

***Trifolium pratense* L.: uma alternativa para o tratamento de sintomas vasoativos em mulheres pré e pós-menopausa**

Trifolium pratense L.: an alternative for the treatment of vasoactive symptoms in pre and postmenopausal women

Trifolium pratense L.: una alternativa para el tratamiento de los síntomas vasoactivos en mujeres pre y posmenopáusicas

Recebido: 29/08/2022 | Revisado: 15/09/2022 | Aceito: 17/09/2022 | Publicado: 23/09/2022

Anna Cyntia Brandão Nascimento Maniçoba

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1850-9767>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: annacyntia@hotmail.com

Valéria Maria Sousa Leitão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7460-0813>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: valeriasleitao@yahoo.com.br

Maria Beatriz Coutinho Moraes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4636-6369>

Centro Universitário Unidade de Ensino Superior Dom Bosco, Brasil

E-mail: moraesmaria100@gmail.com

Ana Paula Muniz Serejo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4376-4364>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: apsmuniz1@gmail.com

Tássio Rômulo Silva Araújo Luz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7968-0915>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: tassioromulo@gmail.com

Flávia Maria Mendonça do Amaral

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7845-8562>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: flavia.amaral@ufma.br

Denise Fernandes Coutinho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5665-9280>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: denise.coutinho@ufma.br

Resumo

As mulheres durante as fases pré e pós-menopausa apresentam carência de estrogênio, o que acarreta diversos sintomas, destacando os vasomotores, principalmente os fogachos. Existem diversos tratamentos de reposição hormonal para o controle dessas manifestações clínicas, dentre eles, terapias com a espécie medicinal *Trifolium pratense* L., conhecida popularmente como trevo-vermelho ou Red clover. No Brasil, existem fitoterápicos desta espécie registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e descritos no Memento terapêutico e no Formulário de Fitoterápicos como um coadjuvante terapêutico no tratamento do climatério. Este trabalho é uma revisão integrativa e narrativa de estudos clínicos randomizados com *T. pratense* no controle dos fogachos em mulheres nos períodos de pré e pós-menopausa. A pesquisa de literatura foi realizada nas bases: Cochrane, CINAL, LILACS, MEDLINE, PsycINFO e Web of Science empregando os descritores: “*Trifolium pratense*”, “clinical trial” e “hot flashes”. Foram analisados 7 artigos; em 3 (três) estudos, houve diferença significativa na redução dos episódios de fogachos quando comparados com os grupos placebo, no entanto estes apresentavam problemas metodológicos, como falta de padronização dos fitoterápicos e tamanho amostral inadequado. Estudos demonstram a necessidade de uma microbiota intestinal específica para transformação das isoflavonas na sua forma ativa S-equol. Dessa forma, concluiu-se que produtos de *Trifolium pratense* podem ser alternativas no controle dos fogachos principalmente para pacientes que possuem restrição ao uso de estrogênio, com a ressalva de avaliar se a paciente apresenta bactérias produtoras de S-equol, sendo necessários estudos clínicos randomizados para validação dessa espécie vegetal no controle desse sintoma vasoativo.

Palavras-chave: Trevo vermelho; Ensaio clínico; Ondas de calor.

Abstract

Menopausal women experience estrogen deficiency during this period, which causes vasomotor symptoms such as mood swings, hot flashes, palpitations, headache, irritation, and depression. There are several pharmacological treatments as well as the use of dietary supplements to control these clinical manifestations, however therapies from medicinal plants have been highlighted, among them *Trifolium pratense* L. Popularly known as Red clover, it has a record in the Therapeutic Memento and in the Anvisa's Herbal Medicines Form, being considered a therapeutic adjunct in the treatment of climacteric. An integrative and narrative review using the Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL), Cumulative Index for Nursing and Allied Health Literature (CINAHL; www.ebscohost.com/cinahl/), Embase, PubMed, LILACS, MEDLINE, PsycINFO and Web of Science as keywords adopted: “*Trifolium pratense*”, “clinical trial” and “hot flashes”. As a complement to the review, protocols for studies and ongoing trials were searched on CriticalTrials.gov. What resulted after analysis of the articles, 7 records. It is noted that the plant species studied exhibits a wealth of isoflavones in its composition, these metabolites are considered selective modulators of estrogen receptors, and can act as agonist and antagonist of estrogen receptors. Significant results were observed with *Trifolium pratense* in relieving hot flashes in women, however further trials are needed to safely define this clinical practice.

Keywords: Red clover; Clinical trial; Hot flashes.

Resumen

Las mujeres menopáusicas experimentan deficiencia de estrógenos durante este período, lo que provoca síntomas vasomotores como cambios de humor, sofocos, palpitaciones, dolor de cabeza, irritación y depresión. Existen varios tratamientos farmacológicos así como el uso de suplementos dietéticos para el control de estas manifestaciones clínicas, sin embargo se han destacado las terapias a base de plantas medicinales, entre ellas *Trifolium pratense* L. Conocida popularmente como trébol rojo, tiene registro en el Memento Terapéutico y en Formulario de Medicamentos Herbolarios de la Anvisa, siendo considerado un complemento terapéutico en el tratamiento del climaterio. Una revisión integradora y narrativa utilizando el Registro Cochrane Central de Ensayos Controlados (CENTRAL), el Índice Acumulativo de Literatura de Enfermería y Salud Afín (CINAHL; www.ebscohost.com/cinahl/), Embase, PubMed, Embase, LILACS, MEDLINE, PsycINFO y Web of Science como palabras clave adoptadas: “*Trifolium pratense*”, “ensayo clínico” y “sofocos”. Como complemento a la revisión, se realizaron búsquedas de protocolos de estudios y ensayos en curso en CriticalTrials.gov. Lo que resultó después del análisis de los artículos, 7 registros. Se observa que la especie vegetal estudiada exhibe una gran riqueza de isoflavonas en su composición, estos metabolitos son considerados moduladores selectivos de los receptores de estrógenos, pudiendo actuar como agonista y antagonista de los receptores de estrógenos. Se observaron resultados significativos con *Trifolium pratense* en el alivio de los sofocos en las mujeres; sin embargo, se necesitan más ensayos para definir con seguridad esta práctica clínica.

Palabras clave: Trébol rojo; Ensayo clínico; Sofocos.

1. Introdução

Mulheres na pré-menopausa (climatério), menopausa e na pós-menopausa geralmente se queixam de uma série de sintomas físicos e psicológicos, chamados de Síndrome da Menopausa, resultantes do declínio da função ovariana com flutuação ou diminuição do nível de estrogênio. Cerca de dois terços das mulheres sofrem com esses sintomas relacionados à menopausa (Frednman, 2014).

As mulheres geralmente passam o último terço de sua vida na menopausa, após o término de seus anos reprodutivos. Durante esse período da menopausa, as mulheres experimentam uma variedade de sintomas e condições previsíveis relacionados a mudanças nos níveis de hormônios sexuais e ao processo de envelhecimento natural. A menopausa é precedida por um período de transição denominado de climatério (pré-menopausa), onde é observada principalmente a irregularidade do ciclo menstrual e por ondas de calor e suores noturno, sendo a menopausa a última menstruação da mulher (Takahashi et al, 2015). Em muitas publicações, esses períodos de pré (peri) e pós-menopausa são chamados genericamente de menopausa, não havendo diferenciação das fases exatas desse período importante da vida da mulher. As ondas de calor são uma resposta rápida e exagerada de dissipação de calor, consistindo em sudorese profusa, vasodilatação periférica e sensações de calor interno intenso. Eles são desencadeados por pequenas elevações na temperatura corporal central agindo dentro de uma zona termoneutra muito reduzida, isto é, a região temperatura corporal central entre os limiares superior (suor) e inferior (tremores). Isso se deve em parte, mas não inteiramente, à depleção de estrogênio nesse período. A ativação simpática central elevada,

mediada por receptores α 2-adrenérgicos, é um fator responsável pelo estreitamento da zona termoneutra. As ondas de calor são responsáveis por alguns, mas não todos, os distúrbios do sono relatados durante a menopausa (Freedman, 2014).

Os sintomas vasomotores são o principal motivo da procura de tratamento durante a transição menopáusica. Embora a terapia hormonal da menopausa seja eficaz para o controle dos sintomas, a maioria das mulheres sintomáticas não toma a terapia hormonal (McCormick et al, 2020). A pré e pós-menopausa em si não estão correlacionada com transtornos psiquiátricos específicos, mas os dados sugerem que mulheres na perimenopausa têm maior probabilidade de desenvolver transtornos depressivos, mesmo sem história prévia. Os sintomas vasomotores estão relacionados a distúrbios do humor e do sono, neuroticismo, ansiedade, diminuição da função cognitiva e estresse. Traços de personalidade, fatores sociais e outros fatores também são mediadores importantes dos sintomas vasomotores durante a fase de transição da menopausa. Os profissionais de saúde devem levar em consideração essas correlações ao planejar o tratamento dos sintomas vasomotores. Os sintomas vasomotores durante a menopausa estão associados a custos sociais significativos. Existem numerosas terapias hormonais tradicionais e terapias complementares e alternativas, incluindo tratamentos sem receita e suplementos dietéticos para controlar os sintomas vasomotores relacionados à menopausa (Augolea et al, 2019). *Trifolium pratense* L. é uma espécie pertencente à família Fabaceae, antes classificada com Leguminosae, frequente em regiões temperadas e úmidas e bastante empregada para alimentar o gado. É mais conhecida popularmente como trevo-vermelho e em inglês, com red-clover. O nome *Trifolium* deriva de duas palavras em latim: "Tri" e "Folium" que significam "três" e "folhas", respectivamente. Considerando sua composição química variada, trevo-vermelho é a segunda espécie forrageira, considerada a a dicotiledônea mais importante do mundo, ficando atrás apenas da alfafa (Sabudak, 2009; Vasiljevic et al,2011). Ela foi cultivada na Europa nos séculos III e IV e usada na cadeia alimentar familiar pelos alemães na Primeira Guerra Mundial (Bennetts, 1946). Existem cerca de 300 espécies de trevo no mundo, entre as quais 25 espécies têm importância agrícola. Cerca de 150-160 espécies são encontradas na Eurásia, 60-65 nos Estados Unidos e 25-30 na África (Ellisson et al, 2006). Na região sul do Brasil, três espécies se adaptaram bem ao clima, destacando *Trifolium pratense* L., onde é usada principalmente para alimentar o gado. Esta espécie é empregada como forrageira há centenas de anos, em várias regiões do mundo, mais também se destaca como fornecedora de néctar para as abelhas (Gupta et al, 2017)

Na Turquia, o trevo é usado como um anti-séptico, analgésico e sedativo (Sabudak et al, 2008) No Paquistão, *T. pratense* e *T. repens* são usados para tratar lesões orais e de garganta, febre e meningite (Khan e tal, 2008). Em partes da Europa, incluindo a Albânia, o trevo vermelho é usado para fazer bebidas para tratar distúrbios estomacais e diarreia, já os nativos americanos também usam o trevo-vermelho para tratar lesões de pele, bem como doenças pulmonares, neuropáticas e reprodutivas (Mustafa et al, 2012). Atualmente, o trevo-vermelho vem sendo bastante usado na suplementação hormonal nos períodos de pré e pós-menopausa em todo o mundo, no entanto, os primeiros estudos sobre os seus efeitos estrogênicos ocorreram na Austrália, em 1946, quando observaram que as ovelhas alimentadas com essa planta sofriam de abortos espontâneos, além de apresentarem dificuldades de reprodução (Bennetts et al, 1946),

Os estudos científicos realizados com flores de *Trifolium pratense* indicam a presença de isoflavonas como formononetina, biochanina A, daidzeína e genisteína como os principais responsáveis pela ação estrogênica e no alívio dos fogachos frequentes nesses períodos de pré e pós-menopausa (Ramos et al, 2012; Wang dong, 2021). Diversos estudos pré-clínicos demonstram a ação estrogênica das isoflavonas pela semelhança estrutural com o estrogênio. Essas isoflavonas tem preferência pelos receptores β -estrogênicos, atuando como agonistas moderados, mas em casos especiais podem atuar como antagonistas estrogênicos quando há uma alta concentração de estradiol (WHO, 2009). Assim, são considerados seletivos dos receptores de estrogênio (SERM), por agirem como agonistas ou antagonista, dependendo de funções fisiológicas (Liu et al, 2001).

Trifolium pratense L. é uma espécie medicinal recomendada pela OMS, tendo publicada sua monografia em 2009 (WHO, 2009). No Brasil, a ANVISA incluiu esta espécie no Memento Terapêutico (Brasil, 2016) e no Formulário de Fitoterápicos (Brasil, 2021), cuja inflorescência é indicada para tratamento de sintomas do climatério e para síndromes pré-menstruais. Atualmente, existem 4 fitoterápicos com registros válidos na ANVISA com *Trifolium pratense* (Climatrix, Menoralis, Minel e Promensil), classificados na classe terapêutica de coadjuvante no tratamento do climatério (ANVISA, 2022 consultar produtos).

Considerando a utilização dessa espécie por mulheres no climatério, na menopausa e pós-menopausa para aliviar as ondas de calor, este trabalho teve como objetivo avaliar os estudos clínicos randomizados com produtos a base de *Trifolium pratense* L. para determinar a eficácia dessa espécie na redução de episódios de fogachos.

2. Metodologia

Este artigo trata-se de uma revisão integrativa, narrativa e crítica, (Mendes et al., 2008; Crosseti, 2012), elaborada consultando as bases de dados Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL), Índice Cumulativo para Literatura de Enfermagem e Saúde Aliada (CINAHL; www.ebscohost.com/cinahl/), Embase, PubMed, Embase, LILACS, MEDLINE, PsycINFO e Web of Science. As palavras chaves utilizadas foram “*Trifolium pratense*”, “clinical trial” e “hot flashes”. Para complementar a revisão, foram pesquisados protocolos de estudo e ensaios em andamento nos seguintes registros: CriticalTrials.gov (www.clinicaltrials.gov), Current Controlled Trials (www.controlled-trials.com/isrct/) e Organization International Trials Registry, portal de pesquisa de plataforma (www.who.int/trialsearch/Default.aspx).

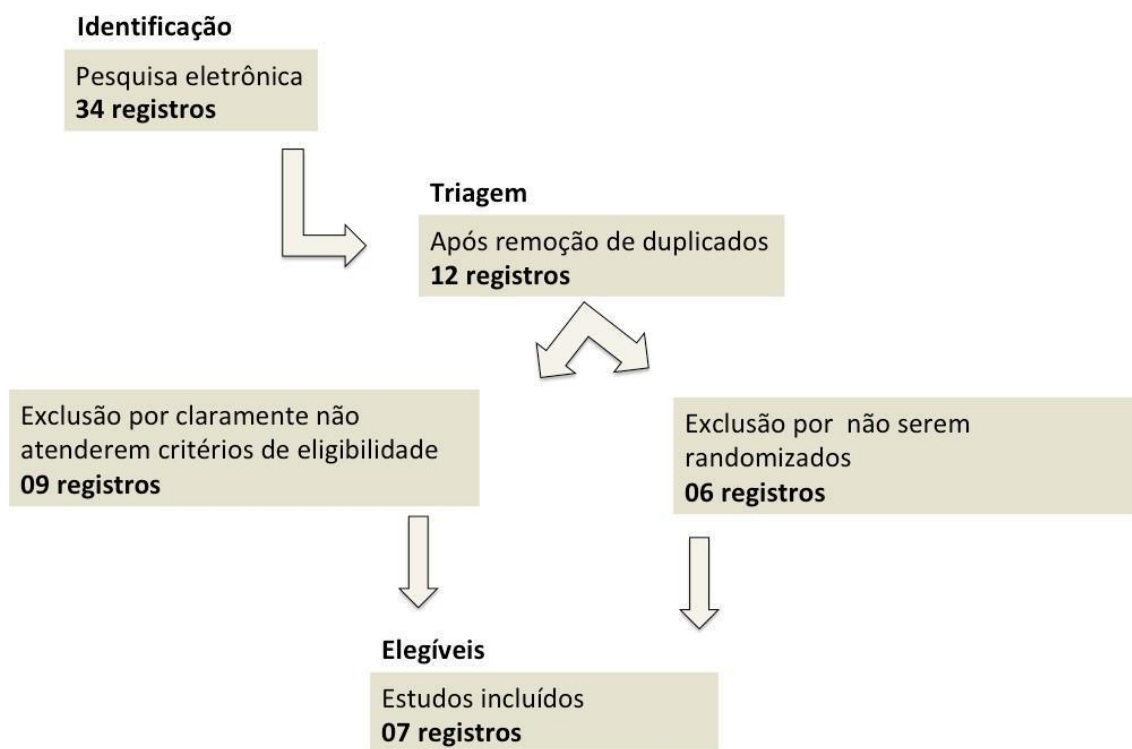
Os artigos que tratavam de ensaios clínicos randomizados (RCTs) para avaliar alívio de fogachos em mulheres na pré e pós-menopausa foram considerados elegíveis. Utilizou-se como critério de exclusão, artigos fora dos tópicos da revisão e estudos com ensaios pré-clínicos. As pesquisas não foram limitadas por idioma, data de publicação ou status de publicação.

3. Resultados

Um total de 34 registros foram recuperados nesta revisão nas bases pesquisadas: Pubmed (8); CENTRAL (4); CINAHL (0); LILACS (2); Conchrane (4); Medline (0); current Controlled Trials (0); www.clinicaltrials.gov (4); World Health Organization International Trials Registry (2); Embase (14). Excluiu-se 27 registros após leitura dos resumos; 12 foram duplicatas e 09 registros não atenderam aos critérios de elegibilidade. Seis estudos foram excluídos por não serem randomizados. Assim, foram selecionados 07 artigos, descrevendo ensaios clínicos randomizados onde utilizaram produtos de *Trifolium pratense* para controlar ondas de calor nos períodos de pré-menopausa e/ou pós-menopausa. A Figura 1 traz o fluxograma do nosso artigo, descrevendo a seleção e inclusão dos estudos.

No quadro 1, estão os dados dos estudos clínicos randomizados selecionados, incluindo os critérios de inclusão das mulheres, o desenho, a intervenção e amostras e as conclusões. Inclui ainda as referências dos estudos e o país e ano da realização.

Figura 1: Fluxograma da revisão de ensaios clínicos randomizados com *Trifolium pratense* L.



Fonte: Autores.

Quadro 1: Estudos clínicos randomizados realizados com produtos de *Trifolium pratense* L., para aliviar episódios de fogachos nos períodos de climatérios, menopausa e/ou pós-menopausa.

Referências/País do Estudo	Critério de Inclusão	Desenho	Intervenção/Amostra	Desfecho
Glorno et al (2010) Brasil (14)	46 a 65 anos + sintomas do climatério+ amenorreia de mais de um ano; sintomas climatéricos; FSH >30 mUI/ml e estradiol <30pg/ml	Estudo randomizado, duplo-cego e controlado com placebo 2 grupos	40 mg/dia <i>Trifolium pratense</i> por 12 meses Amostra inicial: 120 Perdas: 20 Grupo Intervenção: 50 Grupo placebo: 50	Índice Menopausal de Kupperman Sem diferença estatística
Geller, et al (2009) USA (15)	Idade média das participantes era de 53 anos, com a última menstruação em média 4,3 anos antes do estudo	Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo 4 grupos	-0,625 mg EEC + 2,5 mg AMP ¹ -Cohosh preto (<i>Cimicifuga racemosa</i>) ² - Trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>) ³ ; - Placebo Amostra inicial: 89 Perdas: 01	60% redução das ondas de calor (quantitativo e intensidade) Diferença estatística significativa apenas para EEC+AMP
Tice et al (2003) USA (16)	Mulheres entre 45 e 60 anos, que estavam tendo pelo menos 35 ondas de calor por semana. As mulheres elegíveis tiveram ooforectomia bilateral documentada ou pelo menos 2 meses consecutivos de amenorreia antes da inscrição com pelo menos 6 meses de amenorreia no ano anterior à entrada	Ensaio randomizado, duplo-cego, controlado por placebo 3 grupos	- Promensil (82 mg isoflavonas/dia) ⁴ - Rimostil (57 mg de isoflavonas/dia) ⁵ - Placebo Amostra inicial: 252 Perdas: 06 Grupo Promensil: 84 Grupo Rimostil: 83 Grupo placebo: 85 246 completaram o protocolo de 12 semanas.	Mudança na frequência das ondas de calor medida pelos diários dos participantes Sem diferença estatística

Maki et al. (2009) USA (17)	1) último período menstrual de 6 meses a 10 anos antes do recrutamento; 2) relatórios de um mínimo de 35 ondas de calor por semana, conforme indicado por diários (ou seja, mínimo de 2 semanas, a maioria de 1 mês ou mais); e 3) útero e ovários intactos.	Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo 4 grupos	- 0,625 mg EEC + 2,5 mg AMP ¹ - Cohosh preto (<i>Cimicifuga racemosa</i>) ² - Trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>) ³ - Placebo Amostra inicial: 89 Perdas: 23 Grupo EEC + AMP: 17 Grupo Cohosh preto: 18 Grupo Trevo vermelho: 14 Grupo placebo: 17	Registro de data e hora, gravidade, incômodo e atividade no momento da sensação de calor por meio monitor ambulatorial de condutância Diferença estatística significativa apenas para EEC+AMP
Rotem e Kaplan, (2007) Israel (18)	Mulheres saudáveis na pré e pós-menopausa com idades entre 45-65 anos. Amenorréia por pelo menos 6 meses, nível elevado de hormônio folículo-estimulante (FSH) (430 mg/ml) e acometimentos e / ou suores noturnos pelo menos três vezes ao dia	Ensaio clínico randomizado, controlado por placebo 2 grupos	Complexo Fito-Feminino ⁶ Placebo Amostra inicial: 50 Perdas: 15 Grupo Intervenção: 19 Grupo placebo: 16	Número de acometimentos de sudorese noturna e número de despertares noturnos por sintomas vasomotores. A intensidade foi avaliada subjetivamente em uma escala de 1 a 5. Diferença estatística significativa
Lipovac et al. (2004) Áustria (19)	Estado pós-menopausa (amenorreia > 12 meses), 40 anos ou mais, sintomas de menopausa moderados a graves (índice de Kupperman ≥15) com mais de 5 fogachos por dia, teste de gravidez negativo. Um FSH basal > 35 mIU / ml foi confirmatório do estado de pós-menopausa	Estudo prospectivo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo 2 grupos	- Isoflavonas de trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>) de 80 mg - Placebo Amostra inicial: 113 Perdas: 04 Grupo Intervenção: 50 Grupo placebo: 59	Índice de Kupperman avaliação da gravidade ocorridos nas últimas quatro semanas. Diferença estatística significativa
Lambert et al. (2017) Dinamarca (20)	Mulheres com autorrelato de sintomas de menopausa (> 5 fogachos por dia); 40–65 anos de idade; IMC 20–40 kg / m ² ; relatando uma duração de ciclo variável de > 7 dias diferente do normal e tendo um nível de FSH >35 IU / L	Estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo	- Isoflavonas e probióticos derivados de Red Clover (<i>Trifolium pratense</i>) biodisponíveis - Placebo Amostra inicial: 59 Perdas: 0 Grupo Intervenção: 30 Grupo placebo: 29	Avaliados usando MATLAB (Natick, MA, EUA). Um programa sob medida (menopauseGUI.) Foi planejado e desenvolvido por um aluno de doutorado Diferença estatística significativa

Legenda: ¹EEC esteroides equinos conjugados; AMP acetato de medroxiprogesterona; ²Cohosh preto: Extrato etanólico de colosh preto das partes subterrâneas (120 mg, extrato padronizado para 7,27 mg de estrogênio; ³Trevo vermelho (*Trifolium pratense*): Extrato etanólico das partes aéreas do trevo vermelho (398 mg de extrato padronizado para 120 mg de isoflavonas); ⁴Promensil (82 mg isoflavonas/dia) – medicamento obtido com Trevo vermelho (*T. pratense*); ⁵Rimostil (57 mg de isoflavonas/ dia) - medicamento obtido com Trevo vermelho (*T. pratense*); ⁶Complexo Fito-Feminino composto por: extrato de raiz de cohosh preto (*Cimicifuga racemosa*), 100 mg (2,5 mg glicosídeo triterpênico, 2,5%); extrato de raiz de dong quai (*Angelica sinensis*), 75 mg (7,5 mg de ligustilides 1%); extrato de erva de cardo mariano (*Silybium marianum*) 75 mg (60 mg de silimarina, 80%); extrato de flor de trevo vermelho (*Trifolium pratense*) 50 mg (4 mg de isoflavona, 8%); extrato de raiz de ginseng americano (*Panax quiquefoium*) 50 mg (12,5 mg ginsenosídeo, 25%) e extrato de fruta de baga da árvore casta (*Vitex agnus-castus*) 50 mg (2,5 mg de vitexina, 5%). Fonte: Autores.

4. Discussão

As mulheres maduras sofrem com os sintomas da menopausa estão cada vez mais propensas a usar suplementos alimentares de origem vegetal ou fitoterápicos, especialmente porque a Women's Health Initiative mostrou um risco aumentado de câncer de mama associado à terapia hormonal tradicional. Vários desses produtos podem ter efeitos preventivos adicionais do câncer de mama ligados a vias hormonais, químicas, inflamatórias e/ou epigenéticas. No entanto, embora os produtos de origem vegetal sejam percebidos como remédios naturais seguros, é importante ressaltar a necessidade de validação das espécies vegetais para garantir sua utilização segura e eficaz. Outro fator importante que tem que ser considerado, são os fitoterápicos ou suplementos alimentares de fontes vegetais que apresentam efeitos adversos, contraindicações e interações assim como qualquer outro medicamento ou suplemento alimentar (Dietz et al, 2016).

Os estudos clínicos randomizados são importantes no processo de garantir a eficácia e verificar a segurança na

utilização de qualquer medicamento ou suplemento alimentar. Para os medicamentos fitoterápicos, no Brasil, a indústria farmacêutica precisa na solicitação de registro junto a ANVISA, apresentar, dentre outras informações, os estudos clínicos que comprovem a eficácia e segurança, de acordo com a RDC 26/2014 (BRASIL, 2014).

Para avaliar a eficácia da espécie *Trifolium pratense* L., analisamos alguns estudos clínicos randomizados realizados com mulheres em fase pré e pós-menopausa, para verificar a ação desse vegetal na diminuição dos fogachos comuns nessa época da vida das mulheres. Estes estudos demonstram resultados controversos conforme descrito no Quadro 1.

É importante ressaltar que em muitos desses ensaios clínicos, foi empregado o Índice de Blatt-Kupperman que foram incluídos nesta revisão na avaliação dos desfechos, conforme Quadro 1. Comumente conhecido como Índice de Kupperman ou KI é um questionário de sintomas da menopausa de 11 itens que tem sido usado em centenas de estudos clínicos para determinar a prevalência dos sintomas da menopausa e para avaliar a eficácia de uma série de terapias destinadas a aliviar os sintomas da menopausa. Também tem sido usado como base para validação de outros questionários (Davis, 2019).

O KI foi alvo de algumas críticas, pois o índice foi uma combinação de autorrelato e avaliações médicas; omitiu medidas de secreção vaginal e perda de libido; não foram fornecidos dados demográficos da amostra; a ponderação foi usada sem justificativa estatística; os termos estavam mal definidos; as categorias incluíam pontuações sobrepostas e, o mais importante, as pontuações foram somadas sem serem baseadas em fatores independentes. A psicometria moderna levou à publicação de escalas confiáveis e válidas. Eles devem ser usados na pesquisa do climatério ao invés do índice de Blatt- Kupperman (Alder,1998). No índice de Blatt-Kupperman, os diversos sintomas incluídos sob a denominação de síndrome climatérica (sintomas vasomotores, insônia, parestesia, nervosismo, melancolia, vertigem, fraqueza, artralgia/mialgia, cefaléia, palpitação e zumbido) recebem valores numéricos de acordo com a intensidade dos mesmos (leves, moderados e graves) (Sousa et al,2000).

Apesar da utilização do índice Kupperman, observou-se algumas diferenças nos ensaios analisados. No estudo de Giorno et al. (2010), descrito na tabela 1, os autores apresentaram uma tabela uniestratificada para avaliação dos sintomas vasomotores e tiveram como resultado que não houve diferenças estatísticas entre o grupo que recebeu o produto de Trevo vermelho e o grupo placebo. Já no estudo 2 Geller et al. (2009), a intensidade dos fogachos foi pontuada com o número 1, indicando “leve” (ligeiros episódios de calor), 2 indicando “moderada” (alguns episódios de calor com sudorese discreta) e 3 indicando “grave” (episódios mais repentinos de calor acompanhados de suor, distúrbios de sono e/ou sentimentos de irritação ou ansiedade). Qualquer suor noturno que interrompeu o sono recebeu uma pontuação de intensidade 3. O número de ondas de calor usado para calcular a redução dos sintomas vasomotores incluiu todas as ondas de calor, independentemente da intensidade.

Ainda referente ao estudo de Geller et al., (2009), vale destacar a composição da formulação utilizada, apresentando cohosh e o trevo vermelho. Red clover ou trevo vermelho são nomes populares da espécie *Trifolium pratense* L., cujo extrato é empregado nesse trabalho. Os constituintes principais de *T. pratense* (trevo vermelho) são as isoflavonas que são moduladores seletivos de receptores de estrogênio. Isto significa que as isoflavonas podem agir como agonistas ou antagonistas dos receptores estrogênicos (Chen et al, 2021). Os autores empregaram, ainda neste estudo, o produto com black cohosh que se trata da espécie *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., pertencente à família Ranunculaceae, nativa da metade oriental dos Estados Unidos e Canadá. As preparações de Cohosh preto são feitas a partir de raízes e rizomas. Esta espécie consta no Memento Terapêutico com sua sinonímia *Acthaea racemosa* L. e sua indicação terapêutica é similar ao do trevo vermelho, sendo utilizada para avaliar os sintomas do climatério, como fogachos, no entanto seus princípios ativos são diferentes compreendendo glicosídeos triterpênicos (Brasil, 2016).

No estudo de Geller et al (2009), não houve diferença significativa na redução de calor entre os grupos que utilizavam os produtos das plantas e o grupo placebo. No entanto, no grupo que recebeu os produtos de referência EEC (esteróides

equinos conjugados) e AMP (acetato de medroxiprogesterona), houve redução significativa em relação ao placebo. Os resultados também permitiram observar que o tratamento com o trevo vermelho diminuiu as crises de ansiedade e demonstrou diferença significativa comparando com o grupo placebo. Este efeito foi compatível com atividade agonista de receptores β -estrogênicos. Os autores também concluíram que as espécies vegetais estudadas são seguras em tratamento por 12 meses.

O estudo de Tice et al. (2003) empregou uma amostra muito representativa, porém cabe ressaltar que a inclusão de mulheres ooferectomizadas deveriam ser equilibrados entre os grupos, uma vez que ainda em menopausa, os ovários possuem alguma atividade residual, podendo representar um viés. Neste estudo, após 2 semanas de placebo, 252 participantes foram aleatoriamente designados para os medicamentos Promensilil® (82mg de isoflavonas totais por dia), Rimostil® (57 mg de isoflavonas totais por dia) ou um placebo idêntico e foram acompanhados por 12 semanas. Promensilil® é um medicamento fitoterápico, obtido da espécie *Trifolium pratense* L., conhecido popularmente por trevo vermelho ou Red clover, com registro válido na ANVISA. Rimostil é um suplemento alimentar, com registro nos EUA, que consiste em uma preparação de isoflavonas do trevo vermelho, contendo genisteína, daidzeína e formonnetina, utilizado para prevenir diversos sintomas pós-menopausa como osteoporose, doenças cardiovasculares e usado no tratamento outros sintomas como hiperlipidemia. Embora seja usado como suplemento alimentar nesse país, nunca obteve aprovação para uso médico. Schmidt et al (2021) desenvolveram um estudo clínico randomizado para avaliar o efeito sobre a depressão de mulheres no período da menopausa, onde utilizaram 4 grupos: placebo; estradiol; raloxifene (fitohormônio da classe das benzofenonas) e o suplemento rimostil (isoflavonas isoladas de Trevo vermelho). Neste estudo para avaliar a ação desses produtos na redução da depressão, os autores concluíram que nenhum dos produtos testados demonstraram efeito redutor da depressão peri-menopausa.

Tice et al. (2003) observaram reduções semelhantes nas contagens diárias de ondas de calor em 12 semanas nos grupos testados: promensil, rimostil e placebo. Em comparação com o grupo placebo, os participantes do grupo promensil reduziu as ondas de calor mais rapidamente (41%), o que não foi observado no grupo rimostil (34%).

O Estudo de Maki et al. (2009) foi semelhante ao estudo de Geller et al. (2009) e demonstraram efeito sobre os fogachos apenas do grupo que recebeu hormônios estrogênicos: EEC (esteroides equinos conjugados) e AMP (acetato de medroxiprogesterona). Os produtos com *Trifolium pratense* e *Cimicifuga racemosa* não demonstraram eficácia. É importante ressaltar que esse estudo apresenta limitações como o tamanho amostral pequeno (n=66), devido às perdas que comprometem a qualidade do estudo. Considerando o grupo que recebeu o produto de trevo vermelho, o tamanho amostral foi de apenas 14 pacientes, número bastante reduzido para medidas objetivas da redução de ondas de calor. As variáveis de desfecho de calor foram o número total de ondas de calor objetivas e subjetivas, medidas no período de 24 horas. Outra limitação do estudo é a avaliação dos eventos por meio de monitor de condutância, pois impossibilita a detecção dos eventos de calor nos outros dias que as participantes não estavam monitoradas.

No estudo clínico de Rotem e Kaplan (2007), foi utilizado um complexo fitofeminino, apresentando diversas espécies vegetais em sua composição que apresentam fitohormônios mas que dificulta a avaliação isolada da eficácia de *Trifolium pratense* (trevo vermelho). Os resultados mostram diferença significativa do grupo que recebeu o complexo e o grupo placebo, embora tenham tido um viés que foram as perdas na amostra.

Já no estudo de Lipovac et al. (2012), o objetivo era avaliar o efeito vasomotor e sobre outros sintomas da menopausa com tratamento com um suplemento de isoflavonas (80 mg) de trevo vermelho (*Trifolium pratense*). Os resultados mostraram que os sintomas vasomotores e de ondas de calor diminuíram consideravelmente comparadas entre grupo que recebeu isoflavonas e o placebo.

Os resultados obtidos no estudo clínico conduzido por Lambert et al. (2017) demonstraram que a administração de uma formulação com dose moderada de isoflavonas (34mg/dia) de *Trifolium pratense* e mais probióticos (bactérias ácido láctico produtoras) diminuiu consideravelmente os sintomas vasomotores de pacientes no período da menopausa, incluindo ondas de

calor. A presença das bactérias na formulação permitiu a fermentação das isoflavonas do trevo vermelho que foram caracterizadas por CL-EM, verificando que mais de 90% das isoflavonas foram hidrolisadas, liberando a parte açucarada, convertendo-se nas suas agliconas (isoflavonas sem açúcar). As ondas de calor foram detectadas a partir de um programa desenvolvido e os paciente utilizaram um dispositivo para sua detecção e também por auto-avaliação. Os autores destacam a importância da qualidade dos produtos de isoflavonas em reportar a quantidade exata desses componentes e das bactérias para permitir a forma ideal para a biodisponibilidade das isoflavonas.

Dessa forma, a partir dos 07 (sete) estudos clínicos randomizados selecionados neste artigo de revisão integrativa (Tabela 1) pode-se concluir que apenas em 3 (três) estudos, houve diferença significativa na redução dos episódios de fogachos quando comparados com o grupo placebo. No entanto, é interessante observar que em vários ensaios clínicos, há viés de erro como tamanho amostral pequeno e ainda, produtos obtidos de *Trifolium pratense* com conteúdo diferente de isoflavonas.

Outro fato que o que nos mostra a necessidade de um desenho mais completo dos ensaios clínicos realizados com formulações obtidas com *Trifolium pratense* é em relação a padronização dos produtos obtidos a partir dessa espécie. Piersen et al (2003) confirmaram que extrato de *Trifolium pratense*, obtidos por diferentes métodos de extração, demonstram diferentes atividades estrogênicas, o que pode explicar os resultados diferentes nos vários ensaios clínicos utilizando diferentes produtos de *Trifolium pratense*.

Outro questionamento importante desses resultados controversos dos ensaios clínicos é em relação à prevalência dos fogachos nas mulheres na menopausa nos Estados Unidos ser de 70 a 80%, enquanto nos países orientais, como Japão, ser de apenas 10 a 14%. Isso pode ser explicado por questões raciais, mas a hipótese mais aceita é que a dieta rica em vegetais contendo fitoestrógenios, principalmente soja, sejam os responsáveis pela diminuição de ondas de calor no período da menopausa (Reed et al., 2013; Cota et al., 2014).

Vários estudos de revisão sistemática vêm demonstram a eficácia de produtos de *Trifolium pratense* em diminuir ondas de calor em pacientes na pré e pós-menopausa. Na revisão sistemática realizada por Coon e Ernst (2007), foram selecionados 17 ensaios clínicos avaliando a ação de isoflavonas de *Trifolium pratense* (trevo vermelho) sobre a frequência das ondas de calor em mulheres na menopausa, sendo que 5 (cinco) foram incluídos na meta-análise que indicou redução na frequência de ondas de calor nos grupos tratados (40-82 mg de isoflavonas/ dia) comparados com os grupos placebos e que não houve efeitos adversos em tratamentos curtos. Os resultados mostram, entretanto, necessidade de melhoria no tamanho dos efeitos, o que demonstra um melhor desenho nos ensaios clínicos.

Ghazanfarpour et al (2015) realizaram um estudo de revisão sistemática com metanálises e para a avaliação da eficácia de produtos de trevo vermelho. Analisaram 6 (seis) ensaios, realizados de 1999 a 2011 e a metanálise revelou que doses de 40 a 80 mg de trevo vermelho por 4 a 12 semanas diminuiu a frequência das ondas de calor comparado com os grupos controle, chegando perto de uma diferença estatística. Embora tenham chegado a essa conclusão, ressaltaram que havia uma heterogeneidade alta entre os estudos clínicos e fizeram uma análise de sub-grupos, verificando que havia diferenças de médias maiores no ensaios com doses maiores que 40 mg/dia e em grupos de pacientes com ondas de calor igual ou superior a 5 (cinco). Na análise dos subgrupos, concluíram que a diminuição nos episódios de calor ocorre mais proeminente nas pacientes no período pós-menopausa e com severos episódios de fogachos que receberam o produto de trevo vermelho, por apresentarem concentrações mais baixas de estrogênio no sangue. Esclarecem, ainda, que em pacientes com 03 (três) ou menos episódios de calor, pode haver aumento dos episódios. Os autores também concluíram que é necessário estudos com menor heterogeneidade para a avaliação desses produtos.

Chen, Ko e Chen (2019) realizaram uma revisão sistemática de produtos de isoflavonas, justificando que os ensaios clínicos nas últimas duas décadas têm resultados bastante controversos e não havendo um consenso na utilização desses produtos na reposição hormonal. Como critério de inclusão nesta revisão sistemática, os autores incluíram a presença das

isoflavonas daidzeína, genisteína e S-equol como componentes ativos dos produtos testados. Os autores incluíram ensaios clínicos que avaliaram os produtos de trevo vermelho em vários sintomas da menopausa, mas evidenciaremos apenas os resultados frente aos efeitos vasomotores, mais precisamente das ondas de calor e sudorese. Estes autores fizeram uma revisão sistemática sem meta-análise e concluíram que em relação às ondas de calor, a literatura pesquisa mostra que as isoflavonas reduzem as ondas de calor, mas ressaltam a grande heterogeneidade dos trabalhos que dificultam a análise dos resultados. Sugerem para diminuir vieses nos estudos, uma urgente padronização dos conteúdos de agliconas isoflavônicas nos produtos testados; uniformizar a duração do estudo e a idade das pacientes, definindo estarem na pré ou pós-menopausa e trabalharem com amostras maiores do que as que normalmente estão sendo empregadas.

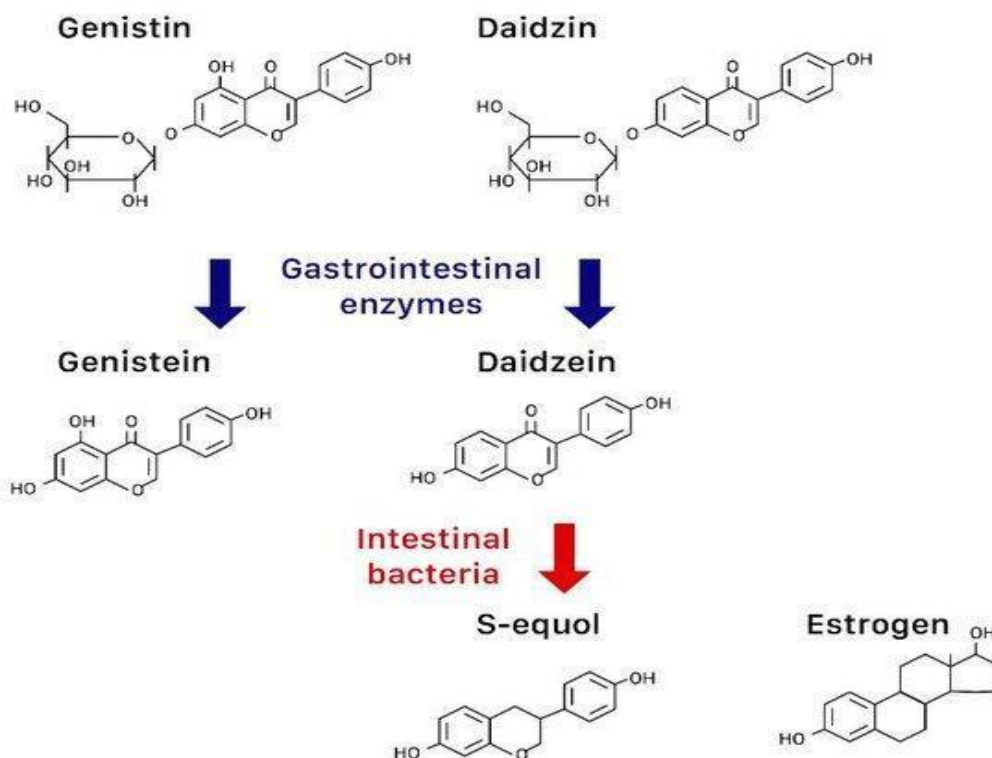
A padronização do conteúdo de isoflavonas, seja de produtos de trevo vermelho (*Trifolium pratense*) ou de soja (*Glycine max*) é uma necessidade pois, nos últimos anos, tem-se observado que dependendo do tipo de estrutura das moléculas de isoflavonas, tem-se a possibilidade de se aumentar a ação estrogênica. Antes de discutirmos esse ponto de estrutura, é importante lembrar que as isoflavonas apresentam semelhança estrutural com o estradiol, o que justifica a ação sobre os receptores estrogênicos (Saad et al., 2018). Apesar dessa semelhança, as isoflavonas podem apresentar efeito anti-estrogênico (antagonista) em mulheres que apresentarem altas concentração desse hormônio. O efeito estrogênico (agonista) ocorre basicamente quando há níveis baixos no corpo da mulher de estrogênio (WHO, 2009).

Outro fato importante é que hoje são conhecidos dois tipos de receptores estrogênicos: α (alfa) e β (beta). As isoflavonas são consideradas agonistas fracos desses receptores e apresentar maior afinidade pelos receptores β -estrogênicos que estão presente nos tecidos do SNC, ossos, paredes vasculares e trato genito-urinário. Os α -receptores estão no SNC, mama, endométrio e fígado, sendo que as isoflavonas apresentam pouquíssima afinidade por estes. Estima-se que a ação sobre esses receptores tipo β seja 06 (seis) vezes maior do que nos do tipo α e ainda 03 (três) vezes menor comparado com o estradiol (Nachtigal, 2001; Barnes et al., 2000; Russel et al., 2002; Liu et al., 2001).

Existem outras ações relatadas para o trevo vermelho que podem favorecer sua utilização nos períodos de pré e pós-menopausa, como atividade sobre receptores androgênicos, diminuindo a produção de di-hidrotestosterona e ação sobre receptores de progesterona. Estas ações ainda não estão bem esclarecidas e podem não serem responsabilidade das isoflavonas e sim de outros flavonoides presentes nas partes aéreas de *Trifolium pratense* (Nestel et al., 1999). As isoflavonas já demonstraram ação antioxidante, com diminuição da produção de radicais livres e gerando efeito cardioprotetor por diminuir a oxidação do LDL-colesterol. Estas substâncias podem, ainda, agir na inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese de estrógeno, ocasionando menor quantidade de 17β -estradiol, o que pode ser benéfico para os casos de cânceres hormônio dependentes como de mama e endométrio (Naftolin et al., 2002).

É de extrema importância que os estudos clínicos com produtos de *Trifolium pratense*, estabeleçam com mais precisão as formas das isoflavonas presentes. Estudos já demonstram que o S-equol, um produto de isoflavonas do trevo vermelho e também da soja, apresenta uma semelhança estrutural maior com o estrogênio, além de ter maior afinidade pelos seus receptores estrogênicos. O S-equol é produzido pela ação do microbioma intestinal das mulheres e estudos demonstram que 50% das asiáticas e somente 20% das mulheres ocidentais caucasianas apresentam na flora do intestino, bactérias que transformam a daidzeína em S-equol. Essa transformação encontra-se demonstrada na Figura 2 (Chen; Ko; Chen, 2019).

Figura 2: Composição de isoflavonas na forma glicosilada e livre e o S-equol produzido por bactérias intestinais e semelhança com o estrogênio.



Fonte: Chen et al. (2019).

Utain e col (2015) realizaram um estudo de revisão sobre o potencial do S-equol para o alívio de sintomas no período menopausa. Em relação ao poder dessa substância no controle de fogachos, os estudos clínicos com produtos de S-equol mostram que há evidências, embora com limitações, de esse composto leve a alívios de sintomas vasomotores. Estudos futuros randomizados precisam ser realizados principalmente com mulheres não ocidentais. No entanto há já um estudo clínico que mostra que em mulheres norte americana no período da menopausa, os produtos com mais de 20 mg de S-equol foram mais eficientes no controle de fogachos do que produtos com isoflavonas de soja, apesar de não terem usado placebo (Jenks et al., 2012).

A importância do S-equol é ainda confirmada em estudos, empregando produtos de isoflavonas, que mostram que a redução das ondas de calor é mais expressiva em mulheres produtoras de S-equol ((Jou et al, 2008; Crawford et al, 2013). Dessa forma, os autores sugerem que frente a esses resultados, que mostram que para algumas mulheres pode ser benéfico considerar o uso de produtos de S-equol na menopausa para aliviar ondas de calor, os médicos devem considerar utilizar essa terapia, principalmente quando a paciente não deseja fazer reposição de estrogênio convencional. E para as mulheres que apresentem as bactérias produtoras de S-equol, pode ser benéfico ainda o consumo de produtos com isoflavonas para o controle desses sintomas vasomotores como foi demonstrado em vários estudos clínicos (Jou et al, 2008; Crawford et al, 2013).

5. Conclusão

As terapias não hormonais com *Trifolium pratense* L., espécie rica em isoflavonas, podem ser uma alternativa para mulheres na menopausa com episódios intensos de fogachos, que não podem tomar estrogênio. O médico deverá avaliar a possibilidade de utilização de produtos com S-equol (20 a 40 mg) ou com isoflavononas, desde que as pacientes apresentem bactérias produtoras de S-equol na sua microbiota intestinal. A compreensão do mecanismo de ação desses suplementos usados

para a saúde da mulher levará, em última análise, a produtos botânicos padronizados com maior eficácia, segurança e propriedades quimiopreventivas. Dessa forma, mesmo com os resultados de eficácia no alívio dos fogachos, ensaios, mais bem desenhados, seriam necessários estudos futuros para embasar com maior precisão essa prática clínica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e a Universidade Federal do Maranhão pelo suporte financeiro e ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2021). Formulário de Fitoterápicos. (2ª ed.). Farmacopeia Brasileira.
- Alder, E. (1998). The Blatt-Kupperman menopausal index: A critique. *Maturitas*.
- Augoulea A, Moros M, Lykeridou A, Kaparos G, Lyberi R, & Panoulis K. (2019). Psychosomatic and vasomotor symptom changes during transition to menopause. *Przegląd Menopauzalny*.
- Barnes et al. (2000). Estrogen Receptor Binding Is Only Part of the Isoflavone Story, *The Journal of Nutrition*, 130(3),656S–657S, <https://doi.org/10.1093/jn/130.3.656S>.
- Bennetts, H. W. et al (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia. *Aust Vet J*.
- Brasil. Protocolos da atenção básica, (2016). Ministério da Saúde. Saúde das mulheres Instituto Sírio Libanês de ensino e pesquisa. Brasília, DF.
- Brasil. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. (2014). Dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Chen, L-R, Ko, N-Y, & Chen, K-H (2019). Suplementos de Isoflavona para Mulheres na Menopausa: Uma Revisão Sistemática. *Nutrientes*, 11(11):2649. <https://doi.org/10.3390/nu11112649>.
- Chen, Y. M. (2021). Red Clover Isoflavones Influence Estradiol Concentration, Exercise Performance, and Gut Microbiota in Female Mice. *Front Nutr*.
- Coon, J. T. & Ernst, E. (2007). Trifolium pratense isoflavones in the treatment of menopausal hot flushes: a systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*, 14(2-3):153-9.
- Cota, A. M. M. et al (2004). Fitoestrogênios: Valor terapêutico no climatério Phytoestrogens: Therapeutic Value In Climacteric. *Rev Med Minas Gerais* 14(4):262-6.
- Crawford, S. L. et al (2013). Impact of dose, frequency of administration, and equol production on efficacy of isoflavones for menopausal hot flashes: A pilot randomized trial. *Menopause*, 20:936-945.
- Crossetti, M. G .O., (2012). Revisão integrativa de pesquisa na enfermagem o rigor científico que lhe é exigido [editorial]. *Rev Gaúcha Enferm*. 33(2):8-9.
- Davis, S. R. (2019). The Kupperman Index undressed. *Maturitas*.
- Dietz, B. M. et al. (2016). Botanicals and their bioactive phytochemicals for women's health. *Pharmacological Reviews*.
- Ellison N. W., Liston A, Steiner J J, Williams W. M., & Taylor N. L.(2006). Molecular phylogenetics of the clover genus (Trifolium-Leguminosae). *Mol Phylogenet Evol*.
- Freedman, R. R. (2014). Postmenopausal Physiological Changes. *Curr Top Behav Neurosci*.
- Geller, S.E. et al. (2009). Safety and efficacy of black cohosh and red clover for the management of vasomotor symptoms: A randomized controlled trial. *Menopause*.
- Ghazanfarpour, M. et al (2016). Trevo vermelho para tratamento de ondas de calor e sintomas da menopausa: Revisão sistemática e meta-análise, *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 36:3, 301-311, Doi: 10.3109/01443615.2015.1049249.
- Giorno, C. Del. et al. (2010). Efeitos do Trifolium pratense nos sintomas climatéricos e sexuais na pós-menopausa. *Rev Assoc Med Bras*.
- Gupta M, Sharma V, Singh S K, Chahota R K, & Sharma T R (2017). Analysis of genetic diversity and structure in a genebank collection of red clover (Trifolium pratense L.) using SSR markers. *Plant Genet Resour Characterisation Util*.
- Jenks, B.H. et al (2012). A pilot study on the effects of S-equol compared to soy isoflavones on menopausal hot flash frequency. *J Womens Health (Larchmt)*, Jun,21(6):674-82. 10.1089/jwh.2011.3153.
- Jou, H. J. et al (2008). Effect of intestinal production of equol on menopausal symptoms in women treated with soy isoflavones. *Int J Gynaecol Obstet*, 102:44-49.

- Kanady, W. et al. (2020). Efeitos do trevo vermelho (*Trifolium pratense*) isoflavonas no perfil lipídico das mulheres perimenopausal e pós-menopausa - Uma revisão sistemática e meta-análise. *Maturitas*, 132, 7-16.
- Khan, S.W., & Khatoon, S. (2008). Ethnobotanical studies on some useful herbs of Haramosh and Bugrote Valleys in Gilgit, Northern Areas of Pakistan. *Pakistan J Bot.*
- Lambert, M. N. T. et al. (2017). Combined Red Clover isoflavones and probiotics potentially reduce menopausal vasomotor symptoms. *PLoS One*.
- Lipovac, M. et al (2012). The effect of red clover isoflavone supplementation over vasomotor and menopausal symptoms in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*.
- Liu, J. et al (2001). Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem*. May, 49(5):2472-9. doi: 10.1021/jf0014157. PMID: 11368622.
- Maki, P.M. et al. (2009). Effects of botanicals and combined hormone therapy on cognition in postmenopausal women. *Menopause*.
- Manica, et al. (2019). Efeitos das terapias na menopausa: uma revisão narrativa da literatura. *J. Health Biol Sci.*, 7(1):82-88 doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i1.2064.p82-88.2019.
- McCormick, C. A., Brennan, A., & Hickey, M. (2020). Managing vasomotor symptoms effectively without hormones. *Climacteric*.
- Mendes, K. D. S., Silveira, R.C.C.P., & Galvão, C.M. (2008). Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. *Texto Contexto Enferm*. 17(4):758-64.
- Mustafa, et al (2021). Menopausa precoce no Brasil: uma revisão bibliográfica integrativa. *Research, Society and Development*, 10(14), e461101422323.
- Mustafa, B. et al. (2012) Medical ethnobotany of the Albanian Alps in Kosovo. *J Ethnobiol Ethnomed*.
- Nachtigall, L. E. (2001). Isoflavones in the management of menopause. *J British Menopause Society*, S1, 8-11.
- Naftolin, F., & Stanbury, M. G. (2002). Phytoestrogens: are they really estrogen mimics? *Fertility and Sterility*, 77, 15-7.
- Nestel, P. J. et al (1999). Isoflavones from red clover improves systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. *J. Clin Endocrinol metab*, 84: 895-898.
- Piersen, C. E. et al (2004). Chemical and biological characterization and clinical evaluation of botanical dietary supplement: a phase I red clover extract as a model. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1361-1374.
- Ramos, G. P. et al (2012). Genetic variability of isoflavones in the USDA red clover core collection. *Rev. Bras. Farmacogn*. 22, 1241-1252.
- Reed, S. D. et al (2013). Self-reported menopausal symptoms in a racially diverse population and soy food consumption. *Maturitas*, 75, 152-158.
- Rosário, C. S. D. (2021). Mulher no climatério: sintomatologia, estilo de vida, alimentos funcionais e libido.
- Rotem, C. (2007). Phito-Female Complex for the relief of hot flashes, night sweats and quality of sleep: Randomized, controlled, double-blind pilot study. *Gynecol Endocrinol*.
- Russell, L. et al (2002). Phytoestrogens: A viable option? *Am. J. Med. Sci*. 324, 185-188.
- Saad, G. A. et al. (2018) Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica. (2ª ed.). *Guanabara Koogan*.
- Sabudak, T. et al (2008). Antiinflammatory and antioxidant activities of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* extracts. *Asian J Chem*.
- Sabudak, T., & Guler, N. (2009). Review article *Trifolium L.* A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytotherapy Research*.
- Schmidt, P. J. et al. (2021). The short-term effects of estradiol, raloxifene, and a phytoestrogen in women with perimenopausal depression. *Menopause*. Jan 15, 28(4):369-383. doi: 10.1097/GME.0000000000001724. PMID: 33470755, PMCID: PMC9022873.
- Sousa, R.L. et al. (2000). Fidedignidade do Teste-reteste na Aplicação do Índice Menopausal de Blatt e Kupperman. *Rev Bras Ginecol e Obs*.
- Takahashi, T. A., & Johnson K. M. (2015). Menopause. *Medical Clinics of North America*.
- Tice, J.A. et al (2003). Phytoestrogen Supplements for the Treatment of Hot Flashes: The Isoflavone Clover Extract (ICE) Study: A Randomized Controlled Trial. *J Am Med Assoc*.
- Utain, W. H. et al. (2015). S-equol: a potential nonhormonal agent for menopause-related symptom relief. *J Womens Health (Larchmt)*, 24(3):200-8.
- Vasiljevic S, Cupina B, Krstic D, Pataki I, Katanski S, & Milosevic B. (2011) Seasonal changes of proteins, structural carbohydrates, fats and minerals in herbage dry matter of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Biotechnol Anim Husb.*,
- Wang, X., & Dong K. (2021). Effect of formononetin from *Trifolium pratense* L. on oxidative stress, energy metabolism and inflammatory response after cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Food Science and Technology*.
- World Health Organization. WHO (2009). monographs on selected medicinal plants. Geneva, Switzerland: *World Health Organization*, 4:335-352.