

Pilot study of unconventional food plant (UFP): adherence to nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) in the diet and monitoring of biometric and clinical indicators

*Estudo piloto de planta alimentícia não convencional (PANC): adesão da capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) na dieta e monitorização de indicadores biométricos e clínicos*

Sérgio Faloni de Andrade¹, Maria da Graça Lopes Serrador¹, Alda Pereira da Silva^{1,3,4}, Rejane Giacomelli Tavares^{1,2}, Luis Monteiro Rodrigues¹, Maria do Céu Costa^{1,5}

¹Universidade Lusófona - CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal; ²Universidade Federal de Pelotas- PPGNA- Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Rua Gomes Carneiro, 01, 96010-610, Pelotas, RS, Brazil; ³Institute for Preventive Medicine and Public Health, Lisbon School of Medicine, University of Lisbon, Portugal; ⁴Clinic of General and Family Medicine, Ecogenetics and Human Health Unity, Institute for Environmental Health, ISAMB, Portugal; ⁵NICiTeS, Polytechnic Institute of Lusophony, ERISA-Escola Superior de Saúde Ribeiro Sanches, Lisboa, Portugal

* corresponding author / autor para correspondência: sergio.andrade@ulusofona.pt

Abstract

The flowers of *Tropaeolum majus*, popularly known as "capuchinha," garden nasturtium, nasturtium, Indian cress, or monks cress, are currently used worldwide as a food supplement and in plant-based diets, being added to smoothies, soups, mayonnaise and salads by consumers in search of sources of substances considered beneficial to human health. Most studies have shown nutritional qualities and beneficial effects of the plant, especially its flowers and respective aqueous extracts in vitro and in animals. Thus, this pilot study was designed to evaluate the acceptance and possible benefits of daily consumption of 20 g *T. majus* flowers per day for 30 days in healthy participants. Before and after ingestion, body composition, heart rate, blood pressure, and hematological and biochemical parameters were analysed. Results have shown good acceptance and safe use of *T. majus* flowers in a balanced and varied diet. However, it is important to highlight that this is the first exploratory study regarding these issues in healthy humans, and therefore, despite the widespread consumption described, additional studies are needed to deepen the results in biometric and clinical indicators in a larger number of volunteers.

Keywords: *Tropaeolum majus*, unconventional food plant (UFP), nasturtium, edible flowers

Resumo

As flores de *Tropaeolum majus* conhecidas como capuchinha, capuchinha de jardim, agrião-da-índia ou agrião-monge são mundialmente utilizadas como suplemento alimentar em dietas à base de plantas, adicionadas a smoothies, sopas, maioneses e saladas por consumidores em busca de fontes de substâncias consideradas benéficas para a saúde humana. A maioria dos estudos mostra qualidades nutricionais e efeitos benéficos da planta, principalmente das flores, e seus extratos aquosos *in vitro* e em animais. Este estudo piloto foi desenhado para avaliar a aceitação da ingestão diária e possíveis benefícios resultantes da ingestão de flores de *T. majus*, em voluntários humanos saudáveis consumindo 20g de flores de *T. majus* por dia em 30 dias. Antes e após a ingestão, a composição corporal, frequência cardíaca, pressão arterial e parâmetros hematológicos e bioquímicos foram analisados. Os resultados mostram boa aceitação e uso seguro das flores de *T. majus* numa dieta equilibrada e variada. No entanto, é importante destacar que este é o primeiro estudo exploratório sobre a segurança do consumo de flores de *T. majus* em humanos saudáveis, e, portanto, apesar do consumo generalizado descrito, são necessários estudos adicionais para aprofundar os resultados em indicadores biométricos e clínicos em um número maior de voluntários.

Palavras-chave: *Tropaeolum majus*, plantas alimentícias não-convencionais (PANCs), capuchinha, flores comestíveis

Introduction

Tropaeolum majus L. (Figure 1) is popularly known as garden nasturtium, nasturtium, Indian cress, or monks cress and belongs to the Tropaeolaceae family. It is a native plant of the Andes, mainly from Bolivia and Colombia where it grows wild, however, it was brought to Europe from Peru in the 16th century and is successfully cultivated as an annual decorative plant (1,2). It is currently found in all of Europe, and in some regions of Africa, Asia and Oceania (3).

This species is used in folk medicine to treat several diseases. Its leaves are used to treat asthma, urinary tract infections, cardiovascular disorders, and constipation (4). Pre-clinical studies have shown antihypertensive and diuretic effects (5,6) and *in vitro* assays using culture cells revealed anti-adipogenic effects of *T. majus* extracts (7). In addition, several toxicologic studies (chronic and subchronic toxicity, reproductive toxicity, and genotoxicity) have been conducted and demonstrated that *T. majus* infusions and aqueous extracts are safe (8,9). However, the use of high doses of hydroethanolic extracts should not be recommended to men of reproductive age and to pregnant women because high doses of these extracts (> 300 mg/kg) have interfered with reproductive function and gestation of animals (4,8-10). Pre-treatment with *T. majus* methanolic alcohol extract provides protection against diethyl maleate-induced blood and liver toxicity in rats, with results confirmed by histological examinations (11). In recent years, *T. majus* flower has been widely used in culinary as unconventional food

Introdução

Tropaeolum majus L. (Figura 1) é popularmente conhecida como capuchinha de jardim, capuchinha, agrião-da-índia ou agrião-dos-monges. Pertence à família Tropaeolaceae e é uma planta nativa dos Andes, principalmente da Bolívia e Colômbia, onde cresce naturalmente, trazida para a Europa do Peru no século XVI e é cultivada com sucesso como planta anual e decorativa (1,2). Atualmente, encontra-se em toda a Europa, em algumas regiões da África, Ásia e Oceania (3).

Esta espécie é utilizada na medicina popular, para o tratamento de diversas doenças. Suas folhas são usadas para tratar distúrbios cardiovasculares, infecções do trato urinário, asma e obstipação (4). Estudos pré-clínicos mostraram efeitos anti-hipertensivos e diuréticos (5,6) e ensaios *in vitro* usando células de cultura revelaram efeitos anti-adipogênicos de extratos de *T. majus* (7). Além disso, vários estudos toxicológicos (toxicidade crônica e subcrônica, toxicidade reprodutiva e genotoxicidade) foram já realizados e mostraram que infusões de *T. majus* e extratos aquosos são seguros (8,9). No entanto, o uso de altas doses de extratos hidroetanólicos não deve ser recomendado para homens em idade reprodutiva e gestantes, pois altas doses desses extratos (> 300 mg.kg) têm interferido na função reprodutiva e gestação dos animais (4,8-10), embora o pré-tratamento com extrato de álcool metanólico de *T. majus* forneça proteção contra a toxicidade sanguínea e hepática induzida por maleato de dietilo em ratos, sendo esses resultados confirmados por exames histológicos (11). Nos últimos anos, a flor de *T. majus* tem sido amplamente utilizada na culinária como planta alimentícia não convencional (PANC) para decorar



Figure 1 - Vegetable soup containing 14 g of nasturtium flowers with their stems.

Figura 1 - Sopa de legumes contendo 14 g de flores de capuchinha com seus caules.

plant (UFP) to decorate plates, especially salads, and is characterized by a spicy flavour and as an important source of carotenoids (antheraxanthin, zeaxanthin, lutein, β -cryptoxanthin, zeinoxanthin, α -carotene, β -carotene, violaxanthin) and phenolic compounds (quercetin, myricetin, kaempferol, pelargonidin, delphinidin, cyanidin, derivatives of hydroxycinnamic acid) (12-16).

Terms such as "functional foods" or "nutraceuticals" are widely used in the marketplace. These foods are regulated by the Food and Drug Administration (FDA) under the authority of the Federal Food, Drug and Cosmetic Act, although they are not specifically defined by law. Thus, functional foods are not officially recognised as a regulatory category by the FDA in the United States and the same is true in Europe, where Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods applies. "General function" claims under Article 13.1 of the EC Nutrition and Health Claims Regulation refer to the role of a nutrient or substance in growth, development and bodily functions; psychological and behavioural functions; slimming and weight control, satiety or reduction of available energy from the diet. *T. majus* may be a candidate for a general function claim if a cause-effect relationship is demonstrated for a particular physiologic effect.

Considering its spontaneous worldwide use as an unconventional food plant based on a perceived presumption of safety by the consumer and supported by published information, an exploratory investigation was carried out to evaluate, for the first time, the acceptance of *T. majus* flowers in a diet by adding it in different plates, as well as their effects on corporal composition, biochemical and haematological parameters in healthy volunteers.

Materials and methods

Participants

The study was made with the voluntary participation of six healthy individuals, both sexes (one man and five women), ages between 21 and 71 years old (mean 52.50 ± 17.28 years old) recruited randomly from a convenience population asked to participate in sensorial tests by the researcher team. The acceptance prior to the study and adherence during the study of *T. majus* flowers in the diet were assessed through questionnaires

pratos, principalmente saladas, sendo caracterizada pelo sabor picante e como importante fonte de carotenoides (violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, zeinoxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno) e compostos fenólicos (quercetina, miricetina, kaempferol, pelargonidina, delphinidina, cianidina, derivados do ácido hidroxicinâmico) (12-16).

Termos como "alimentos funcionais" ou "nutracêuticos" são amplamente utilizados no mercado. Esses alimentos são regulamentados pela Food and Drug Administration (FDA) sob a autoridade da Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos, embora não sejam especificamente definidos por lei. Assim, os alimentos funcionais não são oficialmente reconhecidos como categoria regulatória pela FDA nos Estados Unidos e o mesmo acontece na Europa, onde se aplica o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Dezembro de 2006 sobre nutrição e as alegações de saúde feitas em alimentos. As alegações de "função geral" nos termos do Artigo 13.1 do Regulamento CE sobre alegações nutricionais e de saúde referem-se ao papel de um nutriente ou substância no crescimento, desenvolvimento e funções corporais; funções psicológicas e comportamentais; emagrecimento e controle de peso, saciedade ou redução da energia disponível da dieta. A planta *T. majus* pode ser candidata para uma alegação de função geral se for demonstrada uma relação causa-efeito para um determinado efeito fisiológico.

Neste contexto, e considerando o uso espontâneo mundial como planta alimentícia não convencional, e com base na presunção de segurança percebida pelo consumidor apoiada em informações publicadas, desenhou-se um estudo de investigação exploratória para avaliar pela primeira vez a aceitação das flores de *T. majus* na dieta adicionando-a em diferentes tipos de pratos, bem como os seus efeitos na composição corporal, parâmetros bioquímicos e hematológicos em voluntários saudáveis.

Materiais e métodos

Participantes

O estudo foi feito com a participação voluntária de seis indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (1 homem e 5 mulheres), com idades entre 21 e 71 anos (média $52,50 \pm 17,28$ anos) recrutados aleatoriamente de uma população de conveniência convidada a participar em testes sensoriais pela equipa de pesquisadores. A

in which the volunteers described their opinions on the visual and taste aspects of the prepared meals. The following recipes were included in the acceptance study before the test: soup, meat pie, roast, bread, cod, rice, juice, sweet pie, and gelatin. The parameters questioned were: i) Have you ever heard of unconventional food plants (UFPs)? ii) Do you usually consume (UFPs)? iii) Have you ever tasted this plant? After tasting, how do you describe it? iv) You can use the suggested terms to define the meals: *Appearance*: pleasant/unpleasant/other; *Color*; *Odor*: intense/mild/other; *Flavor*: bitter/sweet/spicy/other; *Texture*: velvety/grainy/liquid/pasty/other. All procedures observed the principles of good clinical practices from the Helsinki Declaration and respective amendments (17). The volunteers were included in the study after informed written consent. The inclusion criteria were the acceptance of nasturtium taste as pleasant and willingness to include it in their daily diet for one month. The following exclusion criteria were considered: (i) any possibility of pregnancy, (ii) men of reproductive age, (iii) any pre-existing disease. Additionally, the participants filled out an Informed Consent Form to indicate if they smoked and if they took any medications, and, if so, which ones.

Procedures

Firstly, the volunteers selected in accordance with the criteria described above were given detailed information about the objectives, methods, and their role in the project. After signing informed written consent, data were collected for all participants by applying a semiquantitative food frequency questionnaire (FFQ), already validated for a Portuguese population (18) defining a mean reference portion consumed over one year for all food groups. The questionnaire used was composed of a list of the nutrients belonging to the seven conventional food table/wheel groups (19) and one closed section with five categories of the frequencies of consumption of twelve high-rated items (dairy products, fatty-, lean- and cod- fish, white and red meat, olive oil, whole meal bread and cereals, eggs, sweets, vegetables and legumes, and fruits). Thereafter, the volunteers received the recipes for the preparation of the meals containing *T. majus* flowers. The ingestion was divided into three meals per day (breakfast, lunch and dinner) such that 20 g of flowers were ingested daily for 30 days. The portion of 20 g per day divided into

aceitação prévia ao estudo, e a adesão durante o estudo, das flores de *T. majus* na dieta, foram avaliadas por meio de questionários nos quais os voluntários descreviam suas opiniões sobre os aspectos visuais e gustativos das refeições preparadas. As seguintes receitas foram incluídas no estudo de aceitação antes do teste: sopa, torta de carne, assado, empanado, bacalhau, arroz, suco, torta doce e gelatina. Os parâmetros questionados foram: i) Já ouviu falar em plantas alimentícias não convencionais (PANCs)? ii) Costuma consumir PANCs? iii) Já provou esta planta? Após a degustação, como a descreve? iv) Pode utilizar os termos sugeridos para definir as refeições: *Aspetto*: agradável/desagradável/outro; *Cor*; *Odor*: intenso/leve/outro; *Sabor*: amargo/doce/picante/outro; *Textura*: aveludado/granulado/líquido/pastoso/outro. Todos os procedimentos observaram os princípios de boas práticas clínicas da Declaração de Helsínquia e respectivas alterações (17). Os voluntários foram incluídos no estudo após consentimento informado por escrito. Os critérios de inclusão foram: aceitar o gosto da capuchinha como agradável, estar disposto a incluí-la na dieta diária durante um mês. Foram considerados os seguintes critérios de exclusão: (i) qualquer possibilidade de gravidez, (ii) homens em idade reprodutiva, (iii) qualquer doença pré-existente. Além disso, os participantes preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual informavam se fumavam, e se tomavam medicamentos e quais.

Procedimentos

Primeiramente, os voluntários selecionados de acordo com os critérios descritos acima foram informados detalhadamente sobre os objetivos, métodos e seu papel no projeto. Após a assinatura do consentimento informado por escrito, foram recolhidos dados de todos os participantes através da aplicação de um questionário semiquantitativo de frequência alimentar (QFA), já validado para a população portuguesa (18), definindo uma porção média de referência consumida ao longo de um ano para todos os grupos da tabela alimentar. O questionário utilizado foi composto por uma lista dos nutrientes pertencentes aos 7 grupos de convencionais da roda alimentar portuguesa (19) e uma seção fechada com cinco categorias de frequências de consumo onde foram extraídos 12 itens de alta classificação (laticínios, peixes gordos, peixes magros e bacalhau, carne branca e vermelha, azeite, pão integral e cereais, ovos, doces, verduras e legumes e frutas). Em seguida, os voluntários receberam as receitas para preparar as refeições contendo as flores de *T. majus*. A ingestão foi dividida em três refeições por dia (pequeno almoço, almoço e jantar) totalizando 20g de flores ingeridas

the main meals was based on the recommendation for intake of salad leaves regularly used by the population (for example, lettuce, rocket), which is a minimum of 12-15 leaves per day (20).

Meals were diversified, for example, salads, soups, cakes, and sandwiches, among other foods. At two time points, one at time zero (before starting the consumption of *T. majus*) and the second at the end of the study, the body composition of all volunteers were evaluated by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA Lunar Prodigy Advance - GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). The parameters measured were Body Fat Percentage (BFP), Visceral Adipose Tissue (VAT), and Subcutaneous Adipose Tissue (TAS). Heart rate and arterial pressure were also measured, and blood and urine samples were collected for clinical analysis (hematological and biochemical) in the Laboratory LEB (Lisbon, Portugal).

During the study, participants were asked for each meal: i) Did you like/dislike the addition of the *T. majus* flowers? Justify. ii) Do you think it could become a regular option in your diet or not? Justify. In addition, the volunteers were contacted daily by the researchers to report whether they had eaten the entire daily portion or if there were leftovers to quantify (in scoops), and to register their opinion about the meals, as well as to report any unwanted/unexpected effects.

Plant Material

The plant material was collected on 12-July, 2021, at Latitude 38.955834, Longitude - 8.994359, Dr Luis César Pereira Urban Park, Time: 14.40 h. The manual harvest was conducted by one technician and the sample was identified and deposited by the Curator of Vascular Plants, Herbário LISU - Jardim Botânico/Herbarium LISU - Botanical Garden, Museu Nacional de História Natural e da Ciência, Lisboa, Portugal (Voucher number: LISU270425). The material was provided fresh to the volunteers, separated in portions of 20 g (daily portion) and kept at -20 °C until consumption.

Statistics

Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) were compared by T-test using GraphPadPrism 5[®] software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). A *p* value <0.05 was considered significant in all experiments.

diariamente durante 30 dias. A porção de 20g. por dia dividida em três frequências diárias nas principais refeições foi baseada na recomendação de ingestão diária de salada de folhas regularmente usadas pela população (por exemplo alface, rúcula), que é de 12-15 folhas por dia no mínimo (20).

As refeições eram diversificadas, por exemplo, saladas, sopas, bolos, sanduíches, entre outros. Em dois momentos, um no momento zero (antes de iniciar o consumo de *T. majus*) e outro no momento final do estudo, a composição corporal de todos os voluntários foi avaliada por absorciometria de raios-x de dupla energia (DXA Lunar Prodigy Advance - GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA). Os parâmetros medidos foram: Percentual de Gordura Corporal (BFP), Tecido Adiposo Visceral (TAV) e Tecido Adiposo Subcutâneo (TAS). A frequência cardíaca e a pressão arterial também foram medidas, e amostras de sangue foram recolhidas análises clínicas (hematológicas e bioquímicas) e de urina no Laboratório LEB (Lisboa, Portugal).

Durante o estudo, foi perguntado para cada refeição: i) Gostou/não gostou da adição das flores de *T. majus*? Justificar. ii) Considera que poderia tornar-se uma opção regular na sua dieta ou não? Justificar. Durante o estudo, os voluntários foram contactados diariamente pelos pesquisadores para relatar se haviam ingerido toda a porção diária ou se havia sobras para quantificar (em colheres), e sua opinião sobre as refeições, bem como quaisquer efeitos indesejados/inesperados.

Material vegetal

O material vegetal foi coletado no dia 12 de julho de 2021, na Latitude 38.955834, Longitude - 8.994359, Parque Urbano Dr. Luis César Pereira, Horário: 14h40. A colheita manual foi realizada por um único técnico e a amostra do material foi depositada e identificada pela Curadora de Plantas Vasculares, Herbário LISU - Jardim Botânico/Herbário LISU - Jardim Botânico, Museu Nacional de História Natural e da Ciência, Lisboa, Portugal. (Voucher número: LISU270425). O material foi fornecido para os voluntários separado em porções de 20 g. (porção diária) e mantidos na temperatura de -20°C até o momento do consumo.

Estatística

Os dados são relatados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) e foram comparados pelo teste T usando o software GraphPadPrism 5[®] (software GraphPad, San Diego, CA, EUA). Um valor de *p* <0,05 foi considerado significativo em todos os experimentos.

Results and Discussion

A healthy diet intended to control the risk of obesity was identified for the study participants based on their dietary habits, characterized by abundant and variable consumption of plant foods, high consumption of cereals, olive oil as the main fat, low intake of red meat, and null to moderate consumption of wine (Table 1). It is well reported that the high consumption of red meat, saturated fatty acids, and cholesterol may be associated with increased risk of diabetes and mortality due to cardiovascular diseases (CVDs) (21-23). Moreover, Alzheimer's disease protection has been associated with a higher intake of vegetables, fruit, whole grains, fish, and legumes and with a lower intake of high-fat dairy, processed meat, and sweets (24). Epidemiological studies suggest a role of fruits and vegetables in protection against disease risks and aging (25), and for this reason the WHO considers that these should be the main foods to be ingested.

The analysis of parameters related to the body composition revealed that there was no observed effect on Body Fat Percentage (BFP), Visceral Adipose Tissue (VAT), and Subcutaneous Adipose Tissue (TAS) after *T. majus* ingestion (Figure 2).

Kim et al. (7) demonstrated in cell culture (3T3-L1 adipocytes) that ethanolic extract of *T. majus* decreases lipid accumulation and inhibits the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding proteins (CEBPs) and

Resultados e Discussão

Foi identificada a prática de uma alimentação saudável com o objetivo de controlar o risco de obesidade para os participantes do estudo com base nos seus hábitos alimentares, caracterizados pelo consumo abundante e variável de alimentos vegetais, alto consumo de cereais, azeite como principal gordura, baixo consumo de carne vermelha, e consumo de vinho nulo a moderado (Tabela 1). Está bem estabelecido que o alto consumo de carne vermelha, ácidos gordos saturados e colesterol podem estar associados ao aumento do risco de diabetes, cancro, Doenças Cardiovasculares (DCVs) (21-23). Além disso, a proteção da doença de Alzheimer foi associada a uma maior ingestão de vegetais, frutas, grãos integrais, peixes e legumes e a uma menor ingestão de laticínios com alto teor de gordura, carne processada e doces (24), e estudos epidemiológicos sugerem um papel frutas e hortaliças, na proteção contra riscos de doenças e envelhecimento (25), razão pela qual a OMS considera que estes devem ser os principais alimentos a serem ingeridos (26).

A análise dos parâmetros relacionados com a composição corporal revelou que não houve efeito no Percentual de Gordura Corporal (PB), Tecido Adiposo Visceral (TAV) e Tecido Adiposo Subcutâneo (TAS) após o consumo das flores de *T. majus* (Figura 2).

Kim et al. (7) mostraram em cultura de células (adipócitos 3T3-L1) que o extrato etanólico de *T. majus* diminui o acúmulo de lipídios e inibe a expressão do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding proteins (CEBPs) e fator de

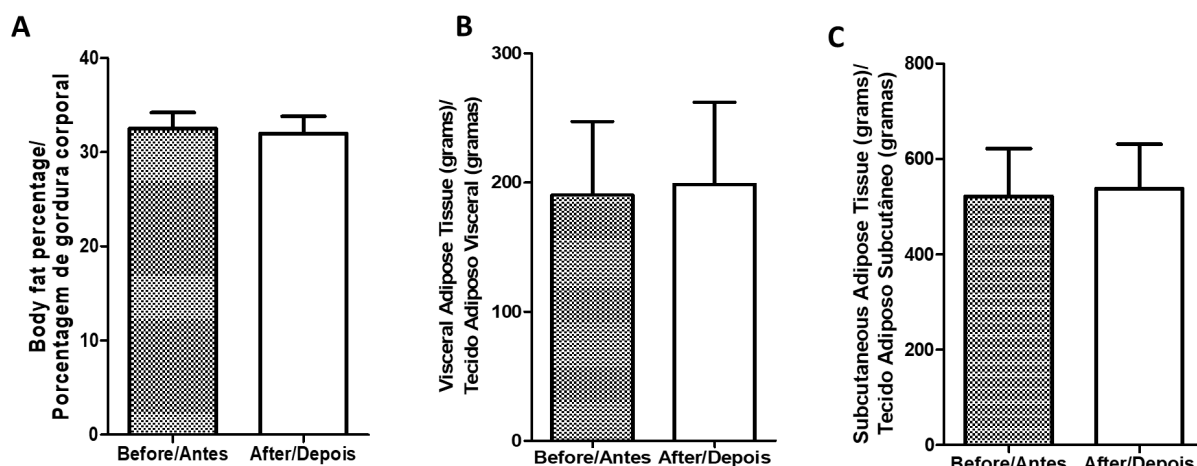


Figure 2 - Body fat mass before and after ingestion of meals containing *T. majus* flowers (20 g/day for 30 days). Data are expressed as mean $\pm$ SD. Comparisons were done by t-test.

Figura 2 - Massa de gordura corporal antes e após a ingestão de refeições contendo flores de *T. majus* (20g/dia por 30 dias). Os dados são expressos como média $\pm$ DP. As comparações foram feitas pelo teste t.

Table 1 - Frequency of food consumption of participants.
Tabela 1- Frequência de consumo alimentar dos participantes.

Item	Frequency of Food Consumption / Frequência de Consumo Alimentar	Data / Dados
Number of meals / Número de refeições	per day / por dia	3 (100%)
Portion / Porção	per day / por dia	Medium (100%) / Média 100%
Dairy products / Laticínios	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	2 2 1 1
Fatty fish / Peixe gordo	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	4 1 1
Lean fish / Peixe magro	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	4 1 1
Cod fish / Bacalhau	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	2 2 2
White meat / Carne branca	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	3 1 2
Red meat / Carne vermelha	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	4 1 1
Eggs / Ovos	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 1 2 3
Olive oil / Azeite de oliva	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 3 3
Wholemeal bread and cereals / Pão integral e cereais	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 3 3
Sweets / Doces	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	2 3 1
Vegetables and legumes / Vegetais e legumes	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 1 5
Fruits / Frutas	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 1 5
Wine / Vinho	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	4 2

sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (SREBF1), which are transcription factors involved in the regulation of the adipogenesis pathway in 3T3-L1 adipocytes. In the present study, neither an effect on lipid accumulation nor a significant reduction in the rate of blood triglyceride content resulting from intake of 20 g daily of *T. majus* flowers was observed. The results are likely not reliable and concern very different study models and experimental conditions but raise interest in future studies with an intake of *T. majus* by participants with a higher percentage of fat mass over a longer period of time.

All participants reported that meals prepared using the daily portion of 20g of *T. majus* flowers had a pleasant taste and no participant left the study. Mlcek et al., (27) also reported good acceptance of *T. majus* in a study that involved sensory evaluation of several species of edible flowers. In addition, during daily contact with the researchers responsible by study, no volunteer reported any changes in the number of bowel movements and stool consistency, urinary volume, or any other discomfort or unexpected change/symptom during the 30 days period of *T. majus* flowers ingestion and within two weeks after study completion. Likewise, no alterations were observed in rate heart and arterial pressure.

No changes were found when the hematological parameters were analyzed (Table 2), nor within the evaluated serum biochemical parameters used to assess liver, kidney, pancreas and metabolic functions (Table 3). The absence of toxicity of *T. majus* was formerly demonstrated by Araújo et al. (8), in a preclinical study using hydroethanolic extract by 90-day in rodents and lagomorphs. No changes in renal parameters, such as serum urea and serum creatinine, were also reported by Gasparoto Junior et al. (4), using ethanolic extract of *T. majus* and one of its main constituents, isoquercetin. Only for the biomarker C-Reactive Protein (CRP) a significant decrease was observed after adding *T. majus* flowers to the diet (Table 3) from 1.18 ± 0.16 mg/dL to 0.73 ± 0.04 mg/dL although in the range of healthy levels. It is well known that CRP is an acute-phase protein that has been associated with response to injury and systemic inflammation (28). Nowadays, epidemiological studies have shown a consistent

transcrição de ligação ao elemento regulador de estero1 (SREBF1), que são fatores de transcrição envolvidos na regulação da via de adipogênese em adipócitos 3T3-L1. No presente estudo, não foi observado efeito na acumulação de lípidos nem redução significativa do teor de triglicerídeos no sangue resultante da ingestão de 20g diários de flores de *T. majus*. Os resultados provavelmente não são relacionáveis pois dizem respeito a modelos de estudo e condições experimentais muito diferentes, mas despertam interesse para estudos futuros com ingestão de *T. majus* por um período mais longo, por participantes com maior percentagem de massa gorda.

Todos os participantes relataram que as refeições preparadas com a porção diária de 20g de flores de *T. majus* tinham sabor agradável e nenhum abandonou o estudo. Mlcek et al. (27) também relataram boa aceitação de *T. majus* num estudo que envolveu avaliação sensorial de várias espécies de flores comestíveis. Adicionalmente, nenhum voluntário relatou durante o contato diário com os investigadores responsáveis pelo estudo qualquer alteração no número de evacuações e consistência das fezes, volume urinário ou qualquer outro desconforto ou alteração/sintoma inesperado durante o período de 30 dias de ingestão de flores de *T. majus* e no intervalo de 2 semanas após a conclusão. Também não foram observadas alterações na frequência cardíaca e na pressão arterial.

Não foram encontradas alterações quando analisados os parâmetros hematológicos (Tabela 2) e quando avaliados os parâmetros bioquímicos séricos utilizados para avaliar as funções hepática, renal, pancreática e metabólica (Tabela 3). A ausência de toxicidade de *T. majus* foi anteriormente demonstrada por Araújo et al. (8), em estudo pré-clínico utilizando extrato hidroetanólico por 90 dias em roedores e lagomorfos. Gasparoto Junior et al. (4) também descreveram a inexistência de qualquer alteração nos parâmetros renais, como ureia sérica e creatinina sérica, utilizando extrato etanólico de *T. majus* e um dos seus principais constituintes, a isoquercetina. No presente estudo, apenas para o biomarcador Proteína C-Reativa (PCR) foi observada uma diminuição significativa após a adição de flores de *T. majus* à dieta (Tabela 3) de $1,18 \pm 0,16$ mg/dL para $0,73 \pm 0,04$ mg/dL embora na faixa de níveis saudáveis. É bem conhecido que a PCR é uma proteína de fase aguda que tem sido associada à resposta subsequente a uma lesão e inflamação sistêmica (28). Atualmente, diversos estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação consistente entre o risco de doença cardiovascular e as concentrações de PCR.

Table 2 - Hematologic parameters before and after ingestion of meals containing 20g of *T. majus* flowers/daily for 30 days.

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos antes e após ingestão de refeições contendo 20g de flores de *T. majus*/dia por 30 dias

Hematologic parameters / Parâmetros hematológicos	Before / Antes	After / Depois
Erythrocytes / Eritrócitos	4.32 ± 0.11x10 ⁶ /mm ³	4.33 ± 0.14 x 10 ⁶ /mm ³
Hemoglobin / Hemoglobina	13.41 ± 0.40 g/dL	13.21 ± 0.43 g/dL
Hematocrit / Hematócrito	39.68 ± 0.98%	39.60 ± 1.13%
Mean Corpuscular Volume / Volume Corpuscular Médio	91.61 ± 0.98 fL	91.38 ± 0.96 fL
Mean Corpuscular Hemoglobin / Hemoglobina Corpuscular Média	30.91 ± 0.42 pg	30.50 ± 0.58 pg
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration / Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média	33.73 ± 0.33 g/dL	33.38 ± 0.35 g/dL
Red Cell Distribution Width / Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos	13.31 ± 0.33 %	13.43 ± 0.22 %
Leukocytes / Leucócitos	5.25 ± 0.52 x 10 ³ /mm ³	6.01 ± 0.75 x 10 ³ /mm ³
Neutrophils / Neutrófilos	51.21 ± 3.62 %	59.10 ± 3.99 %
Eosinophils / Eosinófilos	3.00 ± 0.59 %	3.06 ± 0.61 %
Basophils / Basófilos	0.85 ± 0.20 %	0.66 ± 0.10 %
Lymphocytes / Linfócitos	38.81 ± 3.25 %	32.08 ± 3.25 %
Monocytes / Monócitos	6.13 ± 0.22 %	5.58 ± 0.25 %
Platelets / Plaquetas	231.5 ± 15.84 x 10 ³ /mm ³	228.0 ± 12.40 x 10 ³ /mm ³

Data are reported as mean ± standard error of the mean (SEM) were compared by t-test using / Os dados são relatados como média ± erro padrão da média (SEM) e foram comparados pelo teste t.

Table 3 - Biochemical parameters before and after ingestion of meals containing 20 g of *T. majus* flowers/daily for 30 days.

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos antes e após a ingestão de refeições contendo 20g de flores de *T. majus*/dia por 30 dias.

Biochemical parameters / Parâmetros bioquímicos	Before / Antes	After / Depois
Blood Uric Acid / Ácido Úrico Sanguíneo	8.85 ± 4.83 mg/dL	3.95 ± 0.40 mg/dL
Blood Creatinine / Creatinina Sanguínea	0.73 ± 0.03 mg/dL	0.75 ± 0.04 mg/dL
Cholesterol / Colesterol	209.66 ± 15.64 mg/dL	210.16 ± 14.05 mg/dL
HDL Cholesterol / Colesterol HDL	69.5 ± 2.30 mg/dL	66.66 ± 3.02 mg/dL
Triglycerides / Triglicerídeos	56.66 ± 7.03 mg/dL	74.50 ± 16.97 mg/dL
Thyroxine (T4) / Tiroxina	14.19 ± 0.81 pmol/L	14.85 ± 0.44 pmol/L
Thyroid-Stimulating Hormone / Hormona Tireoestimulante	1.73 ± 0.25 µUI/mL	1.82 ± 0.30 µUI/mL
Alanine Aminotransferase (ALT) / Alanina Aminotransferase (ALT)	16.00 ± 1.06 U/L	15.33 ± 1.38 U/L
Aspartate Aminotransferase (AST) / Aspartato Aminotransferase (AST)	19.66 ± 1.47 U/L	17.50 ± 0.61 U/L
Gamma-glutamyltransferase (GGT)	18.50 ± 1.52 U/L	21.00 ± 1.50 U/L
Glycemia / Glicemia	84.00 ± 5.10 mg/dL	79.83 ± 6.05 mg/dL
Glycated hemoglobin (HbA1c) / Hemoglobina Glicada (HbA1c)	5.40 ± 0.06%	5.43 ± 0.08%
Hemo Sedimentation rate / Velocidade de Hemossedimentação	5.67 ± 0.66 mm/h	7.17 ± 1.10 mm/h
C-Reactive Protein (CRP) / Proteína C-reativa (PCR)	1.18 ± 0.16 mg/dL	0.73 ± 0.04 mg/dL*
Urine pH / pH urinário	6.08 ± 0.32	6.00 ± 0.40

Data are reported as mean ± standard error of the mean (SEM) were compared by T-test using / Os dados são relatados como média ± erro padrão da média (SEM) e foram comparados pelo teste t.

association between cardiovascular disease risk and CRP concentrations. Elevated levels of CRP are related to inflammatory processes which are related to vascular cell activation, thrombosis, and accumulation of lipids and atherosclerotic process (29). *T. majus* contains a variety of bioactive compounds which are also known for their anti-inflammatory and antioxidant properties, including ascorbic acid (Vitamin C), flavonoids, carotenoids, and other polyphenolics (30). Furthermore, aqueous extracts of *T. majus* significantly suppressed the production of inflammatory mediators such as TNF- α , Prostaglandin E2 (PGE2), and leukotriene LTB4 in human blood cells (31). Another group of interesting substances from *T. majus* are the thermostable glucosinolates (32,33), such as glucotropaeolin, which is metabolized into benzyl isothiocyanate and has significant antitumor activity (34, 35). Thus, monitoring CRP before and after ingestion of *T. majus* for a longer time period and within a more representative group of human volunteers may contribute to a better understanding of the reason and significance of the decrease observed in our study.

Only about 103 plant species are responsible for 90% of the world's food supply despite estimates showing that there are about 27,000 plant food species (36). Hence, there are many species with alimentary potential which are neglected. Many of these species were used in the past, but their use has been abandoned with the industrialization and urbanization processes. In the last years, several of these species, including *T. majus*, have been highlighted as nutritious UFPs with high impact in Latin- and Ibero-American countries, namely Brazil and Portugal (12). Thus, more studies on its acceptance, safety, and nutritional value are important to understand any benefit/risk relationship for its use in the human diet.

The European Green Deal has the "Farm to Fork" strategy as a central focus to make food systems fair, sustainable, and healthy. The role of UFPs in this path is indisputable, but increasing the adoption of healthy and sustainable diets does not mean adhering to all the available UFPs offered without any criteria (37). Hence, the need to anticipate emerging risks for edible flower consumption has been brought to the EFSA's (European Food Safety Authority) agenda. The guarantee of

A PCR é um marcador para processos inflamatórios que podem estar envolvidos em todos os estágios, influenciando diretamente o processo aterosclerótico, ativação de células vasculares, trombose e acumulação de lipídios (29). *T. majus* contém uma variedade de compostos bioativos que também são conhecidos pelo seu potencial anti-inflamatório e antioxidante, incluindo ácido ascórbico (Vitamina C), flavonóides, carotenóides e outros polifenóis (30). Tran et al. (31) demonstraram que extratos aquosos de *T. majus* exerceram forte supressão dependente da concentração na libertação de TNF- α desencadeada por LPS e sinalização da via COX, incluindo a síntese de PGE2. Além disso, o *T. majus* é rico em glucosinolatos (32,33) como a glucotropaeolina que é metabolizada em isotiocianato de benzilo, que são moléculas termooestáveis e que possuem atividades anticancerígenas (34, 35). Perante esta informação, é importante reconhecer que a monitorização da PCR antes e após a ingestão de *T. majus* por um período maior de tempo e para um grupo mais representativo de voluntários humanos pode contribuir para entender melhor o motivo e significância da diminuição observada neste estudo.

Numa perspetiva de sustentabilidade, estima-se que existam cerca de 27 mil espécies vegetais com potencial alimentar no mundo, no entanto, apenas cerca de 103 espécies vegetais são responsáveis por 90% da oferta mundial de alimentos (36). Ou seja, existem muitas espécies com potencial alimentar que são negligenciadas. Muitas foram utilizadas no passado, mas com os processos de industrialização e urbanização o seu uso foi abandonado. Nos últimos anos, várias destas espécies têm-se destacado como PANCs nutritivas com elevado impacto em países da América Latina e Ibero-americanos, nomeadamente Brasil e Portugal, sendo a *T. majus* uma delas (12). Percebe-se, assim, que são importantes mais estudos sobre a sua aceitação, segurança e valor nutricional para entender qualquer relação benefício/risco para seu uso na dieta humana.

No contexto da globalização, a "Estratégia da quinta ao prato" está no centro do Pacto Verde Europeu para tornar os sistemas alimentares justos, sustentáveis e saudáveis. O papel das PANCs nesse caminho é indiscutível, mas aumentar a adoção de dietas saudáveis e sustentáveis não significa aderir a todas as PANCs disponíveis oferecidas sem nenhum critério (37). A necessidade de antecipar os riscos emergentes para o consumo de flores comestíveis foi trazida para a agenda da EFSA (European Food Safety Authority). A garantia de informações claras é um requisito do consumidor

clear information is a consumer demand which shall be satisfied, a purpose that should unite universities/researchers and authorities, applying the Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for the safety assessment of botanicals and botanical preparations published by EFSA (38). As an example of UFPs approach, we recall that EFSA was asked very recently by the European Commission whether there are duly reasoned safety objections to the placing on the market dried flowers of *Clitoria ternatea* L. as a traditional food (TF), known as butterfly pea, from a third country within the European Union (39). EFSA noted the *in vitro* haemolytic and cytotoxic effects reported for some cyclotides (circular proteins) as well as data indicating possible effects on the immune system, and uterus (although these cyclotides responsible for these effects have not been detected in *Clitoria ternatea*). Given the potential exposure to cyclotides resulting from the use of *C. ternatea* for the preparation of herbal infusions and the unknown toxicological profile of the cyclotides present in these edible flowers, the EFSA considered that could have some risk to human health. Thus, EFSA raised safety objections to the placing on the EU market of the dried flowers of *Clitoria ternatea*.

Considering the UFP *T. majus*, the *a priori* guidance of the EFSA for the safety assessment of plants and botanical preparations intended to be used as ingredients in food supplements applies (40), which provides that plants or botanical preparations for which an adequate body of knowledge exists can benefit from a 'presumption of safety (QPS)' without the need for further testing. In this situation, the QPS decision for *T. majus* can be based on available data on the history of safe use at traditional exposure levels, i.e., data regarding the safety of aqueous extracts of *T. majus* and consumption of the whole flower, with no reports of adverse effects (41).

In the particular case of *T. majus* flowers, there is evidence for the acceptable safety of its use as a wholly natural ingredient or dietary supplement in daily meals, well supported by studies of aqueous extracts (typical culinary medium) in animals and here in humans for the first time. However, since there are warnings in the literature about potential additional concerns related to the reproductive effects of ethanol extracts, it is advisable that further research should be carried out in search of a substance or group of substances for which a value should be defined as a limit related to observable health effects. Taking into account that the existing

que deve ser atendido, propósito que deve unir universidades/pesquisadores e autoridades, aplicando a abordagem da Presunção de Segurança Qualificada (QPS) para a avaliação de segurança de preparações botânicas publicadas pela EFSA (38). Como exemplo para a abordagem das PANCs, a EFSA foi questionada muito recentemente pela Comissão Europeia se existiam objeções de segurança devidamente fundamentadas à colocação no mercado de flores secas de *Clitoria ternatea* L. alimento tradicional conhecido como ervilha borboleta por parte de um país terceiro da União Europeia (39). A EFSA observou efeitos hemolíticos e citotóxicos *in vitro* relatados para alguns ciclotidos (proteínas circulares), bem como dados indicando possíveis efeitos no sistema imunológico e no útero (embora os ciclotidos responsáveis por estes efeitos não tenham sido detectados em *Clitoria ternatea*). Mesmo assim, dada a potencial exposição a ciclotidos resultante do uso de *C. ternatea* para a preparação de infusões de ervas e o perfil toxicológico desconhecido dos ciclotidos presentes nessas flores comestíveis, a EFSA considerou que poderia existir algum risco para a saúde humana. Assim, a EFSA levantou objeções de segurança à colocação no mercado da UE das flores secas de *Clitoria ternatea*.

Considerando a PANC *T. majus*, aplica-se a orientação *a priori* da EFSA para a avaliação da segurança de plantas e preparações botânicas destinadas a serem usadas como ingredientes em suplementos alimentares (40), que prevê que plantas ou preparações botânicas para as quais existe um corpo de conhecimento adequado podem beneficiar de uma "presunção de segurança (QPS)" sem necessidade de mais testes. Nesta situação, a decisão do QPS para *T. majus* pode ser baseada em dados disponíveis sobre o histórico de uso seguro em níveis de exposição tradicionais, ou seja, dados seguros para extratos aquosos de *T. majus* e consumo da flor inteira, sem relato de efeitos adversos (41).

No caso particular das flores de *T. majus*, há evidências da segurança aceitável de seu uso como ingrediente totalmente natural ou suplemento alimentar nas refeições diárias, bem apoiada por estudos de extratos aquosos (meio culinário típico) em animais e aqui em humanos pela primeira vez. No entanto, uma vez que existem alertas na literatura sobre potenciais preocupações adicionais relacionadas com os efeitos reprodutivos dos extratos etanólicos, é aconselhável que mais pesquisas sejam realizadas em busca de uma substância ou grupo de substâncias para o qual um valor deva ser definido como limite relacionado com os efeitos observáveis na saúde. Tendo em conta

quality and toxicity data are insufficient to derive such a value, and *T. majus* concentrates obtained in alcohol seem unsuitable for unrestricted food use, the safety assessment of *T. majus* should be further developed for its various extracts.

Finally, it is important to recognize that, as this is a pilot exploratory work, there are some limitations in this study: 1) the limited number of participants (six) whose recruitment has been harmed by a study in pandemic phase; 2) the heterogeneous distribution of sex and age of the participants; 3) the lack of a control group and 4) lack of estimation of energy and nutrient intake, although the frequency of consumption and food portion size were already evaluated.

Conclusion

Results obtained indicate that *T. majus* flowers are well accepted when added to different meals and corroborate the information in the literature about its use being safe for humans. This is the first exploratory study referring to the safety of consumption of *T. majus* flowers in healthy humans, alerting to the importance of designing additional, more complete studies to confirm the promising results in a larger number of volunteers.

que os dados de qualidade e toxicidade existentes são insuficientes para derivar tal valor, e os concentrados de *T. majus* obtidos em álcool não parecem adequados para uso alimentar irrestrito, a avaliação de segurança de *T. majus* deve ser desenvolvida para os seus diversos extratos.

Por fim, é importante reconhecer que, por se tratar de um trabalho piloto exploratório, existem algumas limitações neste estudo: 1) número limitado de participantes (seis) cujo recrutamento foi prejudicado por um estudo em fase de pandemia; 2) distribuição heterogênea de sexo e idade dos participantes; 3) falta de um grupo controle e 4) falta de estimativa da ingestão de energia e nutrientes, embora a frequência de consumo e o tamanho da porção dos alimentos já tenham sido avaliados.

Conclusão

Os resultados obtidos indicam que as flores de *T. majus* são bem aceitas quando adicionadas a diferentes refeições e corroboram as informações da literatura sobre seu uso ser seguro para humanos. Este é o primeiro estudo exploratório referente à segurança do consumo de flores de *T. majus* em humanos saudáveis, alertando para a importância de serem desenhados estudos adicionais mais completos para confirmar os resultados promissores em um número maior de voluntários.

Authors' Contributions Statement

SFA, MCC, MGLS, and RGT undertook the experimental procedures. SFA, RGT, APS, LMR, and MCC executed and discussed the statistical analysis and wrote and corrected the manuscript in its final version.

Acknowledgements

This research is funded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) through grant UIDB/04567/2020 to CBIOS. Sérgio Faloni de Andrade is funded by Foundation for Science and Technology (FCT) - Scientific Employment Stimulus contract with the reference number CEEC/CBIOS/PMHD/2018.

Conflict of Interests

Editors involved in this manuscripts' authorship had no participation in the review or decision process. All authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

Declaração de Contribuições dos Autores

As contribuições dos autores foram: SFA, MCC, MGLS e RGT realizaram procedimentos experimentais. SFA, RGT, APS, LMR e MCC realizaram a análise estatística, redigiram e corrigiram o manuscrito em sua versão final.

Agradecimentos

Esta investigação é financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através da bolsa UIDB/04567/2020 ao CBIOS. Sérgio Faloni de Andrade é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) - Contrato de Estímulo ao Emprego Científico com a referência CEEC/CBIOS/PMHD/2018.

Conflito de interesses

Os editores envolvidos na autoria deste manuscrito não tiveram participação no processo de revisão ou decisão. Todos os autores afirmaram que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- Jakubczyk, K., Janda, K., Watychowicz, K., Łukasiak, J., & Wolska, J. (2018). Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) - a source of mineral elements and bioactive compounds. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 69(2), 119-126.
- Tropaeolum majus*: info from PIER (PIER species info). (2021). Retrieved 7 December 2021, from http://www.hear.org/pier/species/tropaeolum_majus.htm
- Tropaeolum majus* L. (2021). Retrieved 7 December 2021, from <https://www.gbif.org/species/2889934>
- Gomes, C., Lourenço, E., Liuti, É., Duque, A., Nihi, F., & Lourenço, A. et al. (2012). Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats. *Journal Of Ethnopharmacology*, 142(2), 481-487. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.023>
- Gasparotto Junior, A., Gasparotto, F., Lourenço, E., Crestani, S., Stefanello, M., & Salvador, M. et al. (2011). Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(2), 363-372. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.026>
- Barboza, L., Prando, T., Dalsenter, P., Gasparotto, F., Gasparotto, F., & Jacomassi, E. et al. (2014). Prolonged Diuretic Activity and Calcium-Sparing Effect of *Tropaeolum majus*: Evidence in the Prevention of Osteoporosis. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 2014, 1-6. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/958291>
- Kim, G., Kim, J., Kim, G., & Choi, S. (2017). Anti-adipogenic effects of *Tropaeolum majus* (nasturtium) ethanol extract on 3T3-L1 cells. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1339555. doi: <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1339555>
- Araújo, V., Andreotti, C., Reis, M., de Lima, D., Pauli, K., & Nunes, B. et al. (2018). 90-Day Oral Toxicity Assessment of *Tropaeolum majus* L. in Rodents and Lagomorphs. *Journal Of Medicinal Food*, 21(8), 823-831. doi: <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0128>
- Traesel, G., Machado, C., Tirloni, C., Menetrier, J., dos Reis Livero, F., & Lourenço, E. et al. (2017). Safety Assessment and Botanical Standardization of an Edible Species from South America. *Journal of Medicinal Food*, 20(5), 519-525. doi: <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0143>
- Khorsandi, L., & Oroojan, A. (2018). Toxic effect of *Tropaeolum majus* L. leaves on spermatogenesis in mice. *JBRA Assisted Reproduction*. doi: <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180035>
- Korim, K., Arbid, M., & El-Gendy, N. (2010). The protective role of *Tropaeolum majus* on blood and liver toxicity induced by diethyl maleate in rats. *Toxicology Mechanisms And Methods*, 20(9), 579-586. doi: <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.518171>
- Mazon, S., Menin, D., Cella, B., Lise, C., Vargas, T., & Daltoé, M. (2020). Exploring consumers' knowledge and perceptions of unconventional food plants: case study of addition of *Pereskia aculeata* Miller to ice cream. *Food Science And Technology*, 40(1), 215-221. doi: <https://doi.org/10.1590/fst.39218>
- Garzón, G., & Wrolstad, R. (2009). Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chemistry*, 114(1), 44-49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.013>
- Mlecek, J., & Rop, O. (2011). Fresh edible flowers of ornamental plants – A new source of nutraceutical foods. *Trends In Food Science & Technology*, 22(10), 561-569. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.04.006>
- Navarro-González, I., González-Barrio, R., García-Valverde, V., Bautista-Ortín, A., & Periago, M. (2014). Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *International Journal Of Molecular Sciences*, 16(1), 805-822. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms16010805>
- Niizu, P., & Rodriguez-Amaya, D. (2006). Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as Rich Sources of Lutein. *Journal Of Food Science*, 70(9), S605-S609. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb08336.x>
- World Medical Association Declaration of Helsinki. (2013). *JAMA*, 310(20), 2191.
- Lopes, C., Aro, A., Azevedo, A., Ramos, E., & Barros, H. (2007). Intake and Adipose Tissue Composition of Fatty Acids and Risk of Myocardial Infarction in a Male Portuguese Community Sample. *Journal of the American Dietetic Association*, 107(2), 276-286. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2006.11.008>
- Roda dos Alimentos, PNPAS. (2022). Retrieved 2 January 2022, from <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/roda-dos-alimentos/>
- Silva, C.L. (2011). Repositório Institucional da UnB: Página inicial. https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/9899/1/2011_ClislianLuziaSilva.pdf
- Giacosa, A., Barale, R., Bavarese, L., Gatenby, P., Gerbi, V., & Janssens, J. et al. (2013). Cancer prevention in Europe. *European Journal Of Cancer Prevention*, 22(1), 90-95. doi: [10.1097/cej.0b013e328354d2d7](https://doi.org/10.1097/cej.0b013e328354d2d7)
- Da Silva, A., Valente, A., Chaves, C., Matos, A., Gil, A., & Santos, A. et al. (2018). Characterization of Portuguese Centenarian Eating Habits, Nutritional Biomarkers, and Cardiovascular Risk: A Case Control Study. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2018, 1-10. doi: [10.1155/2018/5296168](https://doi.org/10.1155/2018/5296168)
- Pereira da Silva, A., Costa, M., Aguiar, L., Matos, A., Gil, Á., & Gorjão-Clara, J. et al. (2020). Impact on Longevity of Genetic Cardiovascular Risk and Lifestyle including Red Meat Consumption. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2020, 1-14. doi: [10.1155/2020/130541324](https://doi.org/10.1155/2020/130541324)
- Mosconi, L., Murray, J., Davies, M., Williams, S., Pirraglia, E., & Spector, N. et al. (2014). Nutrient intake and brain biomarkers of Alzheimer's disease in at-risk cognitively normal individuals: a cross-sectional neuroimaging pilot study. *BMJ Open*, 4(6), e004850-e004850. doi: [10.1136/bmjopen-2014-004850](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-004850)
- Virmani, A., Pinto, L., Binienda, Z., & Ali, S. (2013). Food, Nutrigenomics, and Neurodegeneration—Neuroprotection by What You Eat!. *Molecular Neurobiology*, 48(2), 353-362. doi: [10.1007/s12035-013-8498-3](https://doi.org/10.1007/s12035-013-8498-3)
- WHO, "Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases," World Health Organ Technical Report Series, vol. 916, pp. 1-149, 2003
- Mlecek, J., Plaskova, A., Jurikova, T., Sochor, J., Baron, M., & Ercisli, S. (2021). Chemical, Nutritional and Sensory Characteristics of Six Ornamental Edible Flowers Species. *Foods*, 10(9), 2053. <https://doi.org/10.3390/foods10092053>
- Yao, Z., Zhang, Y., & Wu, H. (2019). Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. *Inflammation Research*, 68(10), 815-823. doi: [10.1007/s00011-019-01269-1](https://doi.org/10.1007/s00011-019-01269-1)
- Avan, A., Tavakoly Sany, S., Ghayour-Mobarhan, M., Rahimi, H., Tajfard, M., & Ferns, G. (2018). Serum C-reactive protein in the prediction of cardiovascular diseases: Overview of the latest clinical studies and public health practice. *Journal Of Cellular Physiology*, 233(11), 8508-8525. doi: [10.1002/jcp.26791](https://doi.org/10.1002/jcp.26791)
- Dujmović, M., Radman, S., Opačić, N., Fabek Uher, S., Mikuličin, V., Voća, S., & Šic Žlabur, J. (2022). Edible Flower Species as a Promising Source of Specialized Metabolites. *Plants*, 11(19), 2529. <https://doi.org/10.3390/plants11192529>
- Tran, H., Márton, M., Herz, C., Maul, R., Baldermann, S., Schreiner, M., & Lamy, E. (2016). Nasturtium (Indian cress, *Tropaeolum majus* nanum) dually blocks the COX and LOX pathway in primary human immune cells. *Phytomedicine*, 23(6), 611-620. doi: [10.1016/j.phymed.2016.02.025](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.025)
- Breme K, Fernandez X, Meierhenrich UJ, Brevard H, Joulain D. Identification of new, odor-active thiocarbamates in cress extracts and structure-activity studies on synthesized homologues. *J Agric Food Chem*. 2007 Mar 7;55(5):1932-8. doi: [10.1021/jf062856e](https://doi.org/10.1021/jf062856e). Epub 2007 Feb 2. PMID: 17269787
- Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelfa, A., Zhu, Z., & Koubaa, M. (2016). Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers in Nutrition*, 3. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00024>
- Soundararajan P, Kim JS. Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers. *Molecules*. 2018; 23(11):2983. <https://doi.org/10.3390/molecules23112983>

35. Platz, S., Kühn, C., Schiess, S., Schreiner, M., Kemper, M., Pivovarova, O., Pfeiffer, A. F. H., & Rohn, S. (2015). Bioavailability and metabolism of benzyl glucosinolate in humans consuming Indian cress (*Tropaeolum majus* L.). *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(3), 652–660. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500633>
36. Leal, M., Alves, R., & Hanazaki, N. (2018). Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. *Journal Of Ethnobiology And Ethnomedicine*, 14(1). doi: 10.1186/s13002-018-0209-8
37. The European Green Deal: opportunities to anticipate and address emerging risks. (2022). Retrieved 2 January 2022, from <https://summitdialogues.org/dialogue/18790>
38. EFSA (European Food Safety Authority), (2014). Scientific Opinion on a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for the safety assessment of botanicals and botanical preparations. *EFSA Journal*, 12(3). doi: <https://10.2903/j.efsa.2014.3593>
39. EFSA (European Food Safety Authority), (2022). Notification of dried flowers of *Clitoria ternatea* L. as a traditional food from a third country pursuant to Article 14 of Regulation (EU) 2015/2283. EFSA supporting publication 2022:EN-7084. 17pp. doi:10.2903/sp.efsa.2022.EN-7084 ISSN: 2397-8325
40. EFSA (European Food Safety Authority), (2009). Guidance on Safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as ingredients in food supplements. *EFSA Journal*, 7(9). doi: <https://10.2903/j.efsa.2009.1249>
41. EFSA Scientific Committee, More, S.J., Bampidis, V., Benford, D., Bragard, C., Halldorsson, T.I., Hernandez-Jerez, A.F., Hougaard, B.S., Koutsoumanis, K.P., Machera, K., Naegeli, H., Nielsen, S.S., Schlatter, J.R., Schrenk, D., Silano, V., Turck, D., Younes, M., Gundert-Remy, U., Kass, G.E.N., Kleiner, J., Rossi, A.M., Serafimova, R., Reilly, L. and Wallace, H.M. (2019). Guidance on the use of the Threshold of Toxicological Concern approach in food safety assessment. *EFSA Journal*;17(6):5708, 17 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5708>