.

MACHADO, C C B; BASTOS, D H M; JANZANTTI, N S; FACANALI, R; MARQUES, M O M; FRANCO, M R B. Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e aroma de bebidas produzidas a partir de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Química Nova**, v. 30, p. 513–518, 2007.

MAO, P; WORTHAM, A M; ENNS, C A; ZHANG, A. The catalytic, stem, and transmembrane portions of matriptase-2 are required for suppressing the expression of the iron-regulatory hormone hepcidin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 6, p. 2060–2073, 2019.

MARTINS, J M. Considerations on the food fortification policy in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 2, p. 158–163, 2011.

MARTINS, J M. Universal iron fortification of foods: the view of a hematologist. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 6, p. 459–463, 2012.

MCCAFFERY, M; BEEBE, A; LATHAM, J; BALL, D. **Pain**. [S.l.]: Mosby, 1994.

MENDES, F R; CARLINI, E A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 493–500, 2007.

MENDES, J F R. **Biomarcadores do estado nutricional do ferro e estresse oxidativo em adultos**. 2008. Diss. (Mestrado) – Universidade de Brasília, Departamento de Nutrição, Curso de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Brasília.

MILMAN, N T; SCHIOEDT, F V; JUNKER, A E; K, Magnussen. Diagnosis and Treatment of Genetic HFE -Hemochromatosis: The Danish Aspect. **Gastroenterology Research**, v. 12, n. 5, p. 221–232, 2019.

MIOT, H A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275–8, 2011.

MOHER, D; HOPEWELL, S; SCHULZ, K F; MONTORI, V; GOTZSCHE, P C; DEVEREAUX, P J; ELBOURNE, D; EGGER, M; ALTMAN, D G. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 63, n. 8, p. 1–37, 2010.

MOLIN, R F; DARTORA, N; BORGES, A C P; GONÇALVES, I L; DI LUCIO, M; VALDUGA, A T. Total phenolic contents and antioxidant activity in oxidized leaves of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 997–1003, 2014.

MORAES, M R; RYAN, S M; GODOY, H T; THOMAS, A L; MAIA, J G S; RICHARDS, K M; TRAN, K; SMITH, R. Phenolic Compounds and Metals in Some Edible Annonaceae Fruits. **Biological Trace Element Research**, 2020.

NABECHIMA, G H. **Inativação térmica das enzimas polifenoloxidase e peroxidase em forno esteira e efeitos sobre a cor da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2006.

Diss. (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Florianópolis.

NEGHINA, A M; ANGHEL, A. Hemochromatosis genotypes and risk of iron overload a meta-analysis. **Annals of Epidemiology**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 2011.

NICOLAS, G; BENNOUN, M; DEVAUX, I; BEUCAMONT, C; GRANDCHAMP, B; KAHN, A; VAULONT, S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 15, p. 8780–8785, 2001.

NISHIYAMA, M F; COSTA, M A F; COSTA, A M da; SOUZA, C G M de; BÔER, C G; BRACHT, C K; PERALTA, R M. Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var *assamica*): effect of infusion time, mode of packaging and preparation on the extraction efficiency of bioactive compounds and on the stability of the beverage. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, p. 191–196, 2010.

O'TOOLE, R; BROMHEAD, C; ROMERIL, K R. **Using Iron Studies to Target Testing for Hereditary Haemochromatosis in New Zealand**. [S.l.]: American Society of Hematology, 2015.

OEC. **Maté (HS:0903) Product trade, exporters and importers**. [S.l.]: The Observatory of Economic Complexity, 2020. Disponível em: <https://oec.world/en/profile/hs92/mate?redirect=true>. Acesso em: 12 abr. 2021.

OKARU, A O; RULLMANN, A; FARAH, A; GONZALEZ DE M, E; STERN, M C; LACHENMEIER, D W. Comparative oesophageal cancer risk assessment of hot beverage consumption (coffee, mate and tea): The margin of exposure of PAH vs very hot temperatures. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018.

OLSSON, K S; VÄISÄNEN, M; KONAR, J; BRUCE, Å. The effect of withdrawal of food iron fortification in Sweden as studied with phlebotomy in subjects with genetic hemochromatosis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 11, p. 782–786, 1997.

OMAR, U M; SHORBAJI, A M; ARRAIT, E M; AL AGHA, T D; AL-MARZOUKI, H F; AL DOGHAITHER, H A; AL-GHAFARI, A B. Comparative Study of the Antioxidant

Activity of Two Popular Green Tea Beverages Available in the Local Market of Saudi Arabia. **Natural Science**, v. 8, n. 06, p. 227, 2016.

ORISAKWE, O E; AMADI, C N; FRAZZOLI, C. Management of iron overload in resource poor nations: A systematic review of phlebotomy and natural chelators. **Journal of Toxicology**, v. 2020, p. 1–14, 2020.

PAGLIOSA, C M; PEREIRA, S M; VIEIRA, M A; COSTA, L A; TEIXEIRA, E; AMBONI, R D M C; AMANTE, E R. Bitterness in yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Journal of Sensory Studies**, v. 24, n. 3, p. 415–426, 2009.

PAGLIOSA, C M; SIMAS, K N de; AMBONI, R D M C; MURAKAMI, A N N; PETKOWICZ, C L O; MEDEIROS, J D; RODRIGUES, A C; AMANTE, E R. Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 428–433, 2010a.

PAGLIOSA, C M; VIEIRA, M A; PODESTA, R; MARASCHIN, M; ZENI, A L B; AMANTE, E R; AMBONI, R D M C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) **Food Chemistry**, v. 122, p. 173–178, 2010b.

PANGJIT, K; UDOMSUK, L; UPANAN, S; PONGJANTA, A; CHANSON, N; SRICHAIRATANAKOOL, S. Iron-chelating and anti-hemolytic properties of ethanolic extract of lotus (*Nelumbonucifera gaertn*) leaves. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 99, n. 1, s58–66, 2016.

PAPANIKOLAOU, G; PANTOPOULOS, K. Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life - IUBMB Life**, v. 69, n. 6, p. 399–413, 2017.

PARK, C H; VALORE, E V; WARING, A J; GANZ, T. Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7806–7810, 2001.

PARK, S K; ONEILL, M S; WRIGHT, R O; HU, H; VOKONAS, P S; SPARROW, D; SUH, H; SCHWARTZ, J. *HFE* genotype, particulate air pollution, and heart rate variability. **A Gene-Environment Interaction Circulation**, v. 108, p. 1718–1724, 2006.

- PELLETIER, D. Food and nutrition policy: A biological anthropologist's experiences from an academic platform. **American Journal of Human Biology**, v. 27, n. 1, p. 16–26, 2015.
- PEREIRA, A C; MOTA, G F A; KRIEGER, J E. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. **Human Biology**, v. 73, n. 1, p. 145–151, 2001.
- PEREZ, C A; YIBIN, W; MAOLIN, G. Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 3, p. 326–332, 2009.
- PIGEON, C; ILYIN, G; COURSELAUD, B; LEROYER, P; TURLIN, B; BRISSOT, P; LORÉAL, O. A new mouse liverspecific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7811–7819, 2001.
- PIPERNO, A *et al.* Heterogeneity of Hemochromatosis in Italy. **Gastroenterology**, v. 114, p. 996–1002, 1998.
- PORTO, G; BRISSOT, P; SWINKELS, D W; ZOLLER, H; KAMARAINEN, O; PATTON, S; ALONSO, I; MORRIS, M; KEENEY, S. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis (HH). **European Journal of Human Genetics**, v. 24, n. 4, p. 479, 2016.
- POWELL, L W; SECKINGTON, R C; DEUGNIER, Y. Haemochromatosis. **The Lancet**, v. 388, n. 10045, p. 706–716, 2016.
- RAMETTA, R; FRACANZANI, A L; FARGION, S; DONGIOVANNI, P. Dysmetabolic Hyperferritinemia and Dysmetabolic Iron Overload Syndrome (DIOS): Two Related Conditions or Different Entities? **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 0, p. 1–10, 2020.
- RAMOS, E; KAUTZ, L; RODRIGUEZ, R; HANSEN, M; GABAYAN, V; GINZBURG, Y; ROTH, M; NEMETH, E; GANZ, T. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. **Hepatology**, v. 53, n. 4, p. 1333–1341, 2011.

RONCO, A L; LASALVIA-GALANTE, E; CALDERON, J M; ESPINOSA, E. Dietary Iron Source and Lung Cancer Risk: A Case-Control Study in Uruguayan Men.

Multidisciplinary Cancer Investigation, v. 3, n. 3, p. 20–36, 2019.

RUSINEK-PRYSTUPA, E; MARZEC, Z; SEMBRATOWICZ, I; SAMOLIŃSKA, W; KICZOROWSKA, B; KWIECIEŃ, M. Content of Selected Minerals and Active Ingredients in Teas Containing Yerba Mate and Rooibos. **Biological Trace Element Research**, v. 172, n. 1, p. 266–275, 2016.

RYBINSKA, I; CAIRO, G. Chapter Eight - Mutual Cross Talk Between Iron Homeostasis and Erythropoiesis. *In*: LITWACK, Gerald (Ed.). **Erythropoietin**. [S.l.]: Academic Press, 2017. v. 105. (Vitamins and Hormones). P. 143–160.

SALIOU, P; LE GAC, G; MEROUR, M C; TRIPOGNEY, C; CHANU, B; GOURLAOUEN, I; NOUSBAUM, J; FEREC, C; SCOTET, V. HFE hemochromatosis: influence of dietary iron intake on the iron overload of C282Y homozygous patients. **Annals of Hematology**, v. 94, n. 7, p. 1225–1227, 2015.

SANDHU, K; FLINTOFF, K; CHATFIELD, M D; DIXON, J L; RAMM, L E; RAMM, G A; POWELL, L W; SUBRAMANIAM, V N; WALLACE, D F. Phenotypic analysis of hemochromatosis subtypes reveals variations in severity of iron overload and clinical disease. **Blood**, v. 132, n. 1, p. 101–110, 2018.

SANTOS, P C J L. **Hemocromatose hereditária: associação entre as mutações no gene HFE e o estado de ferro em doadores de sangue e pesquisa de mutações nos genes HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1 em pacientes com sobrecarga de ferro primária**. 2010. Diss. (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo.

SHAM, R L; OU, C; CAPPUCCIO, J; BRAGGINS, C; DUNNIGAN, K; PHATAK, K D. Correlation Between Genotype and Phenotype in Hereditary Hemochromatosis: Analysis of 61 Cases. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 23, n. 16, 314–320r, 1997.

SHEIKH, N A; DESAI, T R; TIRGAR, P R. Evaluation of iron chelating and antioxidant potential of *Epilobium hirsutum* for the management of iron overload disease.

Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 89, p. 1353–1361, 2017.

SIEGENBERG, D *et al.* Ascorbic acid prevents the dose dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, n. 2, p. 537–541, 1991.

SILVEIRA, T F F da; MEINHART, A D; SOUZA, T C L de; TEIXEIRA, F J; GODOY, H T. Phenolic compounds from yerba mate based beverages—A multivariate optimisation. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1159–1167, 2016.

SIMÕES, C M O; SCHEINKEL, E P; GOSMANN, G; MELLO, J C P; MENTZ, L A; PETROVICK, P R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. [S.l.: s.n.], 2004.

SINGLETON, V L; ROSSI, J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOUZA, V D; DRIESSNACK, M; MENDES, I A C. Revisão dos desenhos de pesquisa relevantes para enfermagem. Parte 1: desenhos de pesquisa quantitativa. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. 3, p. 1–6, 2007.

SOUTO, N L R; PUGLIESI, P R; LOPES, I C R. Hereditary hemochromatosis: literature review. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 26, e1791, p. 1–8, 2016.

SRINIVAS, N; SANDEEP, K S; ANUSHA, Y; DEVENDRA, B N. In vitro cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: An in silico approach. **International Invention Journal of Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 2, p. 20–29, 2014.

STUART, K A; ANDERSON, G I; FRAZER, D M; POWELL, L W; MCCULLEN, M; FLETCHER, L M; CRAWFORD, D H G. Duodenal expression of iron transport molecules in untreated haemochromatosis subjects. **Gut**, v. 52, n. 7, p. 953–959, 2003.

TAJIK, N; TAJIK, M; MACK, I; ENCK, P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 7, p. 2215–2244, 2017.

TAKENAKA, A; NANAYAMA, K; ISOBE, S; MURATA, M. Changes in caffeic acid derivatives in sweet potato (Ipomoea batatas L.) during cooking and processing. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 172–177, 2006.

- TAO, M; PELLETIER, D. The effect of dietary iron intake on the development of iron overload among homozygotes for haemochromatosis. **Public Health Nutrition**, v. 12, n. 10, p. 1823–1829, 2009.
- TAVILL, A S; ADAMS, P C. A diagnostic approach to hemochromatosis. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. 8, p. 535–540, 2006.
- TERADA, C T; SANTOS, P C J L; CANÇADO, R D; ROSTELATO, S; LOPREATO, F R; CHIATTONE, C S; GUERRA-SHINOHARA, E M. Iron deficiency and frequency of *HFE* C282Y gene mutation in Brazilian blood donors. **Transfusion Medicine**, v. 19, n. 5, p. 245–251, 2009.
- TORRES, T; FARAH, A. Coffee, maté, açaí and beans are the main contributors to the antioxidant capacity of Brazilians diet. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 1523–1533, 2017.
- TUNTIPOIPAT, S; ZEDER, C; SIRIPRAPA, P; CHAROENKIATKUL, S. Inhibitory effects of spices and herbs on iron availability. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 43–55, 2009.
- TYAGI, P; KUMAR, Y; GUPTA, D; SINGH, H; KUMAR, A. Therapeutic advancements in management of iron overload a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 8, p. 35–44, 2015.
- VALDUGA, A T; GONÇALVES, I L; MAGRI, E. Analysis of the Presence of Toxic Metals in Yerba Mate Samples: a Case Study from South Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 230, n. 153, p. 1–8, 2019.
- VICENTE, S J V; QUEIROZ, Y S; GOTLIEB, S L D; TORRES, E A F da S. Stability of phenolic compounds and antioxidant capacity of regular and decaffeinated coffees. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, SciELO Brasil, v. 57, n. 1, p. 110–118, 2014.
- VIEIRA, M A; MARASCHIN, M; ROVARIS, Â A; MELLO, R A C de; PAGLIOSA, C M; XAVIER, J J M; AMANTE, E R. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 6, p. 776–782, 2010.

VILLANI, K J; VIANA, G C; CARVALHO, G R de; GUIDINE, A T; A CORRÊA, J O do; MESQUITA, H L de. Hemocromatose Hereditária Relacionada ao Gene HFE. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 2, n. 1, p. 14–21, 2010.

WALLACE, D F; WALKER, A P; PIETRANGELO, A; CLARE, M; BOMFORD, A B; DIXON, J L; POWELL, L W; SUBRAMANIAM, V N; DOOLEY, J S. Frequency of the S65C mutation of HFE and iron overload in 309 subjects heterozygous for C282Y. **Journal of Hepatology**, v. 36, n. 4, p. 474–479, 2002.

WANG, H *et al.* Characterization of Ferroptosis in Murine Models of Hemochromatosis. **Hepatology**, v. 66, n. 2, p. 2368–2375, 2017.

WHITLOCK, E P; GARLITZ, B A; HARRIS, E L; BEIL, T L; SMITH, P R. Screening for hereditary hemochromatosis: a systematic review for the US Preventive Services Task Force. **Annals of Internal Medicine**, v. 145, n. 3, p. 209–223, 2006.

WHO. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry**. [S.l.]: World Health Organization, Geneva, 1995.

WHO. **Trace elements in human nutrition and health**. [S.l.]: World Health Organization, Geneva, 1996.

WORWOOD, M. What is the role of genetic testing in diagnosis of haemochromatosis? **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 3–19, 2001.

YATSU, F K J; BORGHETTI, G S; BASSANI, V L. Characterization and Stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) Spray-Dried Powder. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 4, p. 413–419, 2011.

YU, S; YUE, S W; LIU, Z; ZHANG, T; XIANG, N; FU, H. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves microcirculation of volunteers with high blood viscosity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Experimental Gerontology**, v. 62, p. 14–22, 2015.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Pagliosa, C M; Vieira, F G K; Silveira, T T; Krieger, J R; Medeiros, M F; Silva, E L da; Elevated iron chelating activity of *Ilex paraguariensis* leaf infusion: *in vitro* and *in vivo* pilot studies, **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 64, 2021.
doi.org/10.1590/1678-4324-2021200205

Elevated Iron Chelating Activity of *Ilex paraguariensis* Leaf Infusion: *in vitro* and *in vivo* Pilot Studies

Cristiane Manf  Pagliosa¹, Francilene Gracieli Kunradi Vieira^{1*}, Ta s Thomsen Silveira¹, J ssica Ramos Krieguer², Marcela Freitas Medeiros², Edson Luiz da Silva^{1,2}

¹Federal University of Santa Catarina, Health Sciences Center, Nutrition Postgraduate Program, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil;

²Federal University of Santa Catarina, Health Sciences Center, Department of Clinical Analyses, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

*Correspondence: francilene.vieira@ufsc.br; Tel.: +55-48-37218014 (F.G.K.V.).

Abstract: This study presents an *Ilex paraguariensis* leaf infusion with important potential as natural iron-chelating. The impact of infusion time and the water volume to obtain an *Ilex paraguariensis* leaf infusion with high phenolic content and iron chelating activity, such as the stability of these properties in the storage time and temperature (immediately and after 24 h at 8 and 25  C) were assessed. The acute consumption effect of this infusion to reduce iron absorption *in vivo* was also evaluated. A preliminary crossover trial with volunteers that ingested a meal containing non-haem iron (11.4 mg) with the treatments: *Ilex paraguariensis* leaf infusion with the highest phenolic content and iron chelating activity (200 mL) or control (200 mL water). Blood samples were withdrawn before and 1, 2, 3 and 4 h after the meal for serum iron measurement. The highest phenolic content (18.1 mg/mL) and iron chelating activity ($\approx 100\%$) were observed for 10 min infusion time using 30 g leaves/300 mL water. Storage at 8 or 25  C for 24 h decreased total phenolics and di-caffeoylquinic acids by 23.5% and 25.5%, respectively ($p < 0.05$), without affecting the iron-chelating activity due to a saturating chelating effect at 3.34 mg/mL phenolic content. Inhibition of the iron absorption *in vivo* by infusion was 78% considering the iron recovery at peak maximum. The *in vitro* and preliminary *in vivo* results showed a functional property of the *Ilex paraguariensis* leaf infusion that may be useful for adjuvant management of iron overload diseases.

Keywords: *Ilex paraguariensis* leaf infusion; iron chelating activity; phenolic compounds; *in vitro* and *in vivo* studies.

INTRODUCTION

South Americans have had the habit of drinking *Ilex paraguariensis* beverages for hundreds of years, and this habit has been increasing all over the world for the positive health effects these beverages confer [1-3]. The antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic, and hypocholesterolemic properties of *Ilex paraguariensis* have been reported in human studies [1-9]. However, the iron chelating activity of *Ilex paraguariensis* has been less studied [10] and free iron may play a role in the genesis and development of several diseases [11,12]. In this context, phenolic-rich plants with iron chelating activity have been studied as chemopreventive agents against neurodegenerative and heart diseases and for hereditary disorders of iron overload [11-13].

The healthy properties of *Ilex paraguariensis* infusions have been mainly attributed to the phenolic compounds of the chlorogenic acids family extracted, particularly, from the leaves [1,2], which possess a higher solubility for phenolic compounds extraction in water [14].

The effect of infusion preparation on the extraction of phenolic compounds has been reported for products made with traditional *Ilex paraguariensis* leaves and stems and that were dried using high temperatures [15,16]. Taking into account that high temperatures may lead to increased levels of the toxically polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs), in the present study we used *Ilex paraguariensis* leaves that were dried at low temperature to avoid PHAs [17]. Although the stability of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* leaves and leaf powder has been reported [18,19], the referred stability for *Ilex paraguariensis* infusions was not found in the literature. In addition, there is a lack of information about the *in vitro* iron chelating activity of *Ilex paraguariensis* infusion regarding the preparation method and the stabilities of phenolics and iron chelating after storage at different temperatures, and mainly the potential iron chelating effect in humans. It has been reported that formation of a polyphenol iron complex in the human intestinal tract by some plants/foods, may limit iron absorption and this complexation could be a useful adjuvant in the management of iron overload conditions [20-22].

If on the one hand studies and the control of micronutrients deficiency in the population are essential [23], there is also a need to investigate alternatives to conditions in which the excessive iron in the organism could be a crucial health problem [12,20,22].

Boado and coauthors [24] dissolved 40 mg of iron in a traditional South American beverage with leaves and stems of *Ilex paraguariensis* ("mate"), and it was ingested by women. The study showed that the complexation of the iron could have been in the beverage "mate", before the intake. In the present study, the aim is to investigate the potential of an *Ilex paraguariensis* leaf infusion to inhibit iron absorption in humans, based on the serum iron response after ingestion of a meal containing high amount of bioavailable iron.

Considering the interest in an infusion rich in phenolic compounds and with an elevated iron chelating activity, this study presents a preparation method (proportion of *Ilex paraguariensis* leaves and water, and time infusion) to obtain the highest values of these properties. The stabilities of phenolic compounds and the iron-chelating activity were assessed. A preliminary study of the inhibition of dietary iron absorption by *Ilex paraguariensis* in healthy subjects was also evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

The *Ilex paraguariensis* leaves were randomly chosen from thirty mate trees, with certificated organic farming and that had more than 20 years old in Catanduvas, State of Santa Catarina, Southern Brazil (27°S, 51°40'W, altitude 925 m). The sample was identified and a voucher specimen (accession number: FLOR65601) was deposited at the herbarium of the Botanical Department of the Federal University of Santa Catarina, Brazil.

The *Ilex paraguariensis* leaves with no stems were dried at 50 °C, without using high temperatures to avoid generating PAHs [17], ground and packed in airtight plastic bags by Matebrás (Brazilian Mate Industry® Ltd., Catanduvas, SC, Brazil). Samples stored at -18 ± 2 °C until required.

Preparation of infusions with *Ilex paraguariensis* leaves

Ilex paraguariensis infusions were prepared at different infusion time (2.5, 5.0, and 10.0 min) and with different water volumes (50, 100, and 300 mL), respecting the same proportion of leaves/water, *i.e.*, 100 mg/mL: 5 g/50 mL; 10 g/100 mL; and 30 g/300 mL. All infusions were prepared in Becker glasses with equal capacity, in triplicate, with ultrapure water at 80 ± 1 °C and filtered using vacuum filtration. After 10 min infusion, final temperature was also measured. Soluble solids, total phenolic compounds (TPC), and the iron chelating activity were immediately measured.

For time and temperature stability assays, the infusion with the highest extraction of TPC and iron chelating activity was used. The measurement of TPC, chlorogenic acids (CGAs), and iron chelating activity were performed immediately after preparation (time zero) and after 24 h storage at 8 or 25 °C. All the reagents used in the assay procedures were of analytical or chromatographic grade. All tests were performed in triplicate.

Determination of soluble solids

Soluble solids were determined by transferring 1.0 mL *Ilex paraguariensis* infusion into a tared test tube and evaporating to dryness. The residue was finally dried in an oven at 103 °C up to constant weight [25].

Iron-chelating activity

The ferrous ion-chelating ability of *Ilex paraguariensis* infusions was determined by measuring the formation of the Fe^{2+} -ferrozine complex according to the method proposed by Dinis, Madeira, and Almeida [26]. Briefly, 15 μL of 2 mM FeSO_4 was added to 20 μL of the *Ilex paraguariensis* infusion and the reaction was initiated by the addition of 15 μL ferrozine solution (5 mM). The mixture was left to stand at room temperature for 5 min. The absorbance of the solution was there after measured at 562 nm (Microplate reader Epoch Biotek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA). The percentage of inhibition of the ferrozine- Fe^{2+} complex formation was calculated as $[(A_0 - A_s)/A_s] * 100$, where A_0 is the control absorbance and A_s is the infusion absorbance. The control contained all reagents except the *Ilex paraguariensis* infusion. The standard metal chelator agent used in this assay was 200 mg/mL Na_2EDTA .

Total phenolic content quantification

The TPC of the *Ilex paraguariensis* infusions was determined according to the Folin-Ciocalteu procedure [27] with a UV-Vis spectrophotometer (Shanghai spectrum instruments Co., model SP-2000UV Shanghai Spectrum, Shanghai, China). An infusion aliquot (1 mL) was diluted to 50 mL of ultrapure water. An external calibration curve with chlorogenic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at concentrations between 7.8 and 500

µg/mL was used ($r^2 = 0.99$). TPC was expressed in mg of chlorogenic acid equivalents (CAE) per mL of infusion.

Identification and quantification of phenolic compounds

The chromatographic analysis was performed in a Shimadzu LC-10 high-performance liquid chromatography (HPLC) system, equipped with a reverse-phase column (Shim-pack C₁₈, 4.6 mm Ø x 250 mm), guard column (Phenomenex C₁₈ 4 mm Ø x 2 mm, 5 µm) and an UV-Vis detector (Shimadzu SPD 10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) set at 325 nm.

Ilex paraguariensis infusion was centrifuged (1.000 x g, 10 min, 25 °C), filtered in 0.45 µm membranes (Merck Millipore, USA) and 20 µL were injected into the column. The chromatographic conditions for the gradient were described by Farah, De Paulis, Trugo, and Martins [28], and modified by Alves, 2016 [29] as follows: Eluent A: 80% 10 mM citric acid solution, pH 2.5, adjusted with 6 N hydrochloric acid, and 20% methanol. Eluent B: methanol. Gradient: Eluent A, 100% to 80% during 15 min; 80% during 10 min additional and; 80% to 100% for 5 min. The flow rate was 1 mL/min and run time 30 min.

The identification of phenolic acids was carried out by comparing the retention time and absorption spectra of *Ilex paraguariensis* infusion peaks with standard compounds. The quantification of the CGAs was based on calibration curves ($r^2 = 0.99$) of each identified compound in the infusion. The standard compounds 3-caffeoylquinic acid (3-CQA) (≥ 98%), 4-caffeoylquinic acid (4-CQA) (≥ 98%), 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) (≥ 98%), 3,5-di-caffeoylquinic acid (3,5-di-CQA) (≥ 95%), and 4,5-di-caffeoylquinic acid (4,5-di-CQA) (≥ 85%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Mean and standard deviation (n = 3) were calculated.

An *in silico* analysis carried out using the software Prediction of Activity Spectra for Substances (PassOnline) (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>) [30] was used to assess whether the 3-, 4-, 5-, 3,5-, or 4,5-caffeoylquinic acids could be candidates to complex with iron.

Subjects and study design

The iron absorption was measured based on the serum iron response after ingestion of a meal containing a high amount of bioavailable iron (11.4 mg, as described below). This preliminary controlled, randomized, and crossover trial was carried out with three healthy subjects (two male, aged 26 and 38 y-old; and one female, 26 y-old). The inclusion criteria were adults with no clinical diseases, including the presence of acute or chronic infection, iron overload disease or anemia, no history of gastrointestinal illness, body mass index (BMI) < 30 kg/m², non-alcoholic, no use of medicines or dietary supplements, and with haematological and serum biochemical routine laboratory results within the normal ranges, including haemoglobin, serum iron and ferritin, C-reactive protein, and liver enzymes. Women in their menstrual phase of the cycle were excluded from this study. Written informed consent was obtained for all persons prior their inclusion in the study, according to the Declaration of Helsinki and the study was approved by the Federal University of Santa Catarina Ethics Committee (CAAE: 64252017.2.0000.0121).

All subjects were instructed to maintain their habitual diet and physical activity and not to intake alcoholic beverages, beverages with *Ilex paraguariensis*, teas and coffee 24 h before each study day. Compliance for dietary instructions was carried out through a 24 h dietary recall. The subjects were requested not to practice any physical activity in the morning of the study.

In a cross-over design, after a fasting overnight, the subjects randomly ingested a meal containing 11.4 mg non-haem iron and either 200 mL water (control) or *Ilex paraguariensis* leaf infusion (30 g leaves/300 mL water, containing 18.1 mg/mL TPC). A washout period of one week was used between each control and *Ilex paraguariensis* infusion. Sample blood was obtained immediately before and at 1, 2, 3 and 4h after the ingestion of the meal and beverages.

Test meal

The test meal consisted of a mashed potato (300 g) containing 391 kcal energy; calcium 9.08 mg and 11.4 mg of non-haem iron (1.4 mg endogenous iron plus 10 mg as FeSO₄). The total iron content was determined in triplicate according to method 944.02a [31]. The *Ilex paraguariensis* infusion was prepared and immediately served to subjects. For the study, only glass and disposable plastic utensils were used.

Biochemical and hematological analysis

Blood samples were drawn by vein puncture with vacuum system (Vacutainer, BD, São Paulo, SP, Brazil) into tubes with or without ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), for the baseline analysis. For the

serum iron measurement, blood was collected in tubes containing clot activator without EDTA. Serum and plasma were obtained by centrifugation (1000 x g, 10 min, at 4°C) and the samples were analyzed in automated equipment (Dimension RXL Max Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Deerfield, IL, USA, and Sysmex XE-2100D Kobe, Japan). For the iron absorption analysis, the parameters derived from the serum iron curves, area under the serum curve (AUC) calculated using the trapezoidal method, the maximum increase in serum iron concentration (Δ iron max), and the percentage iron recovery at maximum peak, were used. The AUC_{0-4h} was calculated in GraphPad Prism v. 6.01 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation or as mean \pm standard error of mean. The one-way analysis of variance (ANOVA) or the repeated measure-ANOVA and Tukey *post-hoc* test were used for differences detection. Association between TPC and iron chelating activity was evaluated using simple linear regression analysis. All statistical analyses were performed at the significance level of $p < 0.05$ using SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Infusion time and its effect on the extraction of total soluble solids, TPC, and iron chelating activity of *Ilex paraguariensis* leaves

Our results revealed a significant improvement of total soluble solids ($p < 0.02$) and TPC ($p < 0.001$) at 10 min infusion time for *Ilex paraguariensis* leaves in comparison with 2.5 and 5.0 min (Table 1).

Table 1. Infusion time and its effects on the extraction of total soluble solids, total phenolic compounds and iron chelating activity of *Ilex paraguariensis* leaves.

Infusion time (min)	Total soluble solids (mg/mL) *	Total phenolic (mg CAE/mL) **	Iron chelating (%)***
2.5	19.53 \pm 0.94 ^a	5.40 \pm 0.58 ^a	94.37 \pm 1.55 ^a
5.0	23.56 \pm 0.98 ^b	7.03 \pm 0.65 ^a	97.17 \pm 2.24 ^{ab}
10.0	29.24 \pm 1.80 ^c	18.48 \pm 2.52 ^b	99.06 \pm 1.70 ^b
Positive Control (200 mg/mL Na ₂ EDTA)		---	99.55 \pm 0.20 ^b

Results are expressed as mean \pm standard deviation of three determinations in triplicate. Mean values in the same column followed by different lower-case letters are significantly different *($p < 0.02$); **($p < 0.0001$); ***($p < 0.05$); ANOVA and *post-hoc* Tukey's test. Ultrapure water at 80 \pm 1 °C (100 mL) was added to 10 g leaves of *Ilex paraguariensis*. CAE, chlorogenic acid equivalent.

The *Ilex paraguariensis* leaf infusion prepared at 2.5 min infusion time had 94% iron-chelating capacity and with a significantly higher iron-chelating activity at 10 min extraction ($> 99\%$; $p < 0.05$) (Table 1). This result of iron-chelating close to 100% was comparable to the positive standard control Na₂EDTA (99.5%) (Table 1). Therefore, 10 min infusion time was chosen for further infusion preparations and assays.

Effect of water volume on the extraction of TPC of *Ilex paraguariensis* leaf infusions

Although all the infusions were prepared with the same proportion of leaves/water (100 mg/mL) and initial water temperature (80 °C) during 10 min infusion, TPC was significantly higher for the water volume of 300 mL in comparison to 50 mL ($p < 0.002$) and 100 mL ($p < 0.0001$). In addition, a significantly higher final temperature of 63.2 \pm 1.0 °C was observed for the 300 mL volume infusion after 10 min ($p < 0.0001$) (Figure 1).

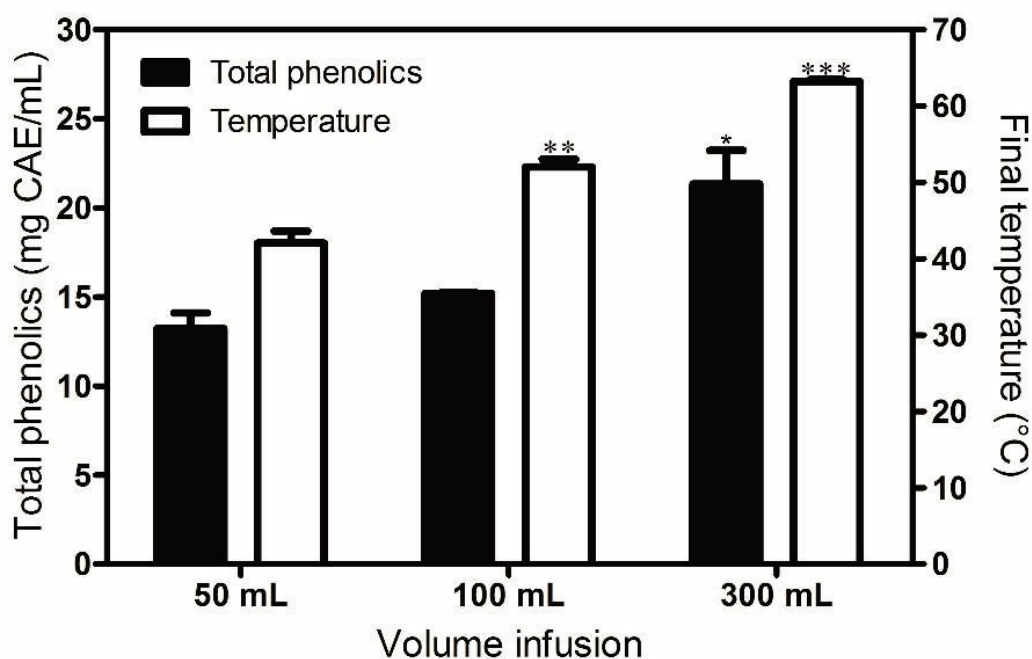


Figure 1. The effect of water volume on the extraction of total phenolic compounds of *Ilex paraguariensis* leaf infusions. The extractions were prepared at the same proportion w/v (100 mg/mL): 5 g/50 mL; 10 g/100 mL; and 30 g/300 mL. The initial temperature for all infusions was 80 ± 1 °C. Results are expressed as mean \pm standard deviation of three determinations in triplicate. ** $p < 0.002$ compared to 50 mL, * $p < 0.0001$ compared to 50- and 100 mL volumes (ANOVA followed by Tukey test). CAE, chlorogenic acid equivalent.

Stability of total phenolic content and the iron-chelating activity

After 24 h storage, a significant decrease in the TPC of *Ilex paraguariensis* infusion was observed, regardless of temperature, 22.5% at 8 °C and 24.5% at 25 °C; $p < 0.05$ compared to control (Table 2).

Table 2. Stability of total phenolic content and the iron-chelating activity of *Ilex paraguariensis* leaf infusion

Time (h)	Total Phenolic (mg/mL)	Iron chelating (%)
Zero (control)	18.11 ± 0.27^a	99.38 ± 1.78^a
After 24 h (8 °C)	14.04 ± 0.52^b	99.12 ± 1.53^a
After 24 h (25 °C)	13.68 ± 0.89^b	100.00 ± 0.00^a

Results are expressed as mean \pm standard deviation of three determinations in triplicate. Mean values in the same column followed by different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$). (Repeated measure-ANOVA followed by Tukey test). Ultrapure water at 80 ± 1 °C (300 mL) was added to 30 g of *Ilex paraguariensis* leaves.

The present data also indicated a decrease of up to 24.5% (from 18.1 to 13.7 mg/mL) of total phenols in the *Ilex paraguariensis* leaf infusions, but that did not reflect any change in the iron chelating activity (Table 2). Figure 2a shows a saturating effect of the *Ilex paraguariensis* phenolic compounds on the iron chelating activity starting from a certain concentration of TPC (3.34 mg/mL), and the linear regression analysis revealed a significant association between TPC and the iron chelating activity ($r^2 = 0.87$; $p < 0.01$) for *Ilex paraguariensis* infusions containing up to 3.34 mg CAE/mL TPC (Figure 2b; $y = 16.83x + 21.68$).

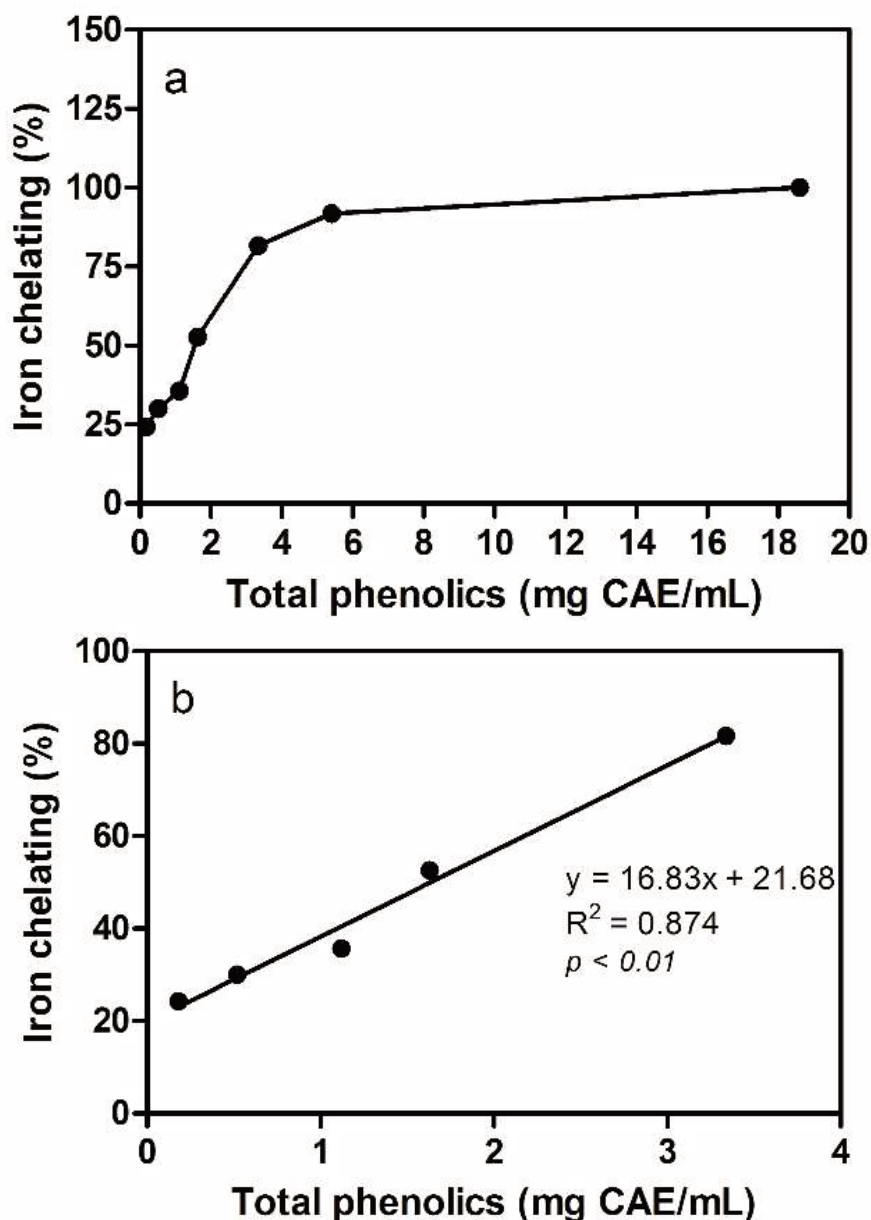


Figure 2. Association (a) and linear regression (b) between total phenolic content (mg CAE/mL) and the iron chelating activity (%) of *Ilex paraguariensis* leaf infusions. Results are expressed as mean of three determinations in triplicate. Infusions were prepared at 2.5-100 mg/mL proportions of leaves/water. CAE, chlorogenic acid equivalent.

Content and stability of chlorogenic acids of *Ilex paraguariensis* leaf infusions

Chlorogenic acids were identified and quantified in the *Ilex paraguariensis* infusion with the greatest TPC (18.1 mg/mL) and iron chelating activity (99.4%) (i.e., 30 g of leaves per 300 mL of water at 10 min extraction). The 3-caffeoylquinic acid was present in the highest content (9.99 ± 0.66 mg/mL) followed by the 3,5-di-caffeoylquinic acid (5.64 ± 0.26 mg/mL) ($p < 0.002$). 5-Caffeoylquinic (2.17 ± 0.27 mg/mL), 4-caffeoylquinic (2.45 ± 0.3 mg/mL), and 4,5-di-caffeoylquinic acids (1.74 ± 0.19 mg/mL) showed similar contents.

Results of the stability of chlorogenic acids present in the *Ilex paraguariensis* leaf infusion concerning time and temperature are provided in Figure 3. The three mono-caffeoylquinic acids (3-CQA, 4-CQA, and 5-CQA) were stable at 8 °C for an analysed period of 24 h. However, in comparison to time zero, at 25 °C all mono-caffeoylquinic acids showed significant decrease by 16.0-25.2% after 24 h ($p < 0.05$). Furthermore, significant reductions were also observed for 3,5-diCQA (21.9-30.6%) and 4,5-diCQA (21.6-27.9%) after 24 h at 8 or 25 °C ($p \leq 0.01$). After 24 h, there were no significant differences between 8 and 25 °C for all mono-caffeoylquinic acids and di-caffeoylquinic acids declines.

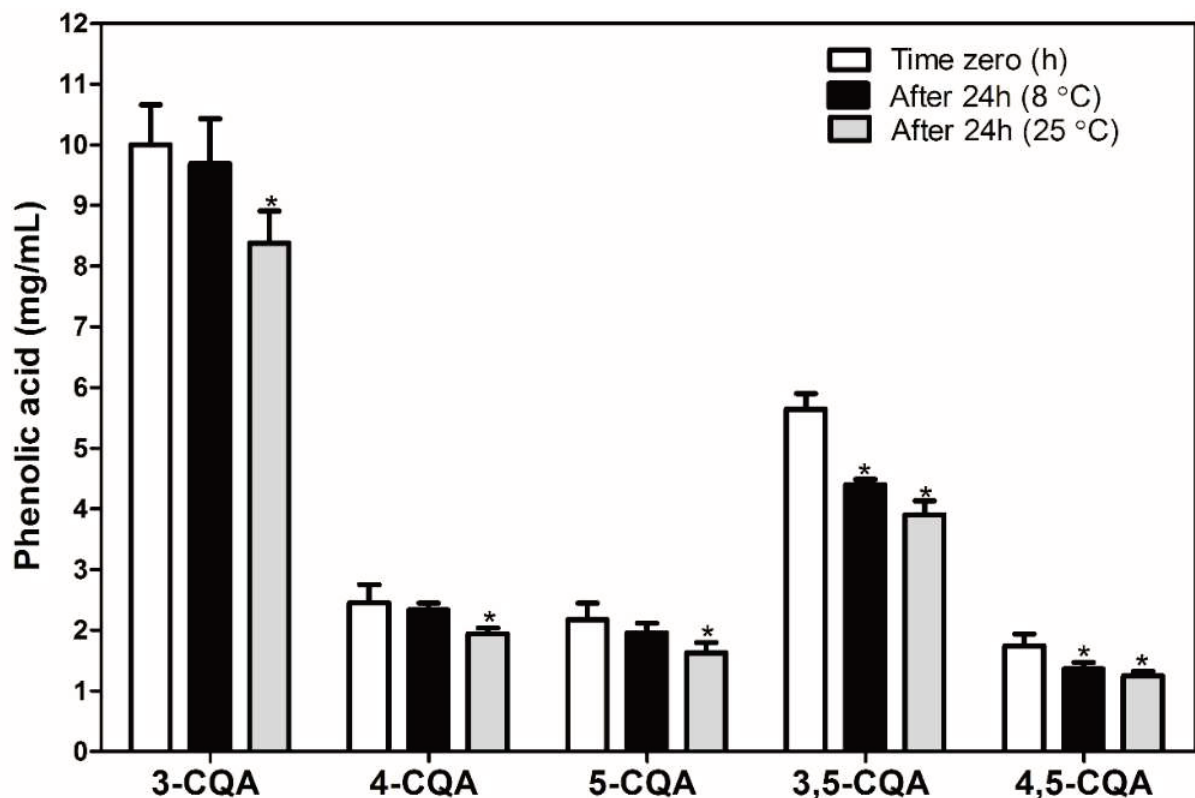


Figure 3. Stability of mono-caffeoylquinic acids (3-CQA, 4-CQA, and 5-CQA) and di-caffeoylquinic acids (3,5-diCQA and 4,5-diCQA) of *Ilex paraguariensis* leaf infusion. Results are expressed as mean \pm standard deviation of three determinations in triplicate. * $p < 0.05$ compared to time zero (RM-ANOVA and Tukey's test). There were no differences between 8 °C and 25 °C. Ultrapure water at 80 ± 1 °C (300 mL) was added to 30 g leaves of *Ilex paraguariensis*.

Effect of *Ilex paraguariensis* infusion on iron absorption in humans

The intake of a test meal enriched with iron promoted an expressive increase in the levels of serum iron up to 4 h. Intake of the meal with *Ilex paraguariensis* infusion showed a substantial reduction in the dietary iron absorption in comparison to water (control) (Figure 4). Based on the parameters derived from the serum iron curves, the *Ilex paraguariensis* infusion inhibited the iron absorption by approx. 80%, in average (Table 3).

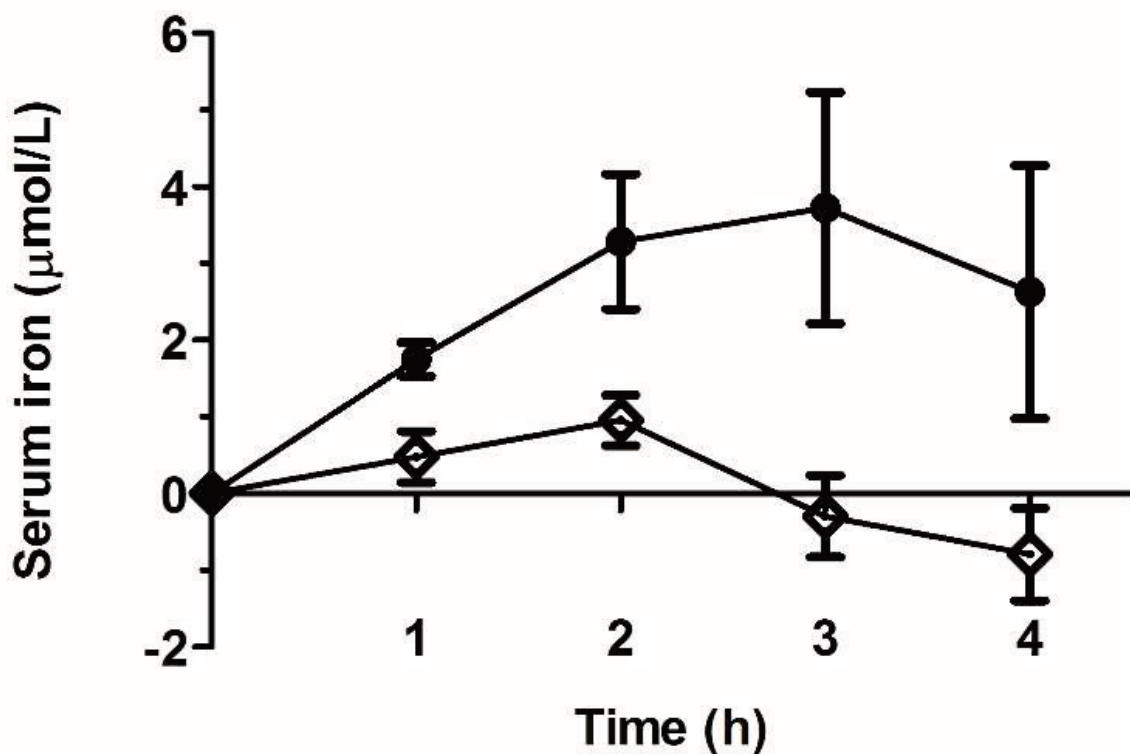


Figure 4. Serum iron curves in healthy subjects (n = 03), after ingestion of a single meal containing 11.4 mg non-haem iron (1.4 mg endogenous and 10 mg added as ferrous iron). Values are means \pm SEM. ● Water; ◇ *Ilex paraguariensis* leaf infusion. *Ilex paraguariensis* infusion prepared at 30 g leaves/300 mL water containing 18.1 mg/mL of total phenols.

Table 3. Parameters derived from serum iron curves and used as indicators of iron absorption in healthy subjects.

Parameters	Water (control)	<i>Ilex paraguariensis</i> infusion [†]	Inhibition (%)
AUC _{0-4h} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)	608.9 \pm 194.4	118.4 \pm 51.8	80.5
Δ iron max. ($\mu\text{mol/L}$)	3.84 \pm 0.75	0.78 \pm 0.24	79.7
Iron recovery (% at peak max.)	5.13 \pm 0.87	1.11 \pm 0.37	78.4

Values are expressed as mean \pm SEM (n = 3). [†]Prepared with 30 g leaves/300 mL water, which contain 18.1 mg/mL of total phenols. AUC_{0-4h}: Area under the curve; Δ iron max.: Maximum increase in serum iron. Statistical tests were not applied due to the small sample size.

DISCUSSION

Herbal infusions are typically consumed after contact time herb/hot water during 10 min or less [3,32]. Our results suggested that a better solubility of phenolic compounds of *Ilex paraguariensis* infusion depends on a longer contact time of leaves with water, in agreement with previous data reported for toasted mate tea [15] and for traditional beverage with *Ilex paraguariensis* (“chimarrão” or “mate”) prepared with minced commercial leaves and stems [16].

Regarding the iron-chelating activity, the present study showed a high value (Table 1) for this plant. A similar result was reported by Colpo and coauthors [10] in a study where the iron chelating activity of *Ilex paraguariensis* aqueous extract, prepared in the same way as that of the traditional “mate” consumed in South America, was approximately 80%. In relation to the effect of the water volume over the extraction of the phenolic compounds during the preparation of the infusion of *Ilex paraguariensis* leaves (Figure 1), our finding gives rise to the hypothesis that a higher volume of hot water improved TPC extraction as result of a slower cooling during infusion time. A similar effect was described for *Camellia sinensis* tea [32].

Altogether, our results confirmed the higher solubility of the phenolic compounds from *Ilex paraguariensis* in hot water [16]. However, in spite of the increased amount of phenolic content extracted at high temperature, it should be noted that consumption of very hot (> 65 °C) beverages such as tea, coffee, and *Ilex paraguariensis* may increase the risk of esophageal cancer [33]. Therefore, the present results showed a method of preparing *Ilex paraguariensis* leaf infusions that can be used by consumers with the highest levels of TPC and iron chelating activity with an immediately final safe temperature of 63.2 °C, i.e., 10 min infusion time and water volume of 300 mL with an initial temperature of 80 °C.

In order to verify the preservation of the properties investigated in this study, the stability of the phenolic compounds and the iron-chelating activity were evaluated after 24 hours at room temperature and under refrigeration. Studies in plants with abundant phenolic acids, such as coffee [34] and powdered sweet potato dissolved in water [35] reported that oxygen was the most important factor for TPC losses, and temperature can also play a role. According to our results, the storage time of 24 h affected TPC stability to a greater extent than the temperature did.

The ability to chelating iron ions has been attributed to phenolic compounds such as chlorogenic acids [36,37]. The stability of chelating activity against iron in the infusion (Table 2) can be explained by a saturating effect of the *Ilex paraguariensis* phenolic compounds on the iron-chelating activity observed at a relatively low amount of TPC (Figure 2a). On the other hand, the linear regression analysis showed a significant association between TPC and the iron chelating activity for *Ilex paraguariensis* infusions containing up to 3.34 mg CAE/mL TPC (Figure 2b), indicating that most of the iron-chelating activity could be explained by the phenolic compounds effect. Based on these results, we can explain the absence of an association between TPC and the iron-chelating activity of *Ilex paraguariensis* extracts reported by Colpo and coauthors [10] taking into account that the authors used extracts with higher amounts of total phenolic compounds.

As for the chlorogenic acids detected and their concentration, the results obtained are in agreement with what is reported in the literature for *Ilex paraguariensis*. [1, 14, 16, 38].

The present study showed the instability of the majority of phenolic acids in *Ilex paraguariensis* infusion, e.g., the mono-caffeoylquinic and the di-caffeoylquinic acids after 24 h at 25 °C. These findings are coherent with the results for TPC stability (Table 2), which was measured using a colorimetric assay. Takenaka and coauthors [35] also showed that the CGAs (mono- and di-caffeoylquinic acids) content of powdered sweet potato dissolved in water had decreased after 1 h at room temperature.

The losses found in CGAs after 24 h at 25 °C indicated that *Ilex paraguariensis* infusions were more sensitive at room temperature and, for this reason, this infusion should be consumed as soon as possible after preparation, or stored in a refrigerator (8 °C) to preserve part of the CGAs (Figure 3). However, for iron-chelating purposes, e.g., iron overload diseases, and based on our *in vitro* results, it seems irrelevant the temperature for consumption of *Ilex paraguariensis* infusions, whether refrigerated or at room temperature within 24 h.

An *in silico* analysis carried out using the software PassOnline showed that the 3-, 4-, 5-, 3,5-, and 4,5-caffeoylquinic acids are strong candidates to complex with iron (data not shown). In general, phenolic acids of the chlorogenic acid family have an antioxidant effect due in part to their iron-chelating properties [36,39,40]. Indeed, the complexation of iron with caffeoylquinic acids has been considered as an antioxidant mechanism, since complexed iron does not have the ability to promote the generation of reactive oxygen species (ROS), such as hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) formed in the Fenton reaction [12,36,40]. Evaluating the iron chelation abilities, Andjelković and coauthors [39] showed that hydroxycinnamic acids, such as the CGAs, have higher complex formation capability than hydroxybenzoic acids (gallic and protocatechuic acids).

There are references in the literature about the iron-chelating property of mono-caffeoylquinic acids and di-caffeoylquinic acids, involving studies conducted with UV-visible spectroscopy, electron spin resonance (ESR) spectroscopy, and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. This property has been attributed to (1) a more complex structure in comparison with other phenolic acids (such as the hydroxybenzoic acid derivatives), which involves caffeic acid linked to quinic acid; (2) the ethylene group present in the structures of caffeoylquinic acids, which affects favorably their capacity to be a metal chelator, and (3) the presence of hydroxyl groups, with electron-donating abilities [36,39,40]. The quantity and position of hydroxyl groups affect the iron-chelating activity of these phenolic acids. Dihydroxy groups linked with an aromatic ring in the ortho position, referred to as catechol group, improve iron-chelating activity [39]. The caffeoylquinic acids in the *Ilex paraguariensis* leaf infusion contain dihydroxy groups that have these characteristics and are the binding site of iron in the molecules (Figure 5). Phenolic acids without any catechol groups for hydroxycinnamic acids derivatives or without any galloyl groups for hydroxybenzoic acid derivatives have not shown any complexation with iron [39]. Furthermore, the 4,5-caffeoylquinic acid is an adjacent di-caffeoylquinic acid. Di-caffeoylquinic acids that contain caffeoyl moieties in adjacent position show a more effective iron chelating activity. These acids have more ability to encircle the iron from the chelation reaction in comparison with non-adjacent di-caffeoylquinic acids [40].

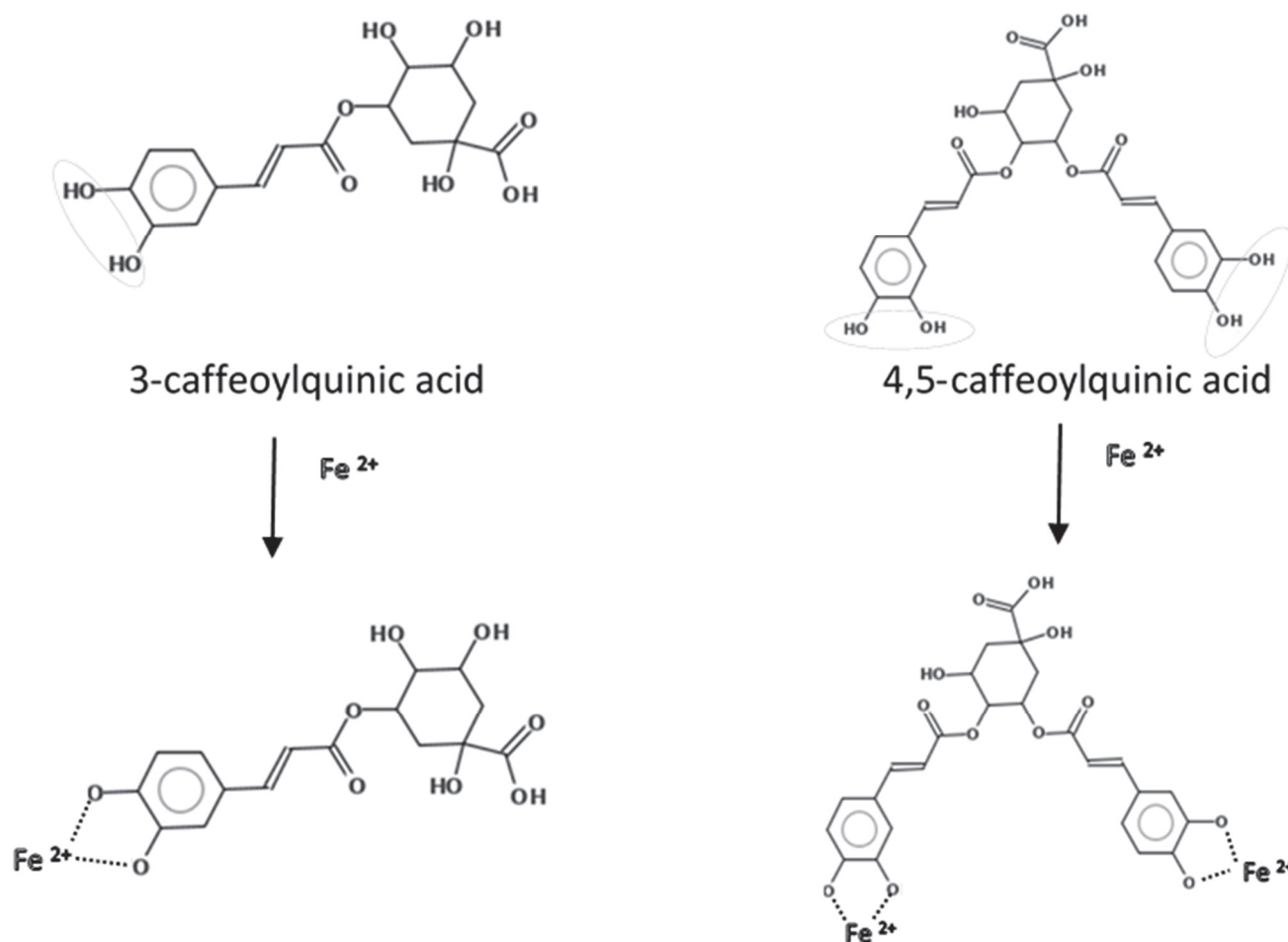


Figure 5. Structures of two caffeoylquinic acids found in the *Ilex paraguariensis* leaf infusion and the binding site of iron proposed, according to the literature [36,39,40].

Although transition metals besides Fe^{+2} , e.g. Zn^{+2} , Cu^{+2} , and Mn^{+2} , could be complexed by compounds which have metal-chelating properties [41], the quantities of metal ions and phenolic compounds, and the differences in solubility of several foods and beverage sources of minerals could affect differently the complexation with transition metals [40,42,43]. Afsana and coauthors [42] showed an effect of ingesting tannic acid on the decrease of iron absorption, but not on the absorption of zinc, copper, and manganese. Borowska and coauthors [44] reported that the Aronia berries extract, as well as cyanidin 3-O- β -galactoside and quercetin, can bind Zn^{+2} and Cu^{+2} , but only at pH 5.5. The lead (toxic metal) complexation by 5-CQA was shown *in vitro* in aqueous solution by jointly using UV-visible absorption spectroscopy and quantum chemical calculations [45]. Considering the biological importance of transition metals, when in suitable concentrations in the body, it should be investigated whether *Ilex paraguariensis*, as well as their caffeoylquinic acids, has an affinity for other transition metals.

In relation to the preliminary *in vivo* data, to our knowledge, no study in healthy subjects has been published on the potential of *Ilex paraguariensis* infusion to inhibit iron absorption after ingestion of a meal. Three healthy subjects ingested a meal enriched with non-haem iron (11.4 mg) with 200 mL water (control) or *Ilex paraguariensis* infusion in a preliminary crossover trial. The measurement of the serum iron up to 4 h after intake clearly showed that the *Ilex paraguariensis* infusion promoted an expressive inhibition of the dietary iron absorption (Figure 4) by, in average, 81% AUC, 80% Δ iron maximum, and 78% iron recovery at peak maximum (Table 3).

Considering the variable percentage iron recovery, our results with *Ilex paraguariensis* infusion (1.11%) and water (5.13%; Table 3) were very similar to black tea in a study that evaluated the inhibition of non-haem iron absorption in 10 healthy volunteers (6 M and 4 F) [46]. In that study, an iron-fortified bread consumed with water showed 4.46% iron recovery and 0.92% for black tea.

Non-haem iron is the mainly source of iron in the diet [47]. Therefore, plant food or infusions with a potential to reduce iron absorption at 50% or more in humans have been considered a potent iron absorption inhibitor [46], which might be interesting for iron overload treatment.

Caffeoylquinic acids are bioactive compounds widely present in plants, which have also shown to be sources of minerals, including transition metals, such as iron [14,48]. Considering that an adult under normal condition needs to absorb only 10% of the usual dietary iron (10-20 mg/day), in which 2/3 are obtained from plants, caffeoylquinic acids in plant food or beverages could favorably contribute to iron absorption modulation, without affecting iron homeostasis, given that human body does not have an efficient mechanism to excrete iron [49,50]. In the present study, the extraction of compounds from *Ilex paraguariensis* was optimized to enhance the iron-chelating activity of this plant.

It has been highlighted the iron-chelating properties of *Camellia sinensis* infusions (black tea and green tea), and the importance to investigate natural iron-chelating for chronic iron overload diseases [20,51]. In this context, we introduced the *Ilex paraguariensis* leaf infusion as a new and potential iron-chelating adjuvant.

CONCLUSION

The studied *Ilex paraguariensis* infusion, rich in phenolic compounds, promoted a complexation with iron *in vitro*, with probable involvement of caffeoylquinic acids, and it is suggested that a similar effect may occur *in vivo*, decreasing the iron absorption in healthy individuals. Therefore, our results showed an innovative research area for the *Ilex paraguariensis* infusion as a natural iron-chelating agent. Furthermore, we showed that the commonly used infusion time and water volume affected the extraction of phenolic compounds and the iron-chelating activity of *Ilex paraguariensis* infusion, which has a saturating effect at low total phenol content. Consequently, the *Ilex paraguariensis* infusion was highly stable at room temperature for the iron-chelating activity. Based on these results, it is suggested that short-term and/or long-term studies should be carried out to investigate the *in vivo* iron chelating properties in humans with iron overload diseases.

Funding: This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES), grant number 001”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

REFERENCES

1. Heck CI, De Mejia EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007 Nov;72(9):R138-51. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>.
2. Cardozo Junior EL, Morand C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. *J Funct Foods.* 2016 Mar;21:440-54. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.010>.
3. Baeza G, Sarriá B, Bravo L, Mateos R. Polyphenol content, *in vitro* bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages. *J Sci Food Agric.* 2018 Mar;98(4):1397-406. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8607>.
4. Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Jul;224(2):338-44. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1030>.
5. Da Silva EL, Neiva TJC, Shirai M, Terao J, Abdalla DSP. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Res Int.* 2008 Dec;41(10):973-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.08.004>.
6. De Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-Cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *J Agric Food Chem.* 2009 Sep;57(18):8316-24. <https://doi.org/10.1021/jf901660g>.
7. Klein GA, Stefanuto A, Boaventura BC, et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. *J Am Coll Nutr.* 2011 Oct;30(5):320-32. <https://doi.org/10.1080/07315724.2011.10719975>.
8. Panza VP, Brunetta HS, de Oliveira MV, Nunes EA, da Silva EL. Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on the expression of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47^{phox} and on circulating inflammatory cytokines in healthy men: a pilot study. *Int J Food Sci Nutr.* 2019 Mar;70(2):212-21. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1486393>.
9. Cahuê F, Nascimento JHM, Barcellos L, Salerno VP. *Ilex paraguariensis*, exercise and cardioprotection: a retrospective analysis. *J Funct Foods.* 2019 Feb;53:105-8. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.008>.
10. Colpo AC, Rosa H, Lima ME, et al. Yerba mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: how successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chem.* 2016 Oct;209:185-95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.059>.
11. Hofer T, Marzetti E, Xu J, et al. Increased iron content and RNA oxidative damage in skeletal muscle with aging

- and disuse atrophy. *Exp Gerontol*. 2008 Jun;43(6):563-70. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.02.007>.
12. Imam MU, Zhang S, Ma J, Wang H, Wang F. Antioxidants mediate both iron homeostasis and oxidative stress. *Nutrients*. 2017 Jun;9(7):1-19. <https://doi.org/10.3390/nu9070671>.
 13. Jiao Y, Wilkinson IVJ, Di X, et al. Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood*. 2009 Jan;113(2):462-9. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-155952>.
 14. Pagliosa CM, Vieira MA, Podestá R, et al. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *Food Chem*. 2010 Sep;122(1):173-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.040>.
 15. Da Silveira TFF, Meinhardt AD, Ballus CA, Godoy HT. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study. *Food Res Int*. 2014 Jun;60:241-5. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.024>.
 16. Gebara KS, Gasparotto-Junior A, Santiago PG, et al. Daily intake of chlorogenic acids from consumption of Maté (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) traditional beverages. *J Agric Food Chem*. 2017 Nov;65(46):10093-100. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04093>.
 17. Vieira MA, Maraschin M, Rovaris AA, et al. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Addit Contam - Part A*. 2010 Mar;27(6):776-82. <https://doi.org/10.1080/19440041003587310>.
 18. Yatsu FKJ, Borghetti GS, Bassani VL. Technological characterization and stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) spray-dried powder. *J Med Food*. 2011 Mar;14(4):413-9. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0044>.
 19. Molin RF, Dartora N, Borges ACP, Gonçalves IL, Di Luccio M, Valduga AT. Total phenolic contents and antioxidant activity in oxidized leaves of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). *Brazilian Arch Biol Technol*. 2014 Nov;57(6):997-1003. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402305>.
 20. Kaltwasser J, Werner E, Gottschalk R, et al. Clinical trial on the effect of regular tea drinking on iron accumulation in genetic haemochromatosis. *Gut*. 1998;43(5):699-704. <https://doi.org/10.1136/gut.43.5.699>.
 21. Kim EY, Ham SK, Shigenaga MK, Han O. Bioactive dietary polyphenolic compounds reduce nonheme iron transport across human intestinal cell monolayers. *J Nutr*. 2008 Sep;138(9):1647-51. <https://doi.org/10.1093/jn/138.9.1647>.
 22. Tyagi P, Kumar Y, Gupta D, Singh H, Kumar A. Therapeutic advancements in management of iron overload - A review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2015 Jan;7(8):43-52. ISSN-0975-1491.
 23. Chadare FJ, Idohou R, Nago E, et al. Conventional and food-to-food fortification: an appraisal of past practices and lessons learned. *Food Sci Nutr*. 2019 Aug;7:2781-95. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1133>.
 24. Boado LS, Fretes RM, Brumovsky LA. Effects of *Ilex paraguariensis* polyphenols on magnesium absorption and iron bioavailability: Preliminary study. *J Food Res*. 2018;7(2):114-26. <https://doi.org/10.5539/jfr.v7n2p114>.
 25. Astill C, Birch MR, Dacombe C, Humphrey PG, Martin PT. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J Agric Food Chem*. 2001 Oct;49(11):5340-7. <https://doi.org/10.1021/jf010759+>.
 26. Dinis LM, Madeira TCP, Almeida, V. Action of phenolic derivatives [acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate] as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*. 1994;315(1):161-9.
 27. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144-58.
 28. Farah A, De Paulis T, Trugo LC, Martin, PR. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J Agric Food Chem*. 2005 Feb;53(5):1505-13. <https://doi.org/10.1021/jf048701t>.
 29. Alves TL. Detecção de metabólitos do ácido clorogênico e metilxantinas em plasma e urina de indivíduos saudáveis após a ingestão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.) [dissertation]. Florianópolis (SC) Brazil: Federal University of Santa Catarina; 2016. 114 p.
 30. Srinivas N, Sandeep KS, Anusha Y, Devendra BN. *In vitro* cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: an *in silico* approach. *Int Invent J Biochem Bioinforma*. 2014 Mar;2(2):20-9.
 31. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 20th ed. Gaithersburg: AOAC Int; 2016.
 32. Nishiyama MF, Costa MAF, Costa AM, et al. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. *Ciência e Tecnol Aliment*. 2010 May;30(003582):191-6. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500029>.
 33. Okaru AO, Rullmann A, Farah A, De Mejia, EG, Stern MC, Lachenmeier DW. Comparative oesophageal cancer risk assessment of hot beverage consumption (coffee, mate and tea): The margin of exposure of PAH vs very hot temperatures. *BMC Cancer*. 2018 Mar;18(1):1-13. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4060-z>.

34. Vicente SJV, Queiroz YS, Gotlieb SLD, Torres EAFS. Stability of phenolic compounds and antioxidant capacity of regular and decaffeinated coffees. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2014 Jan;57(1):110-8. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100016>.
35. Takenaka M, Nanayama K, Isobe S, Murata M. Changes in caffeic acid derivatives in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) during cooking and processing. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006 May;70(1):172-7. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.172>.
36. Kono Y, Kashine S, Yoneyama T, Sakamoto Y, Matsui Y, Shibata H. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998;62(1):22-7. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.22>.
37. Tuntipopipat S, Judprasong K, Zeder C, et al. Chili, but not turmeric, inhibits iron absorption in young women from an iron-fortified composite meal. *J Nutr.* 2006 Dec;136(12):2970-4. <https://doi.org/10.1093/jn/136.12.2970>.
38. Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia.* 2001 Nov;72(7):774-8. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00331-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00331-8).
39. Andjelković M, Van Camp J, De Meulenaer B, et al. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem.* 2006 Jul;98(1):23-31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.044>.
40. Li X, Li K, Xie H, et al. Antioxidant and cytoprotective effects of the Di-O-Caffeoylquinic acid family: the mechanism, structure–activity relationship, and conformational effect. *Molecules.* 2018 Jan;23(1):1-12. <https://doi.org/10.3390/molecules23010222>.
41. Dehariya R, Chandrakar J, Dubey S, Ojha K, Dixit AK. Scavenging and metal chelating potential of *Carthamus tinctorius* L. extracts. *Curr Bot.* 2020 May;11:43-50. <https://doi.org/10.25081/cb.2020.v11.6009>.
42. Afsana K, Shiga K, Ishizuka S, Hara H. Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68(3):584-92. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.584>.
43. Lobbes H, Gladine C, Mazur A, et al. Effect of procyanidin on dietary iron absorption in hereditary hemochromatosis and in dysmetabolic iron overload syndrome: a crossover double-blind randomized controlled trial. *Clin Nutr.* 2020 Jan;39(1):97-103. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.02.012>.
44. Borowska S, Tomczyk M, Strawa JW, Brzóška MM. Estimation of the chelating ability of an extract from *Aronia melanocarpa* L. Berries and its main polyphenolic ingredients towards ions of zinc and copper. *Molecules.* 2020 Mar;25(7):1-15. <https://doi.org/10.3390/molecules25071507>.
45. Cornard J, Lapouge C, Dangleterre L, Allet-Bodelot C. Complexation of lead(II) by chlorogenic acid: Experimental and theoretical study. *J Phys Chem A.* 2008 Nov;112(48):12475-84. <https://doi.org/10.1021/jp805463p>.
46. Hurrell RF, Reddy M, Cook JD. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr.* 1999 Apr;81(4):289-95. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000537>.
47. Cozzolino SMF. Ferro. In: Henriques GS, Cozzolino SMF, editors. *Biodisponibilidade de nutrientes.* Brasil: Manole; 2005. p 569-95.
48. De Moraes MR, Ryan SM, Godoy HT, et al. Phenolic compounds and metals in some edible annonaceae fruits. *Biol Trace Elem Res.* 2020 Oct;197:676-82. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-02005-w>.
49. Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2017 Dec;106(Suppl):1559S-1566S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155804>.
50. Allen RP, Picchietti DL, Auerbach M, et al. Evidence-based and consensus clinical practice guidelines for the iron treatment of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease in adults and children: an IRLSSG task force report. *Sleep Med.* 2018 Jan;41:27-44. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.11.1126>.
51. Bordbar M, Pasalar M, Safaei S, et al. Complementary and alternative medicine use in thalassemia patients in Shiraz, southern Iran: a cross-sectional study. *J Tradit Complement Med.* 2018 Jan;8:141-6. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.05.002>.

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO

Pagliosa, C M; Vieira, F G K; Dias, B V; Franco, V K B; Ramos, H P; Silva, E L da. *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.) leaf infusion decreases iron absorption in patients with hereditary hemochromatosis: A randomized controlled crossover study **Food & Function** , 2021. DOI:10.1039/d1fo00482d

***Ilex paraguariensis* (A. St.-Hil.) leaf infusion decreases iron absorption in patients with hereditary hemochromatosis: A randomized controlled crossover study.**

Cristiane Manfê Pagliosa^a, Francilene Gracieli Kunradi Vieira^a, Bruno Vieira Dias^b, Vivian Karla Brognoli Franco^c, Hanna Pillmann Ramos^d, Edson Luiz da Silva^{a,d*}

^aPost-graduate Program in Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. ^bAmbulatory of the Hematology and Hemotherapy Center of Santa Catarina State, Florianópolis, Brazil. ^cHemotherapy Center of the University Hospital of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. ^dDepartment of Clinical Analyses, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

* Corresponding Author at: Department of Clinical Analyses, Post-Graduate Program in Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, 88040-370, Florianópolis, Brazil. Tel: +55-48-37212778. E-mail addresses: edson.silva@ufsc.br; dasilvael@hotmail.com (E. L. da Silva).

Abstract

This study proposed to investigate the effect of *Ilex paraguariensis* infusion on the absorption of non-heme iron in hereditary hemochromatosis (HH) patients with the *HFE* genotype. A two-way randomized, controlled, and crossover trial was conducted on patients, aged 29-69 years, undergoing maintenance therapy. Fourteen *HFE*-HH patients ingested a meal containing 11.4 mg iron and 200 mL either of water (control) or of *Ilex paraguariensis* leaf infusion. The beverages were offered in random order, at intervals separated by a *washout* period of 7 days. Active surveillance showed no adverse effects. Blood samples were drawn shortly before and 1, 2, 3, and 4 h after the meal for serum iron measurement. A significant reduction in the postprandial serum iron was observed for HH patients after intake of the *Ilex paraguariensis* infusion (area under the curve (AUC) expressed as mean \pm SEM: $173.3 \pm 44.7 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) compared to water ($1449.4 \pm 241.5 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) ($p < 0.001$). In summary, intake of *Ilex paraguariensis* leaf infusion significantly inhibited the absorption of iron in patients with HH and, therefore, should be considered as a potential adjuvant for iron overload control.

Keywords *Ilex paraguariensis* infusion; iron chelating; hereditary hemochromatosis; absorption; randomized controlled trial.

1. Introduction

Hereditary hemochromatosis (HH) is caused by homozygous p.Cys282Tyr mutation in the *HFE* gene, leading to a severe overload of iron in the human body.^{1,2} However, *HFE*-HH can also be caused by other mutations, whose penetrance tends to be rare and dependent on greater exposure to other factors.^{1,3-5} The liver-derived peptide hepcidin plays a critical role in the regulation of dietary iron absorption and iron export from the body tissues into the plasma. However, the inappropriately low production of the hormone hepcidin in *HFE*-HH patients leads to an increased intestinal absorption of iron in these subjects, which results in excessive iron deposits in the parenchymal cells, and also an increased risk of tissue and organ damage.³

Regular therapeutic phlebotomy remains the mainstay of the therapy to reduce iron stores and keep them at normal levels. However, phlebotomy is an invasive procedure and there are patients who do not tolerate treatment with recurrent phlebotomies.^{2,6} Therefore, alternative therapies have been investigated to help to manage and reduce the frequency of phlebotomies. In this context, it has been reported that black tea, which is rich in catechins⁷, and Milk Thistle (*Silybum marianum*, a source of the flavonolignan silybin)⁸ decreased the absorption of iron in *HFE*-HH patients.

Considering that *Ilex paraguariensis* leaf infusion has a high content of polyphenolic compounds, particularly chlorogenic acids (CGAs), which form complexes with iron *in vitro*⁹⁻¹¹, this study aims to investigate the effect of *Ilex paraguariensis* leaf infusion intake on the absorption of iron in *HFE*-HH patients.

2. Material and methods

2.1. Subjects

In this crossover study, 14 patients (12 males) with genetically confirmed autosomal recessive *HFE*-HH were recruited after an initial screening by direct contact from 50 potential volunteers, both homozygous and heterozygous, who were being treated either at the Ambulatory of the Hematology and Hemotherapy Center of Santa Catarina State (HEMOSC) or at the Hemotherapy Center of the University Hospital of the Federal University of Santa Catarina in Florianopolis-SC, Brazil. The selected patients (aged 29-69 years) were taking no drugs that affect iron absorption; were undergoing maintenance therapy (phlebotomy treatment to maintain serum ferritin within the normal range), but were not phlebotomized during the study (with a minimum interval of at least one month from the last phlebotomy); showed no presence of anemia; and were able to eat all of the proposed foods. The exclusion criteria were: patients with underlying malignancy, acute or chronic infection, secondary hemochromatosis (which also includes individuals with dysmetabolic iron overload syndrome (DIOS)), alterations in hepatic enzymes and in C-reactive protein levels, and patients who had made use of chelating substances 24h before the study, as well as women in their menstrual phase of the cycle or who were undergoing hormone therapy.^{8,12}

The study was approved by the Federal University of Santa Catarina Ethics Committee (CAAE: 64252017.2.0000.0121) and the Hematology and Hemotherapy Center of Santa Catarina State Committee (CAAE: 64252017.2.3001.0110) (both located in Florianopolis, SC, Brazil) and was registered as a controlled trial at www.ensaiosclinicos.gov.br and at <http://apps.who.int/trialsearch/> under number RBR-

5nrrwc. Before giving written consent to participate, all the volunteers were informed about the aim and procedures of the study, both verbally and in writing, according to the general recommendation of the Declaration of Helsinki.

2.2. Study design

The present clinical trial is a randomized, controlled, and crossover study, in which both beverages were offered in random order using computer-generated randomization, according to the Latin square method by an independent investigator. The randomization of the beverages minimizes the bias for the endpoints of the study, since no appropriate inert material is known to have sensory characteristics compatible with the *Ilex paraguariensis* leaf infusion. The patients were present at the laboratory of the Federal University of Santa Catarina between 07:30 a.m. and 08:00 a.m. after a 10-12 h overnight fasting on two non-consecutive mornings (7 days washout period), having abstained from alcohol, tea, coffee, infusions with mate (*Ilex paraguariensis*), and soda 24 h prior to that. The patients had also been asked to get a good night's sleep before the study and not to exercise on the morning of the study since these factors may affect serum iron levels.¹² Before blood collection, the patients rested in a seated position for 15 min. Blood samples were drawn by a qualified technician immediately before ingestion of a test meal fortified with ferrous iron, and then at 1, 2, 3 and 4 h after that. The blood was centrifuged (1000 x g, 10 min, at 4°C) to obtain serum. The analyses were immediately performed by an independent researcher who was blinded to group assignment, and the serum iron was determined according to the Ferrozine colorimetric method using commercial reagents and automated equipment (Dimension RXL Max – Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Deerfield, IL, USA).

On each test day, immediately after the first blood collection, the patients ingested the meal within the next 15 min and after that they ingested 200 mL water (control) or 200 mL *Ilex paraguariensis* leaf infusion (3.6 g total phenolic content of CGA equivalents). The patients expected to consume one of the two study beverages; however, they did not know which one they would drink on each test day. After ingesting the meal and the beverages, the patients remained seated and drank only water. The drinking of the water was monitored regarding both time and quantity. The amount of water the participants drank was respectively the same for each specific day of both phases of the study.

The meal consisted of mashed potatoes (potato, sunflower oil and salt) and contained 365 kcal energy; 20 g fat; 4.2 g protein; 42 g carbohydrate^{1,13} and 11.4 mg non-heme iron (1.4 mg endogenous iron plus the addition of 10 mg of ferrous iron as FeSO₄, Essential Pharma®). The iron content in the meal was determined by acid digestion followed by atomic absorption spectrophotometry using a Perkin-Elmer Analyst 300 spectrophotometer, according to the method described by the Official Method of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, n° 944.02a).¹⁴ The iron was measured using standard solution for calibration purposes. The patients drank 200 mL of the *Ilex paraguariensis* infusion, which was prepared immediately before being served. To reduce risk of metal contamination, only disposable plastic and glass utensils were used. Furthermore, active surveillance for any occasional side effects was performed for 48 h after beverage intake. People sensitive to *Ilex paraguariensis* or to some compound from this plant may have gastric irritation, shivering, irritability or insomnia. None of the participants showed any evidence of side effects or adverse reactions due to acute intake of *Ilex paraguariensis*.

Previous to the studies, initial blood samples were drawn to determine hematological and biochemical parameters (hemoglobin, hematocrit, serum ferritin, serum iron, total iron binding capacity, transferrin saturation, high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase), which were measured in automated equipment (Dimension RXL Max Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Deerfield, IL, USA, and Sysmex XE-2100D Kobe, Japan). In addition, each individual's body weight and height were measured on the first morning of the experimental session. To check if the participants were following the instructions regarding their food intake, a 24h dietary recall was carried out by a nutritionist on each test day.¹⁵ Accordingly, the participants followed the instructions regarding the intake of beverages and did not change their eating habits.

2.3 Sample size

The sample size needed to detect a statistically significant difference ($\alpha < 0.05$ two-sided) was calculated based on the power of 0.8. To detect differences of 20% in the values of AUC for serum iron, the sample size required was estimated to be of 12 subjects, assuming a standard deviation of 17%.^{8,12} Considering the possibility of an occasional 20% loss, 14 subjects were included in the study.

2.4 *Ilex paraguariensis* leaf sample, infusion, and total phenols and iron analyses

Ilex paraguariensis (yerba-mate) leaves were supplied by Matebrás® –Brazilian Mate Industry Ltd. (Catanduvas, SC, Brazil). The leaves were randomly chosen from yerba-mate trees, with a certified organic cultivation system in the town of Catanduvas, Santa Catarina, Brazil. Then, they were dried using a different process in order not to generate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)¹⁶, ground and packed by Matebrás®. For this study, a sample of dried and ground leaves was stored at -18 ± 2 °C until used.

The *Ilex paraguariensis* used here was taken from the same batch used in our previous study.¹¹ The infusion (100 mg/mL) was prepared with 300 mL water at 80 ± 1 °C. After 10 min of extraction, the mixture was filtered and immediately drunk by the patients.

Total phenols in the *Ilex paraguariensis* infusion were determined according to the Folin–Ciocalteu procedure¹⁷ with a UV-Vis spectrophotometer (SP-2000UV Spectrum, Shanghai, China) using a standard curve of chlorogenic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Phenolic compounds were measured by reversed-phase HPLC using a Shim-pack C18 column (4.6 mm ID 250 mm length) with a UV-visible detector (Shimadzu SPD 10A, 325 nm), as previously described.¹¹

The iron content in the infusion was determined according to the Official Method of the Association of Official Analytical Chemists (2016).¹⁴ All analytical determinations were carried out in triplicate.

2.5 Iron absorption measurement

Iron absorption was estimated using a methodology based on the serum iron response after ingestion of the meal, validated for humans.^{8,12} The parameters of the serum iron used as indicators of iron absorption, corrected for the baseline fasting serum iron, were: (1) Area under the serum curve ($AUC_{(0-4h)}$), calculated using the trapezium rule; (2) the maximum increase in serum iron concentration (Delta iron max); and (3) the percentage of iron recovery at maximum peak.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM) or as median and interquartile range (IQR). Data distribution was evaluated using the Shapiro-Wilk test and, when necessary, the logarithmic transformation of data was processed.

The Student's *t*-test or the Mann-Whitney U-test was used to compare baseline characteristics stratified according to the mutations in the *HFE* gene and the serum ferritin levels. The paired Student's *t*-test was used to detect differences between the beverages (*Ilex paraguariensis* and water) for the parameters derived from the serum iron curves.

The mixed-model and repeated measure analysis of variance (RM-ANOVA) was used to compare the treatments (beverages) (within-subjects factor) and the type of mutation in the *HFE* gene, as well as serum ferritin concentration (between-subjects factor). Bonferroni's correction was used for multiple pairwise *post hoc* testing. For the RM-ANOVA, a test of equality of covariance matrices was applied and the Mauchly's sphericity test was used for measuring homoscedasticity. Greenhouse-Geisser correction was applied if sphericity was not met.

The statistical analysis was performed using SPSS V20.0 (Statistical Package for the social science, Inc., Chicago, IL, USA) and differences that were statistically significant were considered at $\alpha < 0.05$. AUC was calculated using the GraphPad Prism v. 6.01 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Retrospective power ($1 - \beta$) calculations of effect size for the primary outcome (the inhibition of iron absorption based on the serum iron AUC) with $n=9$ and $n=5$ was carried out using G*Power (<http://www.gpower.hhu.de/en.html>) and the result indicated a power of 0.995 and 0.989, respectively.

3. Results

The average total phenols in the *Ilex paraguariensis* leaf infusion used in the present study was 3.92 ± 0.05 g/200 mL (mean \pm SD). The main phenolic compounds measured were the 3-caffeoylquinic acid (1.99 ± 0.13 g/200 mL), 4-caffeoylquinic acid (0.49 ± 0.06 mg/200 mL), and 5-caffeoylquinic acid (0.43 ± 0.05 g/200 mL), followed by the 3,5-di-caffeoylquinic acid (1.13 ± 0.05 g/200 mL) and 4,5-di-caffeoylquinic acid (0.35 ± 0.04 g/200 mL).

Sixteen patients with *HFE*-HH were recruited, of which two individuals withdrew after screening selection for personal reasons unrelated to the study protocol and, therefore, 14 completed the study (Fig. 1).

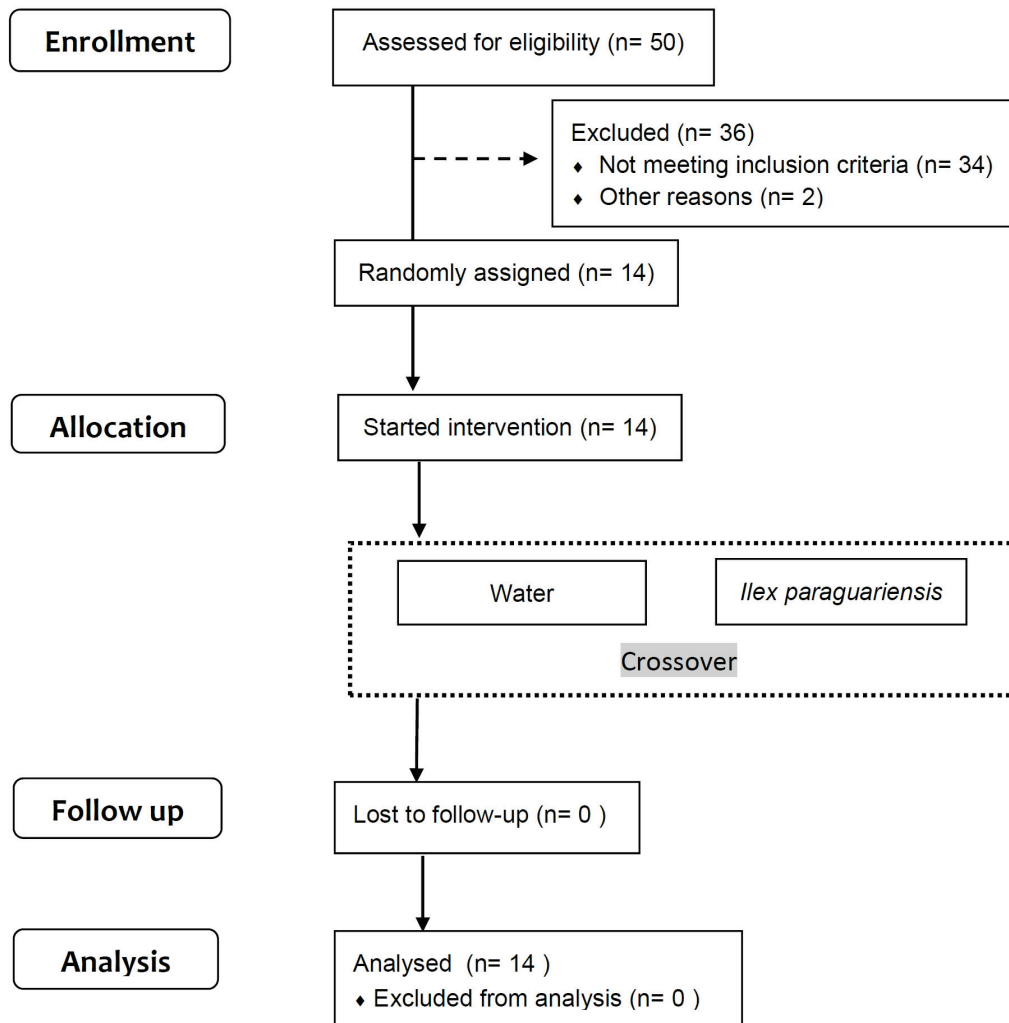


Fig 1. The CONSORT Flow Chart.

The participants of this study were patients with homozygous p.Cys282Tyr and heterozygous (Cys282Tyr/p.His63Asp or p.Cys282Tyr/-) mutations and with variable values of serum ferritin (20-180 $\mu\text{g/L}$). These variations in serum ferritin values resulted from the particular physicians' clinical conduct for each patient. Therefore, considering potential effects of the genetic variations and the level of iron stored in the body (estimated by the serum ferritin) on the absorption of iron, in the present study we stratified patients into p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr and non-p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr, and by their levels of serum ferritin, $< 50 \mu\text{g/L}$ and $> 50 \mu\text{g/L}$. The cut-off point of 50 $\mu\text{g/L}$ was chosen based on the various serum ferritin values found for patients in maintenance phase, i.e., $< 50\mu\text{g/L}$; 50-100 $\mu\text{g/L}$; and $<300 \mu\text{g/L}$.^{1,2,5,18-21} The baseline characteristics of the patients are shown in Table 1.

Table 1. Baseline biodemographic characteristics and laboratory parameters of the *HFE*-HH patients.

	<i>HFE</i> -HH (n = 14)		Mutation in the <i>HFE</i> gene		Serum ferritin levels	
			Homozygote p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr (n = 09)	Heterozygote p.Cys282Tyr/p.His63Asp and p.Cys282Tyr/- (n = 05) ^a	> 50 ng/mL (n = 09)	< 50 ng/mL (n = 05) ^b
Age (years)	52.4 ± 3.3	45.8 ± 3.4	64.2 ± 1.9*	57.1 ± 3.6	43.8 ± 4.9**	
BMI (kg/m ²)	29.4 ± 1.6	28.4 ± 1.2	31.1 ± 4.0	31.1 ± 2.1	26.3 ± 1.5	
Hemoglobin (g/L)	144.4 ± 4.0	144.7 ± 5.9	143.0 ± 3.0	146.0 ± 4.0	140.6 ± 8.7	
Serum Ferritin (µg/L)	76.2 ± 13.8	68.9 ± 20.6	89.3 ± 10.8	103.4 ± 14.4	27.3 ± 6.5*	
AST (U/L)	26.6 ± 2.9	27.3 ± 3.0	25.4 ± 6.3	25.4 ± 3.5	28.8 ± 5.3	
ALT (U/L)	35.4 ± 4.4	36.2 ± 6.3	34.0 ± 5.8	32.3 ± 4.9	41.0 ± 8.7	
hs-CRP (mg/L)	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.8 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.9 ± 0.5	
Length time since diagnosis (y)	5.14 ± 1.3	5.0 (10.9)	2.3 (2.0)	3.0 (9.7)	1.2 (5.2)	
Ferritin (µg/L) at beginning of phlebotomies	1008.0 ± 127.7	1012.2 ± 194.3	1000.5 ± 112.3	1019.5 ± 129.9	987.3 ± 296.0	
Number of phlebotomies/year	11.5 ± 1.6	14.0 ± 2.2	8.4 ± 1.0	10.1 ± 1.3	13.7 ± 3.5	

Data are expressed in mean (± SEM) or as median (IQR). BMI, body mass index; HH, hereditary hemochromatosis; TIBC, total iron binding capacity; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein. ^a Subgroup Heterozygote p.Cys282Tyr/p.His63Asp and p.Cys282Tyr/-: four patients compound heterozygote (p.Cys282Tyr/p.His63Asp) and one patient p.Cys282Tyr/- heterozygote (p.Cys282Tyr/-). ^bAll patients p.Cys282Tyr homozygote (p.Cys282Tyr/ p.Cys282Tyr). The number of phlebotomies is that of the induction phase until reaching the maintenance phase (≤ 4 phlebotomies/year). **p* = 0.003; ***p* = 0.05 (Student's *t* test). The diagnosis of the HH patient with a single p.Cys282Tyr mutation was based on the elevated results of serum ferritin level and transferrin saturation. Furthermore, according to magnetic resonance imaging MRI, specifically T2-weighted imaging, hepatic iron concentration (HIC) was also elevated.

The homozygous patients (p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr) were younger, as well as those with serum ferritin concentration $< 50 \mu\text{g/L}$. Although not significant ($p = 0.064$), the number of phlebotomies per year until reaching the maintenance phase was 66.7% higher in patients with p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr compared to patients in the subgroup p.Cys282Tyr/p.His63Asp and p.Cys282Tyr/- (Table 1). The additional parameters were similar for both subgroups except, as was expected, the serum values of ferritin after stratification by ferritin levels.

The ingestion of the meal enriched with iron and water (control) resulted in an $\text{AUC}_{(0-4\text{h})}$ of $1449.4 \pm 241.5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, $\Delta \text{Iron max.}$ of $9.1 \pm 1.4 \mu\text{mol/L}$, and iron recovery at peak max. of $16.2 \pm 2.6\%$ (mean \pm SEM). When the participants ingested the meal with the *Ilex paraguariensis* leaf infusion, there was a highly significant reduction in their iron absorption (Fig. 2), according to all the parameters derived from the serum iron curves, $\text{AUC}_{0-4\text{h}}$ $173.3 \pm 44.7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, $\Delta \text{Iron max.}$ $1.3 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$, and Iron recovery at peak max. $2.4 \pm 0.5\%$ (mean \pm SEM) ($p < 0.001$ for all the parameters derived from the serum iron curves).

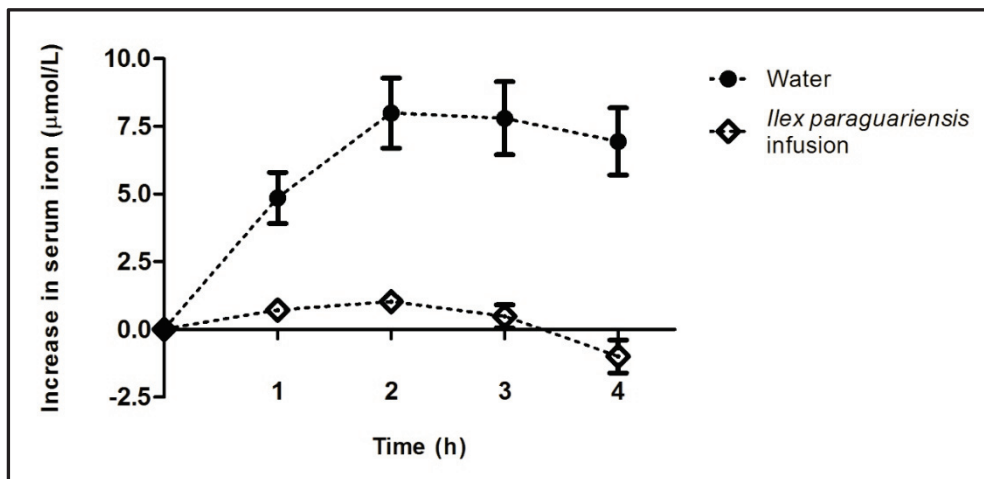


Fig 2. Serum iron curves in *HFE*-HH patients ($n = 14$) after ingestion of a single meal containing 11.4 mg non-heme iron (1.4 mg endogenous iron and 10 mg added as ferrous iron). Serum iron values are means \pm SD.

Furthermore, *Ilex paraguariensis* intake also decreased the iron absorption regardless of the *HFE* gene mutations (p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr vs. p.Cys282Tyr/p.His63Asp or p.Cys282Tyr/-) or of the serum ferritin levels ($< 50 \mu\text{g/L}$ vs. $> 50 \mu\text{g/L}$) (Table 2), with the $\text{AUC}_{0-4\text{h}}$ values remaining below $200 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Interestingly, patients with serum ferritin levels $< 50 \mu\text{g/L}$ showed a 2-fold increase in the iron absorption with water, resulting in a significant serum iron ferritin effect ($p = 0.046$) and treatment/ferritin interaction ($p = 0.012$; Table 2).

Table 2 Iron absorption according to mutations in the *HFE* gene and the serum ferritin levels.

	Mutations in the <i>HFE</i> gene AUC _{0-4h} $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>p</i> *	Serum ferritin levels AUC _{0-4h} $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>p</i> *
	Homozygote p.Cys282Tyr/p.Cys282 Tyr (n = 09)		<50 $\mu\text{g/L}$ (n = 05)	
	Heterozygote p.Cys282Tyr/p.His63Asp and p.Cys282Tyr/- (n = 05)		>50 $\mu\text{g/L}$ (n = 09)	
Treatments				
<i>Ilex paraguariensis</i>	197.5 \pm 62.2**	0.490	173.4 \pm 46.5**	173.2 \pm 66.7**
Water	1769.9 \pm 325.0	0.073	2146.0 \pm 402.3	1062.3 \pm 223.7
	Treatment effect	0.000	Treatment effect	0.000
<i>p</i> for Mixed-model ANOVA	Mutation effect	0.082	Serum ferritin effect	0.046
	Treatment vs. mutation	0.071	Treatment vs. serum ferritin	0.012

Data are expressed in mean \pm SEM. AUC_{0-4h}: Area under the curve. Mixed-model ANOVA used treatment as within-subjects factor, and mutations in the *HFE* gene or serum ferritin levels as between-subjects factor ($p < 0.05$). *Pairwise comparisons between-subjects factor (inter-group). **Pairwise comparisons within-subjects factor (intra-group) with significant differences ($p < 0.05$).

4. Discussion

This study showed, for the first time, a significant inhibitory effect of *Ilex paraguariensis* leaf infusion (100 mg/mL) on the iron absorption in patients with *HFE*-HH after ingestion of a single meal, as can be observed by 88% reduction of the AUC compared to control (water). A previous study carried out with *HFE*-HH patients showed that acute black tea intake also limited the absorption of iron in comparison with water.⁷ Furthermore, it has been reported that capsules of *Silybum marianum* (Legalon® silybin 140 mg) was more effective than black tea to reduce ferric iron absorption in *HFE*-HH patients.⁸ On the other hand, Lobbes et al.²² recently showed that *Pinus pinaster* Ait. (Oligopin® phenolic procyanidin 100 mg) did not reduce iron absorption in *HFE*-HH patients, which might be related with the type and amount of polyphenols used. Here, we clearly showed an elevated ability of *Ilex paraguariensis* leaf infusion to reduce iron absorption.

We and other authors have reported in *in vitro* studies the chelating capacity of *Ilex paraguariensis* to form complexes with ferrous iron.^{10,11} However, a study with HH patients using ferrous iron had not yet been conducted. The bioavailability of ferrous iron is considered to be higher than that of ferric iron. For efficient absorption, the gastric hydrochloric acid stabilizes ferric iron, which is reduced to the more soluble ferrous iron.²³ Fortification of widely consumed foods with the highest bio-available ferrous iron has been established as a national policy in some countries, including Brazil, aiming to avoid anemia. However, it should be noted that such strategy may pose a risk of iron overload in *HFE*-HH patients and may also be an environmental factor to favor and/or accelerate the phenotypic expression of hemochromatosis, including for mutations in the non-p.Cys282Tyr/ p.Cys282Tyr *HFE* gene.²⁴⁻²⁸

It is worth mentioning that patients in this study have been consuming iron-fortified foods daily for at least 20 years. Interestingly, despite the rarity of the frequency, five of the 14 patients evaluated presented non-p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr mutations, which suggests some possible effects of their regular diet. The non-p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr mutation, usually leads to *HFE*-HH when associated with: additional pathological conditions (such as metabolic syndrome); environmental factors (such as excessive alcohol consumption and great exposure to iron-fortified foods, as previously mentioned); and/or other coexisting mutations of iron regulation genotypes.^{1,3,25,29} In the present study, the metabolic syndrome was observed in two patients (one compound p.Cys282Tyr/p.His63Asp heterozygous and one p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr), and none of the patients was an alcohol abuser. While the laboratorial test for the *HFE* mutation is easily accessible, it is not so for other mutations. However, the elevated liver iron concentration for the HH patient with a single p.Cys282Tyr mutation (see Table 1 legend) could suggest other coexisting mutations, such as ferroportin disease (SLC40A1 on 2q32; loss of function for ferroportin excretion), in which the iron deposition in the liver is more common.^{1,5,29,30}

It is known that p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr mutation leads to more severe iron overload in the body¹ and, in fact, in our study the patients with this mutation showed iron absorption 2-fold higher than the patients with non-p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr mutation, but with no significant difference ($p= 0.073$). Anyway, the infusion of *Ilex paraguariensis* leaves similarly inhibited the absorption of iron in all the *HFE*-HH patients undergoing maintenance, regardless of the type of mutation.

The average serum ferritin level in the patients at the time of diagnosis, regardless of the type of mutation, was not significantly different. However, based on the indicators of age, time since diagnosis, and number of phlebotomies per year, the intensity of iron accumulation tended to be higher in the patients with p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr mutation, which is expected.¹

Herein, we showed that *HFE*-HH patients with serum ferritin < 50 µg/L had increased iron absorption in comparison to ferritin > 50 µg/L when ingesting the iron-rich meal with water. The intestinal iron absorption depends on several key proteins, including the divalent metal transporter 1 (DMT1) and ferroportin (FPN), which had an inverse association with ferritin levels in *HFE*-HH patients.²³ Therefore, our results are as expected, taking into account that serum ferritin is used as a marker of iron concentration stored in the body (1.0 µg/L is equivalent to 7.5 mg of iron in the body)³¹ and low amount of iron in the body further stimulates absorption of iron in *HFE*-HH patients.^{23,32} Phlebotomy therapy is the most effective treatment for HH. The goal is to induce a negative balance in the concentration of iron in the body in order to remove excess iron accumulated in the tissues, and thus prevent injuries caused by its deposition.²⁰ However, the concentration of hepcidin is affected during phlebotomy therapy, especially when the aim is to maintain serum ferritin < 50 µg/L, and it becomes even more reduced in cases of HH.^{23,32} Even so, serum ferritin (as an indicator of iron stores) and erythropoiesis maintain their regulatory functions, even in patients with HH. Erythropoiesis is increased to reconstitute the lost erythroid volume and the stimulated erythropoiesis directly induces hepcidin suppression. Hepcidin synthesis is inhibited by erythroferrone (erythroid signal) when there are increased requirements for iron after stimulation of erythropoiesis by erythropoietin.³³ Therefore, this suggests that the exacerbation of iron absorption in patients with HH, mainly in patients who are well depleted (ferritin below < 50 µg/L), may be related with the down-regulation of the hepcidin gene expression by the increased hormone erythroferrone. Moreover, as indicated by the significant ferritin-treatment interaction, the *Ilex paraguariensis* leaf infusion inhibited iron absorption independently of the serum ferritin levels in the *HFE*-HH patients undergoing phlebotomy therapy.

The mechanisms by which some phenolic-rich plant extracts inhibit non-heme iron absorption are not totally understood. However, based on several *in vitro* and *in vivo* data, it has been suggested that the acute effects of phenolic acids and flavonoids on iron absorption were due to iron chelation,^{7,9,34} which may also occur at the intracellular level.³⁴ Additionally, chlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid) was the strongest *in vitro* iron chelator among several studied phenolic acids,⁹ and chlorogenic acids are the main phenolic compounds in *Ilex paraguariensis*.^{10,11}

Ilex paraguariensis stands out for its content of microelements such as iron, zinc, and manganese, and macroelements such as magnesium and potassium.³⁵⁻³⁸ To date, we are unaware of any reports of side effects caused by these minerals after routine consumption of *Ilex paraguariensis* infusions by healthy individuals. However, the absorption of divalent metals, besides iron, requires the same carrier protein (i.e., DMT1) and, thus, the bioavailability of these metals could be differentiated in *HFE*-HH patients on phlebotomy treatment.³⁹ The infusion of *Ilex paraguariensis* consumed by the participants contained 0.33 ± 0.06 mg/200 mL of iron and 3.92 ± 0.05 g/200 mL of total phenols. Therefore, considering the high chelating activity of phenolic compounds, it indicates that iron would not be bioavailable – either due to the amount of iron presented in the leaves or the way the leaves were processed. Consequently, there would be no risk of iron accumulation by prolonged consumption of this infusion.

Adjuvant treatment with *Ilex paraguariensis* should be of long duration, therefore it is important to carry out additional long-term studies on iron bioavailability to make sure the chelating effect is maintained, and also to check whether it could either inhibit the absorption of or cause any possible toxicity by zinc, manganese, and magnesium in *HFE*-HH patients.

Limitations to this study include the use of a non-blinded study design (due to the lack of an appropriate placebo to *Ilex paraguariensis* infusion) and the absence of a homogeneous group in relation to the patients' *HFE* gene mutations as well to their serum ferritin levels. Therefore, the patients were stratified into p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr and non-p.Cys282Tyr/p.Cys282Tyr and by their ferritin concentrations, which decreased the number of patients per group. Accordingly, some conclusions of the present study cannot be extrapolated to the general population of patients with *HFE*-HH. However, this study has numerous strengths, mainly due to the robust response of *Ilex paraguariensis* leaf infusion, which inhibited the absorption of the iron in HH patients. Moreover, the stratification of patients provided the verification of the favorable effect of the *Ilex paraguariensis* leaf infusion on the inhibition of iron absorption in all the *HFE*-HH patients, regardless of genetic mutations or iron deposits. The fact that this was a crossover study with HH patients at normal levels of hs-CRP minimized the risk of bias for a potential increase in serum ferritin concentration due to inflammation. Finally, caution was taken with regard to the standardization of the meals and to the iron content, which was confirmed by laboratory analysis, as well as to the innovative use of *Ilex paraguariensis* leaf infusion with known values of total phenols and iron contents.

5. Conclusion

Acute intake of *Ilex paraguariensis* leaf infusion (100 mg/mL) significantly decreased absorption of iron in *HFE*-HH patients undergoing phlebotomy therapy, independently of their serum ferritin levels and/or mutations in the *HFE* gene. Therefore, consumption of *Ilex paraguariensis* leaf infusion with meals may have potential for reducing iron absorption and could be used as an adjunct for the treatment of HH. The results of the present study suggest that long-term clinical trials should be conducted to investigate the effect of *Ilex paraguariensis* leaf infusion on decreasing iron overload in HH patients.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank the Ambulatory of the Hematology and Hemotherapy Center of Santa Catarina State and the Hemotherapy Center of the University Hospital of the Federal University of Santa Catarina for helping with the recruitment of the patients as well as all of the patients themselves for participating in this study. This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior– Brazil – Finance Code 001.

References

1. L. W. Powell, R. C. Seckington, Y. Deugnier, Hemochromatosis, *The Lancet*,

- 2016, **388**, 706-716.
2. N. T. Milman, F. V. Schioedt, A. E. Junker, K. Magnussen, Diagnosis and treatment of genetic *HFE* -hemochromatosis: The Danish Aspect, *Gastroenterol Res.*, 2019, **12**, 221-232.
 3. K. Sandhu, K. Flintoff, M. D. Chatfield, J. L. Dixon, L. E. Ramm, G. A. Ramm, L. W. Powell, V. N. Subramaniam, D. F. Wallace, Phenotypic analysis of hemochromatosis subtypes reveals variations in severity of iron overload and clinical disease, *Blood*, 2018, **132**, 101-110.
 4. A. Castiella, E. Zapata, M. D. De Juan, P. Otazua, J. Fernandez, L. Zubiaurre, J. A. Arriola, Significance of H63D homozygosity in a Basque population with hemochromatosis, *J Gastroenterol Hepatol.*, 2010, **25**, 1295-1298.
 5. K. V. Kowdley, K. E. Brown, J. Ahn, V. Sundaram, ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis, *Am J Gastroenterol.*, 2019, **114**, 1202-1218.
 6. P. Brissot, S. Ball, D. Rofail, H. Cannon, W. V. Jin, Hereditary hemochromatosis: patient experiences of the disease and phlebotomy treatment, *Transfusion*, 2011, **51**, 1331 - 1338.
 7. J. P. Kaltwasser, E. Werner, K. Schalk, C. Hansen, R. Gottschalk, C. Seidl, Clinical trial on the effect of regular tea drinking on iron accumulation in genetic haemochromatosis, *Gut*, 1998, **43**, 699-704.
 8. C. Hutchinson, A. Bomford, C. A. Geissler, The iron-chelating potential of silybin in patients with hereditary haemochromatosis, *Eur J Clin Nutr.*, 2010, **64**, 1239-1241.
 9. M. Andjelković, J. V. Camp, B. De Meulenaer, G. Depaemelaere, C. Socaciu, M. Verloo, R. Verhe, Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups, *Food Chem.*, 2006, **98**, 23-31.
 10. A. C. Colpo, H. Rosa, M. E. Lima, C. E. F. Pazzini, V. B. De Camargo, F. E. M. Bassante, R. Puntel, D. S. Ávila, A. Mendez, V. Folmer, Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals, *Food Chem.*, 2016, **209**, 185-195.
 11. C. M. Pagliosa, F. G. K. Vieira, T. T. Silveira, J. R. Krieger, M. F. Medeiros, E. L. da Silva, Elevated iron chelating activity of *Ilex paraguariensis* leaf infusion: *in vitro* and *in vivo* pilot studies, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2021, **64**.
 12. R. Conway, C. Geissler, R. Hider, R. Thompson, J. Powell, Serum iron curves can be used to estimate dietary iron bioavailability in humans, *J Nutr.*, 2006, **136**, 1910-1914.
 13. D. M. Lima, R. M. Padovani, D. B. Rodriguez-Amaya, J. A. Farfan, C. T. Nonato, M. T. De Lima, E. Salay, F. A. B. Calugnati, M. A. M. Galeazzi, *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO*, 4th ed., Campinas, Nepa-Unicamp, 2011, 23-44.
 14. AOAC-Association of Official Analytical Chemists, *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 20th ed., USA, 2016.
 15. J. M. Conway, L. A. Ingwersen, B. T. Vinyard, A. J. Moshfegh, Effectiveness of the US Department of Agriculture 5-step multiple-pass method in assessing food intake in obese and non obese women, *Am J Clin Nutr.*, 2003, **77**, 1171-1178.
 16. M. A. Vieira, M. Maraschin, A. A. Rovaris, R. D. M. C. Amboni, C. M. Pagliosa, J. J. M. Xavier, E. R. Amante, Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*), *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2010, **27**, 776-782.

17. V. L.Singleton, J. A.Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am J Enol Vitic.*, 1965, **16**, 144-158.
18. P. Brissot, M. Bismuth, E. Peynaud-Debayle, F. De Bels, Practical management of HFE hemochromatosis. *Rev Prat.*, 2006, **56**, 2123-2129.
19. European Association for the Study of the Liver, EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis, *J Hepatol.*, 2010, **53**, 3-22.
20. B. R. Bacon, P. C. Adams, K. V.Kowdley, L. W. Powell, A. S.Tavill, Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, *Hepatology*, 2011, **54**, 328-343.
21. A. Vanclooster, D. Cassiman, W. Van Steenberghe, D. W. Swinkels, M. C. H. Janssens, J. P. H. Drenth, B. Aertgeertse, H. Wollersheim, The quality of hereditary haemochromatosis guidelines: A comparative analysis, *Clin Res Hepatol Gastroenterol.*, 2015, **39**, 205-214.
22. H. Lobbes, C. Gladine, A. Mazur, B. Pereira, C. Dualé, J. M. Cardot, M. Ruivard, Effect of procyanidin on dietary iron absorption in hereditary hemochromatosis and in dysmetabolic iron overload syndrome: A crossover double-blind randomized controlled trial, *Clin Nutr.*, 2020, **39**, 97-103.
23. K. A. Stuart, G. J. Anderson, D. M. Frazer, W. Powell, M. McCullen, L. M. Fletcher, D. H. G. Crawford, Duodenal expression of iron transport molecules in untreated haemochromatosis subjects, *Gut*, 2003, **52**, 953-959.
24. W. R. Bezwoda, T. H. Bothwell, D. P. Derman, A. P. MacPhail, R. W. Torrance, R. W. Charlton, Effect of diet on the rate of iron accumulation in idiopathic haemochromatosis, *South African Med J.*, 1981, **59**, 219-222.
25. K. S. Olsson, M. Väisänen, J. Konar, Å. Bruce, The effect of withdrawal of food iron fortification in Sweden as studied with phlebotomy in subjects with genetic hemochromatosis, *Eur J Clin Nutr.*, 1997, **51**, 782-786.
26. H. Bell, J. P. Berg, D. E. Undlien, S. Distant, N. Raknerud, H. E. Heier, K. Try, Y. Thomassen, E. Haug, R. Raha-Chowdhury, E. Thorsby, The clinical expression of hemochromatosis in Oslo, Norway: Excessive oral iron intake may lead to secondary hemochromatosis even in HFE C282Y mutation negative subjects, *Scand J Gastroenterol.*, 2000, **35**, 1301-1307.
27. M. Tao, D. L. Pelletier, The effect of dietary iron intake on the development of iron overload among homozygotes for haemochromatosis, *Public Health Nutr.*, 2009, **12**, 1823-1829.
28. P. Saliou, G. Le Gac, M. C. Mérour, C. Tripogney, B. Chanu, I. Gourlaouen, J. Nouisbaum, C. Férec, V. Scotet, HFE hemochromatosis: influence of dietary iron intake on the iron overload of C282Y homozygous patients, *Ann Hematol.*, 2015, **94**, 1225-1227.
29. A. Pietrangelo, Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment, *Hematologica*, 2017, **102**, 1972-1984.
30. P. Brissot, M. Troadec, O. Loréal, E. Brissot, Pathophysiology and classification of iron overload diseases; update 2018, *Transfus Clin Biol.*, 2019, **26**, 80-88.
31. M. L. Bassett, J. W. Halliday, R. A. Ferris, L. W. Powell, Diagnosis of hemochromatosis in young subjects: Predictive accuracy of biochemical screening tests, *Gastroenterology*, 1984, **87**, 628-633.
32. B. A. C. Van Dijk, C. M. M. Laarakkers, S. M. Klaver, E. M. G. Jacobs, L. J. H. V. Tits, M. C. H. Janssen, D. W. Swinkels. Serum hepcidin levels are innately low in HFE- related haemochromatosis but differ between C282Y-homozygotes with elevated and normal ferritin levels, *British Journal of Haematology*, 2008,

- 142**, 979 - 985.
33. L. Kautz, G. Jung, E. V. Valore, S. Rivella, E. Nemeth, T. Ganz, *Net. Genet.*, Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism, 2014, **46**, 678 - 684.
 34. M. Lesjak, S. Balesaria, V. Skinner, E. S. Debnam, S. K. S.Srai, Quercetin inhibits intestinal non-haem iron absorption by regulating iron metabolism genes in the tissues, *Eur J Nutr.*, 2019, **58**, 743-753.
 35. K. Wróbel, K. Wróbel, E. M. C. Urbina, Determination of total aluminum, chromium, copper, iron, manganese, and nickel and their fractions leached to the infusions of black tea, green tea, *Hibiscus sabdariffa*, and *Ilex paraguariensis* (Mate) by ETA-AAS, *Biol Trace Elem Res.*, 2000, **78**, 271-280.
 36. C. M. Pagliosa, K. N. de Simas, R. D. M. C. Amboni, A. N. N. Murakami, C L. O. Petkowicz, J. D. D. Medeiros, A. C. Rodrigues, E. R. Amante, Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), *Ind Crops Prod.*, 2010, **32**, 428-433.
 37. E. Rusinek-Prystupa, Z. Marzec, I. Sembratowicz, W. Samolińska, B. Kiczorowska, M. Kwiecień, Content of selected minerals and active ingredients in teas containing yerba mate and rooibos, *Biol Trace Elem Res.*, 2016, **172**, 266-275.
 38. M. V. Barrella, O. A. Heringer, P. M. M. Cardoso, E. F. Pimentel, R. Scherer, D. Lenz, D. C. Endringer, metals content in herbal supplements, *Biol Trace Elem Res.*, 2017, **175**, 488-494.
 39. O. E. Orisakwe, C. N. Amadi, C.Frazzoli, Management of iron overload in resource poor nations: A systematic review of phlebotomy and natural chelators, *J Toxicol.*, 2020, 1-14.

**APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO PARA A COLETA DE DADOS PARA A
CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES COM HEMOCROMATOSE
HEREDITÁRIA *HFE* E OS CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DO ENSAIO
CLÍNICO**

Questionário para a coleta de dados

Participante N° | _ | _ | _ | _ |

Caracterização Biodemográfica e Clínica (informações obtidas com prontuário do portador)

Data: / /

Fatores de inclusão para o estudo	Fatores de exclusão para o estudo
Portador de Hemocromatose Hereditária (HH) Tipo de mutação: C282Y homozigoto SIM () NÃO ()	Uso de substâncias quelantes 24 horas antes do estudo SIM () NÃO ()
Em tratamento de <u>manutenção para HH</u> SIM () NÃO ()	Infecção aguda ou crônica SIM () NÃO ()
Ausência de anemia SIM () NÃO ()	Hemocromatose secundária SIM () NÃO ()
Intervalo mínimo de 1 mês da última flebotomia SIM () NÃO ()	Cirrose SIM () NÃO ()
	Mulheres na fase menstrual do ciclo (entrevista com participante) ou em tratamento com estrogênio SIM () NÃO ()
	Diagnóstico de câncer SIM () NÃO ()

Nome: _____ **número do CPF** _____
Número RG: _____ **Orgão Emissor:** _____ **UF:** _____ **Data** _____ **Cartão do SUS:** _____ **Estado Civil:** _____
Sexo: masculino feminino **Data de nascimento:** ____/____/____ **Idade:** _____
Nome da mãe: _____ **Nome do pai:** _____
Cor da pele: branca parda amarela negra
Profissão: _____ **Anos de educação formal:** _____
Telefone: (____) _____ **E-mail:** _____
Endereço: _____
_____ **cep:** _____

Data do diagnóstico para hemocromatose hereditária: _____
Tipo de mutação: _____

Na data do diagnóstico, concentração sérica de:
Ferritina _____

Flebotomias:

Número de flebotomias até alcançar a fase de manutenção: _____
Volume/vez: _____
Data da última flebotomia e qual o volume: _____
Data para a próxima flebotomia: _____

Resultado do último exame de sangue que realizou:

- Ferro sérico: _____ ug/dl	Data do exame ____/____/____
- Ferritina: _____ ng/ml	Data do exame ____/____/____
- Índice Saturação Transferrina: _____ %	Data do exame ____/____/____
- Hemoglobina: _____ g/dl	Data do exame ____/____/____
- Enzimas hepáticas _____	Data do exame ____/____/____
- Proteína C reativa _____	Data do exame ____/____/____
- CTLF _____	Data do exame ____/____/____

Assinale abaixo se tem alguma das seguintes doenças:

- Aumento de colesterol ou triglicerídeos
- Diabetes melito
- Pressão Alta
- Doenças hepáticas (do fígado)
- Hipotireoidismo
- Hipertireoidismo
- Depressão

Assinale abaixo se já teve:

- Derrame (Acidente vascular cerebral – AVC).
- Câncer
- Doença Arterial Coronariana

Você fez uso de algum remédio contínuo? Caso sim, qual(is)? _____

Qual horário? _____ Para qual(is) doença(s)? _____

Nas últimas 24 horas você usou algum remédio? Caso sim, qual(is)? _____

Qual foi o horário? _____

Você faz uso de chás (como chá preto, chá verde, chá mate, chimarrão, café...) após as refeições?

Toma algum suplemento ou medicamento para diminuir a absorção do ferro: SIM() NÃO ()

Qual (is)? _____

Por quanto tempo? _____

Qual a dose/vez e horário? _____

Obs: Caso sim, reforçar para lembrar, de ficar sem o consumo 24 horas antes do estudo (chá ou medicamento).

Você realiza algum cuidado com a sua alimentação, devido a sobrecarga de ferro?

SIM () NÃO ()

O que seria? _____

Consumo bebida alcoólica: SIM () Diariamente: () / Semanalmente () / Mensalmente () / Raramente: ()
NÃO ()

Fumante? SIM () Quantos cigarros/dia?

NÃO () Há quanto tempo fumou seu último cigarro?

Peso atual (primeiro dia da intervenção): _____ **Altura:** _____ **IMC:** _____ **Data:** _____

Dúvidas? Entrar em contato com Cristiane: meristiane@gmail.com ou (48) 99602-0653

Assinatura do pesquisador

Assinatura do participante

APÊNDICE D – ORIENTAÇÕES AOS PARTICIPANTES

ORIENTAÇÕES AOS PARTICIPANTES

Orientações gerais

- **A partir das 23 horas (anterior ao dia do estudo)**, ficar em jejum de alimentos e bebidas, inclusive água. Para não ocorrer interferência na análise de sangue é importante chegar em jejum na manhã do estudo, sem café da manhã.
- No **dia anterior ao estudo ficar sem consumir bebidas alcoólicas**.
- No **dia anterior ao estudo não utilizar medicamentos que podem afetar a absorção do ferro**: antiácidos, suplemento de cálcio (carbonato de cálcio, cálcio quelato...), suplemento de zinco, cloranfenicol, alopurinol, vitamina E, ácido ascórbico (vitamina C) e medicamentos quelantes contra o ferro.
- No **dia anterior ao estudo “manter o seu hábito alimentar de costume”, porém “não consumir”**: café, chimarrão, chá mate, chá preto, chá verde, extrato de cardo mariano (*silibum mariano*), refrigerantes e açafraão da terra ou raiz forte (*cúrcuma*).
- Não **praticar exercícios físicos na manhã do estudo**.
- As amostras de sangue serão coletadas durante as 4 horas de duração da pesquisa.
- Será realizada uma coleta de sangue, em jejum, antes da ingestão da refeição e 1h, 2h, 3h e 4h após o consumo da refeição.
- A participação no estudo ocorrerá em três dias diferentes. Em cada dia você consumirá a refeição com uma bebida diferente.
- O intervalo entre cada dia de participação no estudo será de 1 semana.
- No dia do estudo, após ter consumido a refeição, será permitido o consumo de água.
- Durante toda a manhã do estudo é importante permanecer em repouso.
- Mulheres, agendar a sua participação 1 semana após o término da fase menstrual do ciclo.

Dúvidas? Entrar em contato com: mcristiane@gmail.com ou (48) 9 9602-0653

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

**APÊNDICE E – TEMPOS DE RETENÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS
CLOROGÊNICOS, IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA**

E1. Teor de ácidos clorogênicos na infusão de folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., preparada na proporção de 100 mg/mL.

Composto	Picos	Tr (min)	Concentração (mg/mL)
Ácido 3-cafeoilquínico	1	5,7	9,99 ± 0,66 ^a
Ácido 5-cafeoilquínico	2	8,9	2,17 ± 0,27 ^c
Ácido 4-cafeoilquínico	3	10,4	2,45 ± 0,30 ^c
Ácido 3,5 di-cafeoilquínico	4	23,5	5,64 ± 0,26 ^b
Ácido 4,5 di-cafeoilquínico	5	24,1	1,74 ± 0,19 ^c
Total ácidos clorogênicos			21,99 ± 0,16

Resultados expressos em média ± desvio padrão de três determinações em triplicata.

Valores médios com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,002$). ANOVA e teste de Tukey. Tr: Tempo de retenção. Água ultrapura à $80 \pm 1^\circ\text{C}$ (300 mL) adicionada sobre 30g de folhas de *Ilex paraguariensis* (100mg /mL).

E2. Teor de ácidos clorogênicos na infusão de folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., preparada na proporção de 100 mg/mL, após 24 hs em temperatura de refrigeração (8 °C) e ambiente (25 °C).

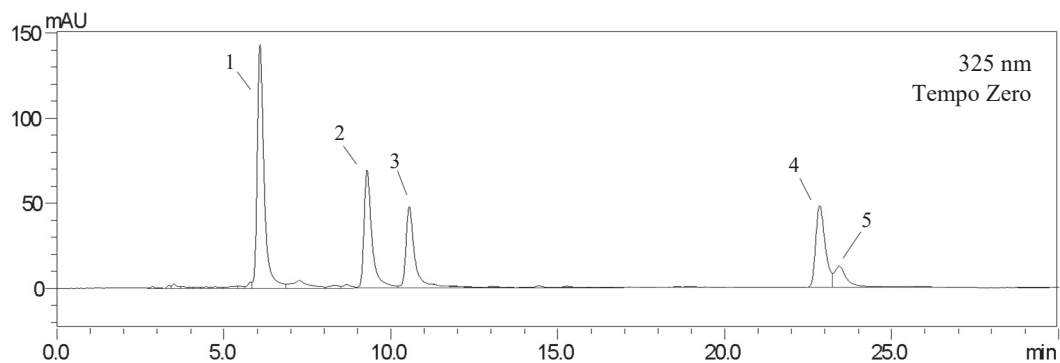
Composto	Picos	Concentração (mg/mL) a 8 °C	Concentração (mg/mL) a 25 °C
Ácido 3-cafeoilquínico	1	9,69 ± 0,74 ^a	8,38 ± 0,05 ^a
Ácido 5-cafeoilquínico	2	1,96 ± 0,16 ^c	1,62 ± 1,74 ^c
Ácido 4-cafeoilquínico	3	2,33 ± 0,11 ^c	1,94 ± 0,95 ^c
Ácido 3,5 di-cafeoilquínico	4	4,40 ± 0,09 ^b	3,90 ± 3,37 ^b
Ácido 4,5 di-cafeoilquínico	5	1,36 ± 0,10 ^c	1,24 ± 0,77 ^c
Total ácidos clorogênicos		19,74 ± 2,01	17,09 ± 1,22

Resultados expressos em média ± desvio padrão de três determinações em triplicata.

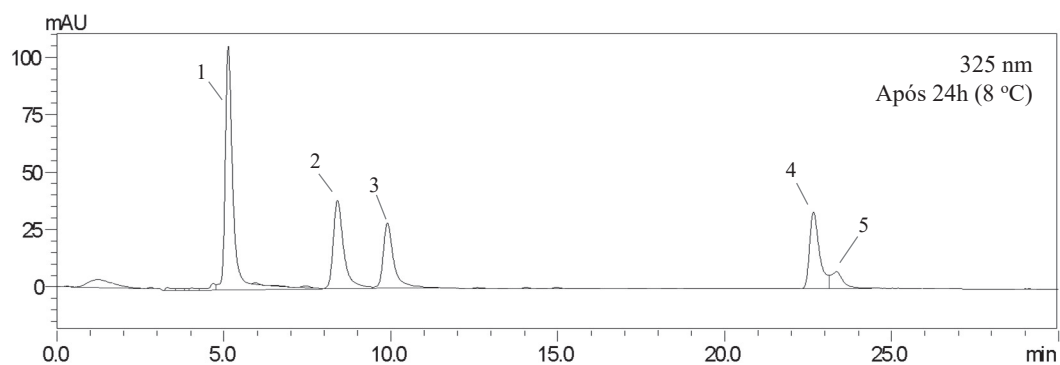
Valores médios com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,002$). ANOVA e teste de Tukey. Água ultrapura à $80 \pm 1^\circ\text{C}$ (300 mL) adicionada sobre 30g de folhas de *Ilex paraguariensis* (100mg /mL).

**APÊNDICE F – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DO PERFIL DE ÁCIDOS
CLOGRÔNICOS DA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE**

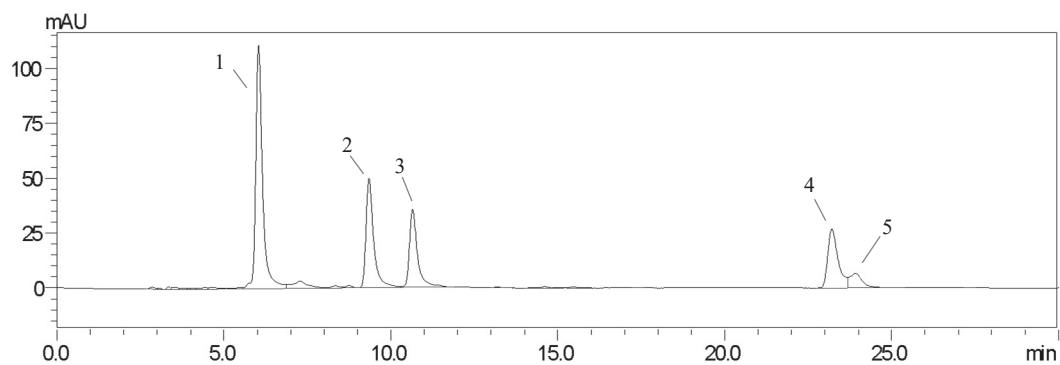
F1. Cromatograma representativo do perfil de ácidos clorogênicos (325nm) da infusão de folhas de *Ilex paraguariensis* (100 mg/mL), imediatamente após o preparo, tempo zero.



F2. Cromatograma representativo do perfil de ácidos clorogênicos (325nm) da infusão de folhas de *Ilex paraguariensis* (100 mg/mL), após 24h à 8 °C.



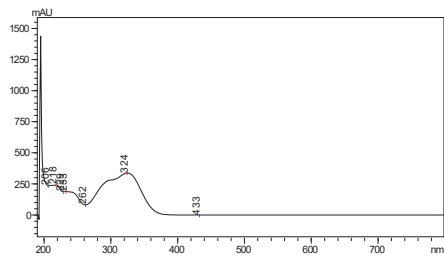
F3. Cromatograma representativo do perfil de ácidos clorogênicos (325nm) da infusão de folhas de *Ilex paraguariensis* (100 mg/mL), após 24h à 25 °C.



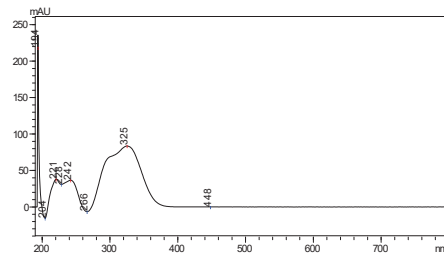
Picos: 1) Ácido 3-cafeoilquínico; 2) Ácido 5-cafeoilquínico; 3) Ácido 4-cafeoilquínico; 4) Ácido 3,5-dicafeoilquínico; 5) Ácido 4,5-dicafeoilquínico.

**APÊNDICE G – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS
IDENTIFICADOS NA INFUSÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE**

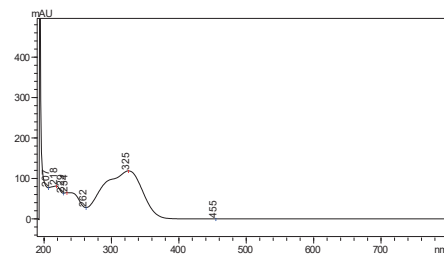
G. Espectros de absorção, com detector de arranjo de diodos (DAD), dos ácidos clorogênicos encontrados na infusão de folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.



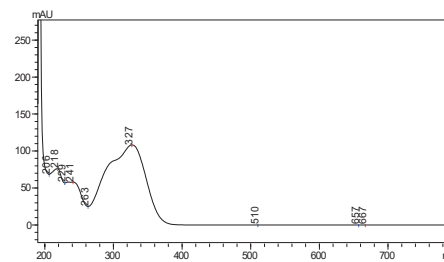
a) Ácido 3-cafeoilquínico



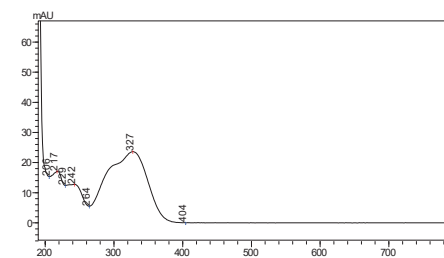
b) Ácido 4-cafeoilquínico



c) Ácido 5-cafeoilquínico



d) Ácido 3,5-cafeoilquínico



e) Ácido 4,5-cafeoilquínico

**APÊNDICE H – CARACTERÍSTICAS BIODEMOGRÁFICAS E OS PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS BASAIS DOS PARTICIPANTES
CONSIDERADOS SAUDÁVEIS**

H. Caracterização biodemográfica e clínica dos voluntários saudáveis ao iniciar a intervenção e valores para a área abaixo da curva de ferro sérico (AUC_{0-4h}) após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme (1,4 mg endógeno e 10 mg adicionado na forma de ferro ferroso).

Voluntário	Sexo	Idade no início da intervenção (anos)	Marcadores hematológicos e bioquímicos no início da intervenção									Antropometria no início da intervenção		
			Ht (%)	Hg (g/dL)	Fe ($\mu\text{mol/L}$)	CTLF ($\mu\text{mol/L}$)	Sat. Trans (%)	Ferritina ($\mu\text{g/L}$)	AST (U/L)	ALT (U/L)	PCR-us (mg/L)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m^2)
1	M	38	42,2	14,5	19,7	58,55	34	68	30	19	1,19	69	1,75	22,55
2	M	26	40,5	13,9	19,16	60,35	32	89,1	24	42	0,9	74	1,79	23,13
3	F	29	45,0	14,5	8,95	5,01	13	28	17	19	0,3	67	1,77	21,41

Legenda: Ht, hematócrito; Hg, hemoglobina; Fe, Ferro sérico; CLTF, contagem total de ligação do ferro; Sat. Trans., índice de saturação de transferrina; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; PCR-us, proteína C reativa ultra sensível e IMC, índice de massa corporal.

**APÊNDICE I – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES SOBRE A
CARACTERIZAÇÃO BIODEMOGRÁFICA E CLÍNICA DOS PARTICIPANTES COM
HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA *HFE***

I. Informações complementares sobre a caracterização biodemográfica e clínica dos participantes com hemocromatose hereditária *HFE*.

Participante	Mutação	Sexo	Diagnóstico (ano)	Uso de substâncias quelantes contra o ferro**	Volume (mL) da última flebotomia	Consumo bebida alcoólica***	Fumante	Cuidados com a alimentação, devido a HH****
1	C282Y/H63D	M	2015	-	400	Sim	Não	Sim
2	C282Y/H63D	M	2015	-	450	Sim	Não	Não
3	C282Y/C282Y	M	2014	-	450	Sim	Sim****	Sim
4	C282Y / WT	M	2014	-	450	Não	Não	Sim
5	C282Y/C282Y	M	2010	-	450	Sim	Não	Sim
6	C282Y/H63D	M	2012	-	500	Sim	Não	Não
7	C282Y/C282Y	F	2016	-	500	Não	Não	Sim
8	C282Y/C282Y	M	2000	-	400	Não	Não	Sim
9	C282Y/C282Y	M	2016	-	500	Sim	Não	Não
10	C282Y/C282Y	M	2016	-	500	Sim	Não	Não
11	C282Y/C282Y	M	1999	-	500	Sim	Não	Sim
12*	C282Y/C282Y	M	2012	-	400	Não	Não	Não
13	C282Y/C282Y	F	2008	-	500	Não	Não	Sim
14	C282Y/H63D	M	2014	-	500	Não	Não	Não

O intervalo entre a data da última flebotomia e o início da intervenção para todos os participantes foi de 30 dias ou mais.

* Iniciou com as flebotomias em 2015. Ovolactovegetariano desde a adolescência.

** Nenhum participante utiliza medicamento ou suplemento quelante contra o ferro. 12 participantes não consomem diariamente após as refeições chá preto, chá verde, chimarrão ou café. Apenas dois participantes tem o hábito de tomar café ou chá verde após o almoço. Outros dois participantes têm o hábito de consumir bebida à base erva-mate diariamente (chimarrão), porém longe das refeições.

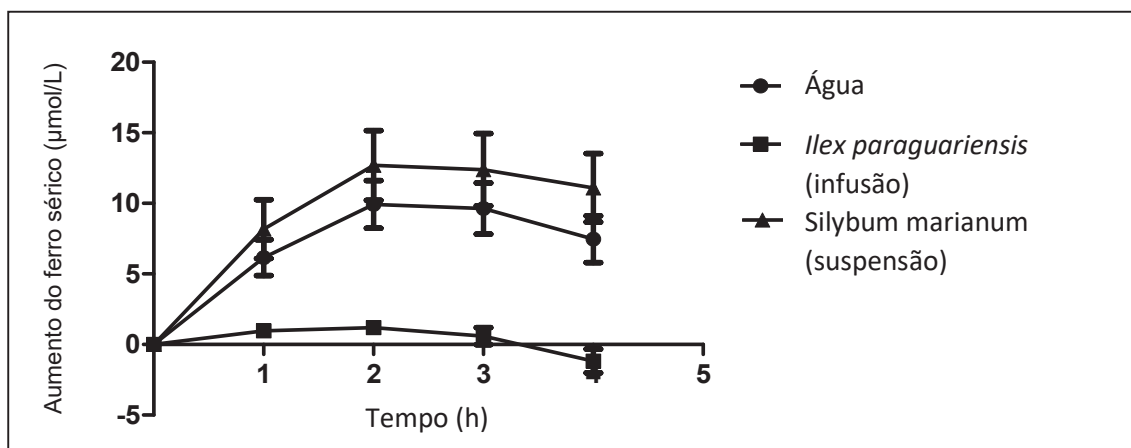
*** Entre os 08 participantes que consomem bebida alcoólica, ocorre socialmente, sendo 01 raramente e 07 semanalmente.

**** Sem fumar nas manhãs de intervenção.

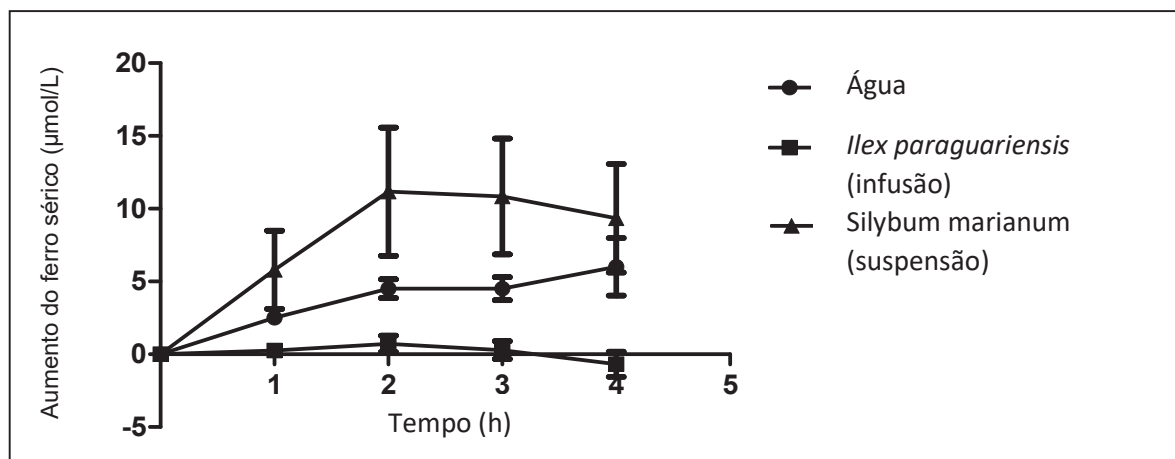
***** 03 participantes, redução no consumo de carnes vermelhas; 03 participantes, redução no consumo de carnes vermelhas e vegetais verde escuro e 02 participantes, redução no consumo de feijão.

**APÊNDICE J – CURVAS DE FERRO SÉRICO, POR MUTAÇÃO NO GENE *HFE* E
POR NÍVEIS DE FERRITINA SÉRICA**

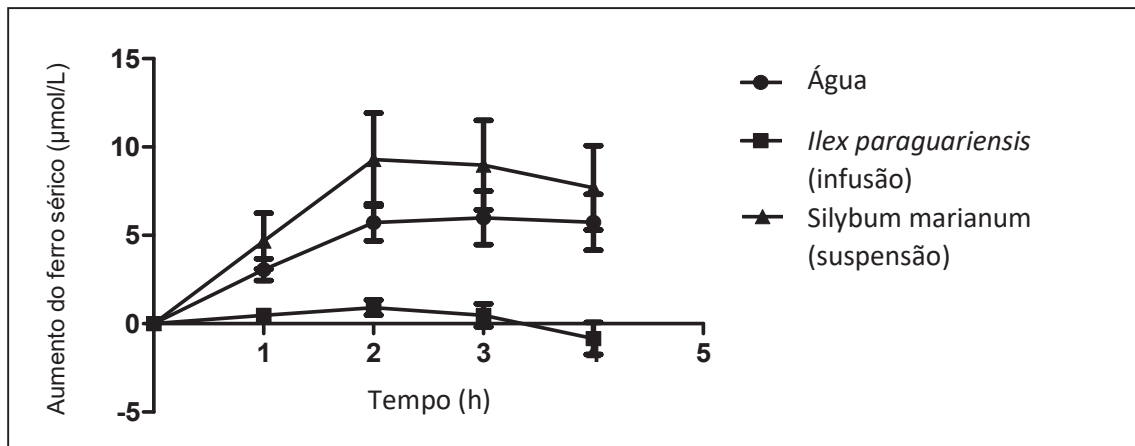
J1. Curvas de ferro sérico após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme (1,4 mg endógeno e 10 mg adicionado na forma de íon ferroso) por portadores de HH *HFE* C282Y homocigoto (n = 09).



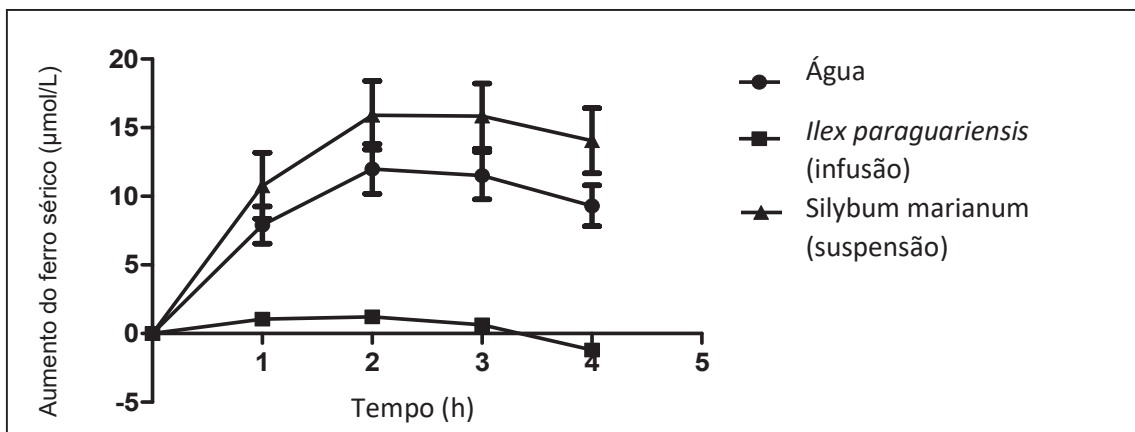
J2. Curvas de ferro sérico após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme (1,4 mg endógeno e 10 mg adicionado na forma de íon ferroso) por portadores de HH *HFE* C282Y/H63D heterocigoto e C282Y heterocigoto (n = 05).



J3. Curvas de ferro sérico após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme (1,4 mg endógeno e 10 mg adicionado na forma de íon ferroso) por portadores de HH *HFE* com concentração de ferritina sérica > 50 µg/L (n = 09).



J4. Curvas de ferro sérico após a ingestão de uma refeição contendo 11,4 mg de ferro não heme (1,4 mg endógeno e 10 mg adicionado na forma de íon ferroso) por portadores de HH *HFE* com concentração de ferritina sérica < 50 µg/L (n = 05).



**APÊNDICE K – PARÂMETROS DERIVADOS DAS CURVAS DE FERRO SÉRICO,
POR MUTAÇÃO NO GENE *HFE* E POR NÍVEIS DE FERRITINA SÉRICA**

Tabela K1. Parâmetros derivados das curvas de ferro sérico, utilizadas como indicadores da absorção do ferro (AUC_{1-4h} , Δ máx. ferro e % percentual de recuperação do ferro no pico máximo), de acordo com o tipo de mutação.

Pacientes HH <i>HFE</i>	Parâmetros	Tratamentos		
		<i>Ilex paraguariensis</i>	Água	<i>Silybum marianum</i>
Mutação do gene <i>HFE</i>				
Pacientes C282Y/C282Y (n = 09)	AUC_{0-4h} ($\mu\text{mol. min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$)	197,5 \pm 62,2 ^a	1769,9 \pm 325,0 ^b	2328,9 \pm 487,9 ^b
	Δ max. ($\mu\text{mol/L}$)	1,53 \pm 0,36 ^a	10,50 \pm 1,75 ^b	13,07 \pm 2,53 ^b
	% Fe max.	2,71 \pm 0,67 ^a	18,62 \pm 3,45 ^b	22,60 \pm 4,25 ^b
Pacientes C282Y/H63D e C282Y/- (n = 05)*	AUC_{0-4h} ($\mu\text{mol. min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$)	129,8 \pm 59,3 ^a	872,5 \pm 145,3 ^b	1954,4 \pm 759,7 ^b
	Δ max. ($\mu\text{mol/L}$)	0,97 \pm 0,42 ^a	6,59 \pm 1,98 ^b	11,42 \pm 4,38 ^b
	% Fe max.	1,77 \pm 0,73 ^a	11,86 \pm 3,41 ^b	19,97 \pm 7,26 ^b

Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Valores médios com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA-MR; $p < 0,05$). Valores de significância foram ajustados pela correção de Bonferroni para múltiplos testes ($p < 0,05$). AUC_{1-4h} : área de baixo da curva; Δ max.: aumento máximo da absorção de ferro sérico; % Fe max.: percentual de recuperação do ferro no pico máximo * Cinco pacientes heterozigoto composto, C282Y/H63D e um paciente C282Y heterozigoto, C282Y/-.

Tabela K2. Parâmetros derivados das curvas de ferro sérico, utilizadas como indicadores da absorção do ferro (AUC_{1-4h} , Δ máx. ferro e % percentual de recuperação do ferro no pico máximo), de acordo com a concentração de ferritina sérica.

Pacientes HH HFE	Parâmetros	Tratamentos		
		<i>Ilex paraguariensis</i>	Água	<i>Silybum marianum</i>
Ferritina Sérica ($\mu\text{g/L}$)				
Total pacientes com ferritina sérica > 50 (n = 09)	AUC_{0-4h} ($\mu\text{mol. min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$)	173,2 \pm 66,7 ^a	1062,3 \pm 223,7 ^b	1610,3 \pm 467,6 ^b
	Δ max. ($\mu\text{mol/L}$)	1,33 \pm 0,42 ^a	7,46 \pm 1,56 ^b	9,57 \pm 2,64 ^b
	% Fe max.	2,43 \pm 0,75 ^a	13,73 \pm 3,10 ^b	17,17 \pm 4,49 ^b
Total pacientes com ferritina sérica < 50 (n = 5)*	AUC_{0-4h} ($\mu\text{mol. min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$)	173,4 \pm 46,5 ^a	2146,0 \pm 402,3 ^b	3247,9 \pm 486,9 ^b
	Δ max. ($\mu\text{mol/L}$)	1,32 \pm 0,26 ^a	12,06 \pm 2,22 ^b	17,72 \pm 2,61 ^b
	% Fe max.	2,28 \pm 0,53 ^a	20,67 \pm 4,42 ^b	29,74 \pm 4,55 ^b

Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Valores médios com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA-MR; $p < 0,05$). Valores de significância foram ajustados pela correção de Bonferroni para múltiplos testes ($p < 0,05$). AUC_{1-4h} : área de baixo da curva; Δ max.: aumento máximo da absorção de ferro sérico; % Fe max.: percentual de recuperação do ferro no pico máximo *Todos os pacientes C282Y homocigoto.

APÊNDICE L – ESTUDO DE PREDIÇÃO *IN SILICO*

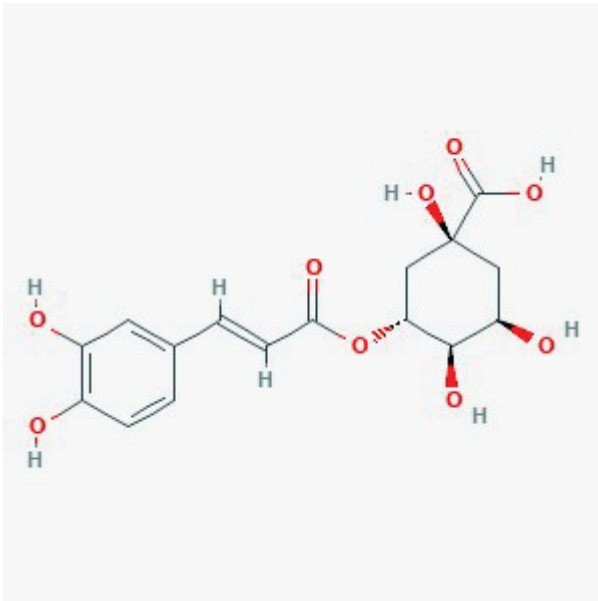
Estudo de predição *in silico*

Um estudo *in silico* foi aplicado com o emprego do software Prediction of Activity Spectra for Substances (PassOnline) (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>) (SIRIVAS et al. 2014), para verificar se os ácidos cafeoilquínicos identificados na presente infusão de folhas de erva-mate (ácidos 3-, 4-, 5-, 3,5-, e 4,5- cafeoilquínicos), seriam possíveis candidatos para a complexação com o ferro. Os achados foram confrontados com estudos encontrados na literatura, que para os ácidos fenólicos da família dos ácidos clorogênicos revelam ter efeito antioxidante devido as suas propriedades quelantes de ferro (KONO et al. 1998; ANDJELKOVIC et al. 2006; LI et al. 2018). A complexação do ferro com os ácidos cafeoilquínicos é considerada um mecanismo antioxidante, visto que o ferro complexado não tem a capacidade de promover a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) formado pela reação de Fenton (KONO et al. 1998; IMAM et al. 2017, LI et al. 2018).

Para o início do estudo foi verificado o desenho da molécula no banco de dados de química do *National Institutes of Health* (NIH) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), que transmitiu as informações químicas referentes a cada molécula de interesse. Com esses dados foi possível realizar o estudo *in silico* proposto, a partir do Software PassOnline.

O Software PassOnline é uma ferramenta altamente recomendada na previsão do espectro de atividade para substâncias, com o objetivo de avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica sobre o organismo humano (OLIVEIRAL et al. 2018). O qual mostrou, que os ácidos mono-cafeoilquínicos e di-cafeoilquínicos encontrados na infusão de folhas de erva-mate são considerados um potencial antioxidante, por terem alcançado uma pontuação forte, originada da diferença entre os índices de potencialmente ativos (dados na caixa verde) e potencialmente inativos (dados na caixa vermelha), pois valores superiores a 0,5 são considerados potencialmente ativos. Os resultados encontrados foram: ácido 3-cafeoilquínico 0,781 (0,785 - 0,004); ácido 4-cafeoilquínico 0,767 (0,771 - 0,004); ácido 5-cafeoilquínico 0,781 (0,785 - 0,004); ácido 3,5-cafeoilquínico 0,776 (0,780 - 0,004) e ácido 4,5-cafeoilquínico 0,803 (0,806 - 0,003). Nas **Figuras 1, 3, 5, 7 e 9** é possível visualizar a estrutura química dos ácidos cafeoilquínicos analisados e nas **Figuras 2, 4, 6, 8 e 10** os índices de potencialmente ativos e potencialmente inativos de cada composto.

Figura 1 – Estrutura química do ácido 3-cafeoilquínico
C1C(C(C(CC1(C(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O)O



Fonte: National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

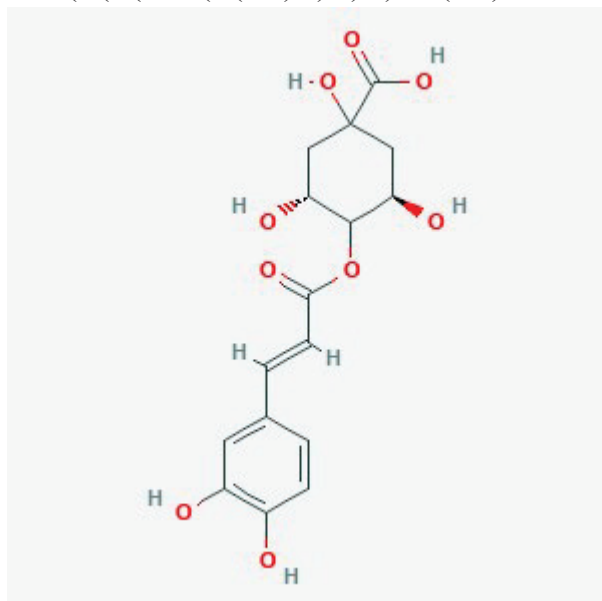
Figure 2: Previsão da atividade biológica com base na estrutura do ácido 3-cafeoilquínico, segundo análise *in silico*.

0,785	0,004	Antioxidant
-------	-------	-------------

Legenda: Potencialmente ativo (caixa verde) e potencialmente inativo (caixa vermelha).

Figure 3: Previsão da atividade biológica com base na estrutura do ácido 4-caffeoilquínico

C1C(C(C(CC1(C(=O)O)O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O



Fonte: National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

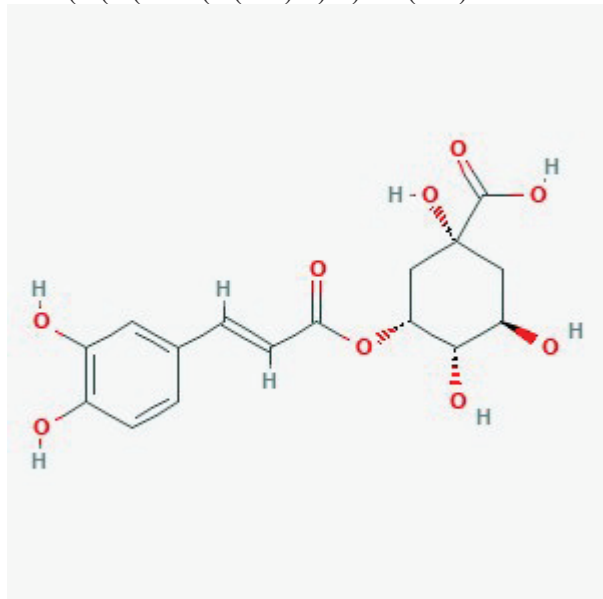
Figure 4: Previsão da atividade biológica com base na estrutura do ácido 4-caffeoilquínico, segundo análise *in silico*.

0,771	0,004	Antioxidant
-------	-------	-------------

Legenda: Potencialmente ativo (caixa verde) e potencialmente inativo (caixa vermelha).

Figure 5: Previsão da atividade biológica com base na estrutura do ácido 5-cafeoilquínico,

C1C(C(C(CC1(C(=O)O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O.



Fonte: National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

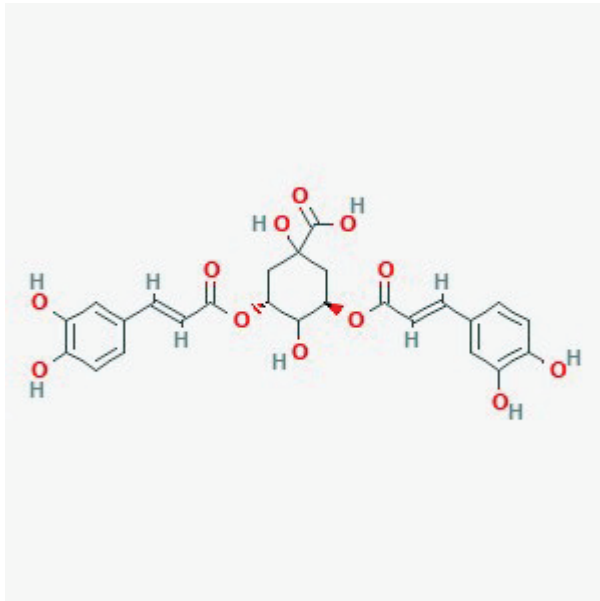
Figure 6: Previsão da atividade biológica com base na estrutura do ácido 5-cafeoilquínico, segundo análise *in silico*.

0,785	0,004	Antioxidant
-------	-------	-------------

Legenda: Potencialmente ativo (caixa verde) e potencialmente inativo (caixa vermelha).

Figura 7 – Estrutura química do ácido 3,5-cafeoilquínico,

C1C(C(C(CC1(C(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O)OC(=O)C=CC3=C(C(=C(C=C3)O)O).



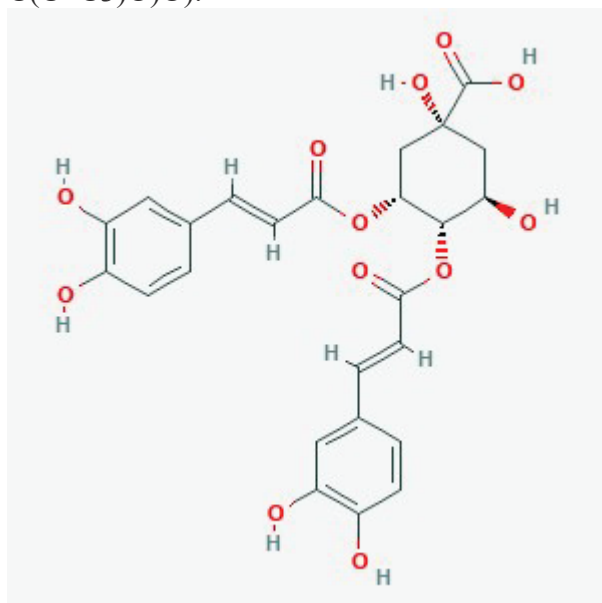
Fonte: National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Figure 8: Previsão da atividade biológica com base na estrutura do ácido 3,5-cafeoilquínico, segundo análise *in silico*.

0,780	0,004	Antioxidant
-------	-------	-------------

Legenda: Potencialmente ativo (caixa verde) e potencialmente inativo (caixa vermelha).

Figura 9 – Estrutura química do ácido 4,5-cafeoilquínico,
C1C(C(C(CC1(C(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)OC(=O)C=CC3=CC(=C(C=C3)O)O).



Fonte: National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information
 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Figure 10: Previsão da atividade biológica com base na estrutura do ácido 4,5-cafeoilquínico, segundo análise *in silico*.

0,806	0,003	Antioxidant
-------	-------	-------------

Legenda: Potencialmente ativo (caixa verde) e potencialmente inativo (caixa vermelha).

Referências bibliográficas

ANDJELKOVIC, M, V. C., DE MEULENAER, B., DEPAEMELAERE, G., SOCACIU, C., VERLOO, M., ROLAND, V. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*. V. 98, n.1, p. 23-31, 2006.

IMAM, M.U., ZHANG, S., MA, J. WANG, H., WANG, F. Antioxidants mediate both iron homeostasis and oxidative stress. *Nutrients*, v. 9, n. 7, p. 1-19, 2017.

KONO, Y., KASHINE, S., YONEYAMA, T., SAKAMOTO, Y., SHIBATA, H. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. v. 62, n. 1, p. 22-27, 1998.

LI, X., Li, K., XIE, Y., Li, Y., ZHAO, X. JIANG, X., CHEN, D. Antioxidant and cytoprotective effects of the di-o-caffeoilquinic acid family: The mechanism, structure-activity relationship, and conformational effect. *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 23, n. 1, p. 1-12, 2018.

OLIVEIRAL, V. F., OLIVEIRA, H. M. B. F., MEDEIROS, C. I. S., FILHO, A. A. O., REGO, T. G. Análise farmacológica e toxicológica *in silico* do flavonoide 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona. *Journal of Medicine and Health Promotion*. v. 3, n. 1, p. 913-921, 2018.

SIRIVAS, N., SANDEEP, K. S., ANUSHA, Y., DEVENDRA, B. N. *In vitro* cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (mct) alkaloid: An *in silico* approach. *International invention journal of biochemistry and bioinformatics*. v.2, n. 2, p. 19-20, 2014.

APÊNDICE M – DADOS SOBRE COMORBIDADES

L. Comorbidades em portadores de hemocromatose hereditária *HFE*

Indivíduo	Mutação	Sexo	DM2	Hipertensão	Hipotireoidismo	Depressão	Hiper-TG	Hiper-CLT	Artralgia	Cardiovascular	Osteopenia	Urticária	SMT
1	C282Y/H63D	M	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
2	C282Y/H63D	M	X	X	-	-	-	-	X	-	-	-	X
3	C282Y/C282Y	M	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
4	C282Y/-	M	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-
5	C282Y/C282Y	M	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-
6	C282Y/H63D	M	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-
7	C282Y/C282Y	F	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-
8	C282Y/C282Y	M	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X
9	C282Y/C282Y	M	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	C282Y/C282Y	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	C282Y/C282Y	M	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X	-
12	C282Y/C282Y	M	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
13	C282Y/C282Y	F	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
14	C282Y/H63D	M	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-

Abreviações: DM2, Diabetes tipo 2; Hiper-TG, hipertrigliceridemia; Hiper-CLT, hipercolesterolemia; SMT, Síndrome Metabólica;

**ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISAS COM SERES HUMANOS**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) NA ABSORÇÃO DO FERRO ALIMENTAR EM PORTADORES DE HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

Pesquisador: Edson Luiz da Silva

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 64252017.2.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.390.909

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa de doutorado orientado por Edson Luiz Silva, do programa de pós graduação em Nutrição. Segundo os autores, a hemocromatose hereditária é caracterizada pelo aumento de três a quatro vezes da absorção do ferro da alimentação, pela deposição progressiva do ferro e surgimento de lesões em vários órgãos. A associação entre sobrecarga de ferro e risco aumentado para doenças crônicas não transmissíveis, também tem sido evidenciada. Dentre os tratamentos alternativos e coadjuvantes para diminuir a absorção de ferro encontra-se o uso de plantas, infusões e/ou extratos vegetais com propriedades de quelar o ferro da alimentação. A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), largamente consumida no sul do Brasil, possui elevada capacidade de quelar ferro in vitro. Nossa hipótese é que a erva-mate, poderá diminuir a absorção do ferro alimentar em portadores de HH e auxiliar no tratamento.

A proposta inicial era realizar um Estudo clínico, randomizado, controlado e cruzado, com pelo menos 06 indivíduos portadores de HH C282Y homozigoto. Os voluntários serão distribuídos de forma randomizada quanto ao consumo das bebidas e consumirão 200 mL de infusão de erva-mate, na proporção de 20 mg/mL, 200 mL de água (controle

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.390.909

negativo) ou 200 mL de água com extrato de *Sillibum marianum* com 140 mg de silimarina (7 mL Legalon Fort®; controle positivo). Ou seja, considerando que será estudo cruzado, todos os seis participantes passarão pelos três tratamentos (erva-mate, água e *Sillibum marianum*). Inicialmente, na manhã do estudo, os participantes se dirigirão ao Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da UFSC e permanecerão sentados por 15 min para regular o fluxo sanguíneo de repouso. Em seguida, amostras de 4 mL (um tubo de coleta) de sangue venoso periférico serão coletadas, por técnico laboratorial habilitado, em jejum e após 1, 2, 3 e 4 h da ingestão da refeição padronizada contendo sulfato ferroso comercial para alimentos e cada um dos tratamentos (infusão de erva-mate, água ou o controle positivo). Na atual emenda os autores propõem aumentar o "n" de 6 pra 12, com a justificativa de que os resultados preliminares têm mostrado variações pré-analíticas, as quais eram desconhecidas e, portanto, não tinham sido consideradas no cálculo amostral. Na emenda também propõem a inclusão do Serviço de Hemoterapia (Banco de Sangue) do HU-UFSC com a justificativa de que este serviço atende portadores de hemocromatose hereditária (HH), patologia de caráter genético raro. A Declaração de anuência do HU foi apresentada com assinatura da Professora Gerente de Ensino e Pesquisa do HU.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a influência da ingestão aguda de infusão de erva-mate na absorção do ferro alimentar em portadores de HH HFE C282Y homozigoto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos foram devidamente apresentados como possível desconforto ou outros riscos físicos pelo fato de se submeter a jejum de 8 a 10 h e/ ou desconforto pelas coletas de sangue. Para minimizar tais desconfortos, os autores referiram que as coletas serão realizadas logo no início da manhã, para o jejum não se estender por mais tempo e a coleta de sangue será feita por profissionais qualificados, com ampla experiência e com a adoção de procedimentos adequados à coleta de sangue. Todos os materiais utilizados serão descartáveis. Porém, mesmo assim, a coleta de sangue poderá provocar um pouco de dor causada pela "picada" da agulha e, às vezes, a formação de uma mancha roxa, que desaparecerá em poucos dias. Para algumas pessoas, poderá ocorrer, ainda, um pequeno desmaio devido ao nervosismo. Caso isso ocorra, você será prontamente atendido pelos profissionais no próprio local da coleta. Como benefícios, os autores acreditam que, a partir do banco de dados do HEMOSC, seja possível traçar o perfil da população catarinense com HH atendida nessa entidade. Além disto, referem que

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.390.909

iniciarão estudos científicos voltados para essa população no estado, podendo resultar em impacto positivo para a qualidade de vida dos portadores de HH. Também esperam contribuir para pesquisas com plantas regionais, como a erva-mate, com potencial para auxiliar no tratamento da HH e instigar o aumento de pesquisas voltadas à HH no Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa que pode auxiliar na caracterização de pacientes com hemocromatose hereditário e sobre o efeito da erva-mate na absorção do ferro. Estudo experimental que pode trazer contribuições importantes para a área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos devidamente apresentados e assinados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As informações da presente emenda estão em conformidade com as exigências da Resolução 466/12 do CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1014939_E1.pdf	26/10/2017 11:48:56		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Coordenador_Pesquisadora.pdf	26/10/2017 11:46:22	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Outros	NOVO_Justificativa_para_emenda_no_projeto_de_pesquisa.pdf	26/10/2017 10:50:52	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_HEMOSC.pdf	26/10/2017 10:21:24	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instituicao_Analises_Clinicas.pdf	26/10/2017 10:18:44	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisador_Colaborador_Francilene.pdf	26/10/2017 10:17:44	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Novo_Declaracao_Pesquisador_Colaborador_HU_Vivian.pdf	26/10/2017 10:16:50	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Novo_Declaracao_Pesquisador_Colaborador_HU_Andrea.pdf	26/10/2017 10:15:39	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.390.909

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Novo_Declaracao_HU.pdf	26/10/2017 10:14:41	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisador_Colaborador_Bruno.pdf	24/10/2017 10:25:25	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Hemocromatose_Hereditaria_03.pdf	24/10/2017 10:10:16	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_2.pdf	17/05/2017 16:24:11	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Outros	Respostas_Pendencias.pdf	17/05/2017 16:20:08	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Efeito_da_erva_mate_na_reducao_do_ferro_2.pdf	17/05/2017 16:13:58	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Banco_de_dados_hemocromatose_hereditaria_2.pdf	17/05/2017 16:10:15	Cristiane Manfé Pagliosa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_2.pdf	10/05/2017 17:51:48	Edson Luiz da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 21 de Novembro de 2017

Assinado por:
Ylmar Correa Neto
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
CEP: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SC

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada **“Influência da erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) na absorção do ferro alimentar em portadores de hemocromatose hereditária”**, de responsabilidade do professor Dr. Edson Luiz da Silva.

Neste estudo, pretende-se avaliar se a erva-mate – planta usada para preparar o chimarrão – apresenta algumas propriedades consideradas benéficas às pessoas que têm hemocromatose hereditária, uma doença que se caracteriza por aumento do ferro no sangue. Este estudo é necessário porque se acredita que substâncias presentes na erva-mate podem auxiliar na diminuição do ferro sanguíneo, por meio da redução da absorção pelo intestino do ferro que está nos alimentos.

A sua participação nesta pesquisa consistirá no consumo de uma refeição normal contendo 10 mg de ferro (sulfato ferroso comercial para alimentos), juntamente com um copo de 200 mL de erva-mate (grupo intervenção). Além disto, precisamos da sua autorização para coletar amostras de sangue (4 mL, um tubo de coleta), as quais serão realizadas por profissional treinado, antes e após 1, 2, 3 e 4 horas da refeição. Após uma semana, você será novamente convidado(a) a comparecer no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da UFSC, em jejum, e consumir a mesma refeição no café da manhã, acompanhada desta vez de 200 mL de água (grupo controle negativo), sendo realizadas as mesmas coletas de sangue. Por fim, após mais uma semana, você deverá consumir o café da manhã com 200 mL de extrato comercial da planta *Silibum marianum*, a qual possui propriedade comprovada de diminuir o ferro do sangue (grupo controle positivo). Todas as refeições (café da manhã) e bebidas serão preparadas por nutricionista da UFSC e oferecidas a você sem qualquer custo. Os grupos controle positivo e negativo são importantes para monitorar as variações nas concentrações de ferro no sangue, bem como para comparações dos resultados obtidos com a erva-mate.

Além das medidas da concentração de ferro no sangue, serão realizados exames iniciais para as medidas de hemoglobina, ferritina, índice de saturação da transferrina e do marcador inflamatório proteína C reativa. Ao término da pesquisa, você receberá os resultados do estudo.

Na manhã do estudo, você deverá se dirigir ao Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da UFSC, em jejum, para a ingestão da refeição padronizada e para as coletas de sangue. Além disto, serão obtidas informações, por meio de questionamentos, sobre a sua idade, data do diagnóstico para hemocromatose hereditária, número de flebotomias após diagnóstico, no último ano e no último mês, uso de medicamentos ou suplementos que diminuem o ferro do sangue (qual o tipo e por quanto tempo). Também serão aferidos o peso e a altura no primeiro dia do estudo para o cálculo do Índice de Massa Corporal.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva – Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Campus Universitário s/n – Bairro Trindade – 88.040-970 Florianópolis-SC, Brasil. Telefones: (48) 3721-4159 ou 3721-2778.

Comitê de Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da UFSC - Pró-Reitoria de Pesquisa. Localização: Prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, localizado na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis-SC – CEP: 88.040-400. E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br, Telefone: (48) 3721-6094.

Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC): Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina CEMARK – CNPJ 72347982/0001-01. Rua Barão de Batovi, nº630, Anexo Administrativo Hemosc – Centro – Florianópolis /SC – CEP: 88015-340 E-mail: cep.fns@hemosc.org.br, Telefone: (48) -3251-9826.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
CEP: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SC

No dia do estudo, será importante permanecer em jejum de 8 a 10 h, sem a ingestão de água após a meia-noite ou de bebidas alcoólicas no dia anterior ao estudo e sem praticar exercícios físicos 24 horas antes do estudo. Você deverá informar qualquer uso de medicamento que tenha ocorrido imediatamente antes do estudo e não tomar medicamentos que possam afetar a absorção de ferro antes do estudo, mesmo aqueles de uso rotineiro.

O presente estudo poderá causar risco do desconforto ou outros riscos físicos pelo fato de se submeter a jejum de 8 a 10 h e o desconforto pelas coletas de sangue. Para minimizar tal desconforto, as coletas serão realizadas logo no início da manhã, para o jejum não se estender por mais tempo e a coleta de sangue será feita por profissionais qualificados, com ampla experiência e com a adoção de procedimentos adequados à coleta de sangue. Todos os materiais utilizados serão descartáveis. Porém, mesmo assim, a coleta de sangue poderá provocar um pouco de dor causada pela “picada” da agulha e, às vezes, a formação de uma mancha roxa, que desaparecerá em poucos dias. Para algumas pessoas, poderá ocorrer, ainda, um pequeno desmaio devido ao nervosismo. Caso isso ocorra, você será prontamente atendido pelos profissionais no próprio local da coleta.

Será assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como a garantia do livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências. Enfim, você poderá se informar sobre tudo o que queira saber antes, durante ou depois da sua participação.

Você não terá nenhum gasto com a pesquisa. Caso ocorra alguma despesa (como por exemplo, com o seu deslocamento) decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de pagamento em dinheiro diretamente a você ou mediante depósito em sua conta bancária.

Além disto, para viabilizar a sua participação haverá flexibilidade para a realização do estudo em todos os dias da semana, incluindo os finais de semana, com o objetivo de não comprometer a sua rotina de trabalho. As datas previamente serão definidas respeitando a sua disponibilidade.

Entretanto, não haverá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação na pesquisa.

Caso você tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa, poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada.

Esperamos que este estudo traga benefícios às pessoas com hemocromatose hereditária, tais como a possibilidade de utilizar a erva-mate como auxiliar no tratamento de redução do ferro sanguíneo e, assim, evitar a susceptibilidade aumentada dessa população para outras doenças (diabetes, doenças do coração, cânceres).

Esta pesquisa não oferece riscos maiores do que os citados acima, não têm fins lucrativos, é confidencial e o seu nome será usado apenas no primeiro momento de coleta das amostras de sangue. Em seguida, as amostras serão identificadas pelo número do seu cadastro. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas científicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seus dados pessoais sejam mencionados em parte alguma. A participação no estudo não acarretará nenhum tipo de discriminação ou preconceito.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva – Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Campus Universitário s/n – Bairro Trindade – 88.040-970 Florianópolis-SC, Brasil. Telefones: (48) 3721-4159 ou 3721-2778.

Comitê de Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da UFSC - Pró-Reitoria de Pesquisa. Localização: Prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, localizado na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis-SC – CEP: 88.040-400. E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br, Telefone: (48) 3721-6094.

Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC): Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina CEMARK – CNPJ 72347982/0001-01. Rua Barão de Batovi, nº630, Anexo Administrativo Hemosc – Centro – Florianópolis /SC – CEP: 88015-340 E-mail: cep.fns@hemosc.org.br, Telefone: (48) -3251-9826.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
CEP: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SC

O(a) senhor(a) receberá uma via do presente Termo de Consentimento Livre Esclarecido assinada pelos pesquisadores e ficará garantida a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CAAE 64252017.2.0000.0121) e a pesquisa está de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, para proteger os direitos dos seres humanos em pesquisas. No final do estudo, o(a) senhor(a) receberá os resultados obtidos. Havendo qualquer dúvida em relação ao estudo, entrar em contato pelos telefones (48) 3721-27.78 ou 99602-0653.

Eu, abaixo assinado, fui esclarecido sobre a pesquisa **Influência da erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) na absorção do ferro alimentar em portadores de hemocromatose hereditária** e concordo em participar deste estudo. Afirmando que estou ciente da pesquisa e da forma de coleta do material necessário e **AUTORIZO** a utilização de sangue e dos demais dados coletados, sem que haja divulgação de meus dados pessoais. No caso de persistir alguma dúvida ou quiser desistir do estudo, poderei fazê-lo pessoalmente com os pesquisadores no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose, localizado no 1º andar do Bloco K, Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (Rua Delfino Conti s/n, Trindade. CEP 88040-370, Florianópolis-SC) ou através dos telefones (48) xxxx-xxxx ou (48) xxxxx-xxxx, sem justificativas.

Nome do(a) participante: _____

Endereço: _____

RG: _____

Telefone: _____

.....
Assinatura do(a) participante

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

Telefones de contato: (48) xxxx-xxxx; xxxx-xxxx

Assinatura do Pesquisador

Pesquisadora Assistente: Cristiane Manfê Pagliosa

Telefone de contato: (48) xxxxx-xxxx

Assinatura do Pesquisador

Data ____/____/____

Favor rubricar todas as páginas.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva – Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Campus Universitário s/n – Bairro Trindade – 88.040-970 Florianópolis-SC, Brasil. Telefones: (48) 3721-4159 ou 3721-2778.

Comitê de Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da UFSC - Pró-Reitoria de Pesquisa. Localização: Prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, localizado na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis-SC – CEP: 88.040-400. E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br, Telefone: (48) 3721-6094.

Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC): Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina CEMARK – CNPJ 72347982/0001-01. Rua Barão de Batovi, nº630, Anexo Administrativo Hemosc – Centro – Florianópolis /SC – CEP: 88015-340 E-mail: cep.fns@hemosc.org.br, Telefone: (48) -3251-9826.

ANEXO C – REGISTRO DO ENSAIO CLÍNICO



Home Advanced Search List By Search Tips UTN ICTRP website REGTRAC Contact us

Main

Note: This record shows only 22 elements of the WHO Trial Registration Data Set. To view changes that have been made to the source record, or for additional information about this trial, click on the URL below to go to the source record in the primary register.

Register: REBEC
Last refreshed on: 15 January 2020
Main ID: RBR-5nrrwc
Date of registration: 30/10/2018
Prospective Registration: No
Primary sponsor: Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC, Brazil
Public title: Erva-mate influence on iron absorption from the diet in people with hereditary iron overload
Scientific title: Effect of erva-mate (Ilex paraguariensis st. hil.) on the absorption of iron in patients with hereditary hemochromatosis
Date of first enrolment: 01/09/2017
Target sample size: 12
Recruitment status: Recruiting
URL: <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-5nrrwc/>
Study type: Intervention
Study design: Controlled and randomized crossover open-label trial treatment
Phase: N/A

Countries of recruitment

Brazil

Contacts

Name: Cristiane Manfê Pagliosa	Name: Cristiane Manfê Pagliosa
Address: Rua Delfino Conte sem número 88040-370 Florianópolis Brazil	Address: Rua Delfino Conti sem número 88040-370 Florianópolis Brazil
Telephone: +55 48 996020653	Telephone: +55 48 996020653
Email: mcristiane@gmail.com	Email: mcristiane@gmail.com
Affiliation: Universidade Federal de Santa Catarina	Affiliation: Universidade Federal de Santa Catarina

Key inclusion & exclusion criteria

Inclusion criteria: hereditary hemochromatosis; live in Florianópolis, State of Santa Catarina Brazil; a minimum age limit of 18 years; maintenance treatment; homozygous for the C282Y mutation in HFE; absence of anemia and a minimum interval of one month from the last phlebotomy.
 Exclusion criteria: Use of chelating agents 24 hours prior to the start of the study; presence of acute or chronic infections; cancer; diagnosis for secondary hemochromatosis and in women in the menstrual phase of the menstrual cycle.

Age minimum: 18

Age maximum: 80

Gender: -

Health Condition(s) or Problem(s) studied

Disorders of iron metabolism

disorders of iron metabolism; hemochromatosis

Disorders of iron metabolism

Hemochromatosis

E00-E90

Hemochromatosis

Intervention(s)

All participants will receive all treatments: Ilex paraguariensis infusion, water and silybum marianum suspension and in random order. This is a crossover study and will be with 12 participants.

Intervention group: The participants are 12 patients with Hereditary Hemochromatosis. They will be ingesting a standardized meal containing, 11.4 mg non-haem iron (1.4 endogenous and 10 mg added in the form of ferrous sulfate) and with the treatment for the intervention group: 200 mL Ilex paraguariensis (erva-mate) leave infusion. The infusion will be prepared in proportion of 100 mg/mL and 10 min of infusion.

Negative control group: The participants are 12 patients with Hereditary Hemochromatosis. They will be ingesting a standardized meal containing, 11.4 mg non-haem iron (1.4 endogenous and 10 mg added in the form of ferrous sulfate) and with the treatment for the negative control group, 200 mL water.

Positive control group or silybum marianum group: The participants are 12 patients with hereditary hemochromatosis. They will be ingesting a standardized meal containing, 11.4 mg non-haem iron (1.4 endogenous and 10 mg added in the form of ferrous sulfate) and with the treatment for the silybum marianum group: 200 mL water and silybum marianum commercial suspension with 140 mg in the form of silybin. Silybum marianum just has already been studied to reduce iron absorption.

After an overnight fast, blood will be taken immediately before and at 1, 2, 3 and 4 hours after ingestion of the standardized meal with the treatment (Ilex paraguariensis infusion, water or silybum marianum suspension). The patients will participate three morning at same hour (between 08:00 – 08:30 hours) after fasting overnight with an interval of seven days between each test (treatment).

Dietary supplement

Genetics

Other

Supplementary Feeding

Primary Outcome(s)

The appearance and clearance of total serum iron will be assessed by calculating the area under the serum iron curve over the 4 hours observation period.

The area under the serum iron curve will be calculated using the trapezium rule by the statistic software GraphPad Prism 6.0

The area under the curve is constructed with the results for the concentration of serum iron in micromol per liter as a function of the time in hours. Samples of blood collected at time zero and after 1, 2, 3 and 4 hours.

The expected result is to demonstrate whether the consumption of Ilex paraguariensis (erva mate) can decrease the absorption of iron meal in patients with hereditary

hemochromatosis. Thus, to contribute with perspectives related to the adjuvant treatment of hereditary hemochromatosis, with the search for natural chelating compounds, which may reduce the absorption of dietary iron in the patients.

Secondary Outcome(s)

Secondary outcomes are not expected.

Secondary ID(s)

2.390.909

64252017.2.0000.0121

Source(s) of Monetary Support

Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC, Brazil

Secondary Sponsor(s)

Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina - HEMOSC - Florianópolis, SC, Brazil

Ethics review

Status:

Approval date:

Contact:

Results

Results available:

Date Posted:

Date Completed:

URL:

Disclaimer: Trials posted on this search portal are not endorsed by WHO, but are provided as a service to our users. In no event shall the World Health Organization be liable for any damages arising from the use of the information linked to in this section. None of the information obtained through use of the search portal should in any way be used in clinical care without consulting a physician or licensed health professional. WHO is not responsible for the accuracy, completeness and/or use made of the content displayed for any trial record.

[Copyright - World Health Organization](#) - Version 3.6 - [Version history](#)