

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Luiza Pereira dos Santos

**MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE
BROTOS**

Rio de Janeiro/RJ

2022

Luiza Pereira dos Santos

**MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE
BROTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro/RJ

2022

d237 dos Santos, Luiza
Marcadores fenotípicos e genotípicos de
resistência aos antimicrobianos em bactérias gram-
negativas isoladas de brotos / Luiza dos Santos. --
Rio de Janeiro, 2022.
96 f.

Orientador: Victor Augustus Marin.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição, 2022.

1. Brotos. 2. Segurança Alimentar. 3. Bactérias
gram-negativas. 4. Resistência a antibióticos . I.
Marin, Victor Augustus , orient. II. Título.

Luiza Pereira dos Santos

**MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE
BROTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição
da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
como requisito parcial para a obtenção do título de
mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovado em 28 de abril de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Victor Augustus Marin

Dr. Ricardo Felipe Alves Moreira

Dra. Roberta Fontanive Miyahira





Folha aprovação Dissertação Luiza Pereira dos Santos

Data e Hora de Criação: 20/05/2022 às 12:21:32

Documentos que originaram esse envelope:

- Folha_aprovação_Dissertação_Luiza_Pereira_dos_Santos.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[BHA256]: 9a8477b52c7679f54c7d65ac6266dfe8025b2fd427e6c92910910bfbbe1bf16

[BHA512]: ed8b495037a45ef93aedb879aa1212e20c74cae93eba726dfefb80d97131bdf14ad632d789748d207cc53b005947177b2f983c4d0fe64798a9db0a67b137819

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Ricardo Felipe Alves Moreira (ricardo.moreira@unirio.br)

Data/Hora: 20/05/2022 - 12:41:49, IP: 179.83.233.159

[BHA256]: 2cf677eb37718f3e732a3c793227a4156e1cf4db434421c238963fde08ada387

Ricardo Felipe Alves Moreira



ASSINADO - Roberta Fontanive Miyahira (robertamiyahira@gmail.com)

Data/Hora: 20/05/2022 - 13:28:19, IP: 185.54.230.131, Geolocalização: [-22.911165, -43.237023]

[BHA256]: 87d6e90050e41bf5b40963e598355fd3d68d916be57ac92f023c8441ca68daad



ASSINADO - Victor Augustus Marin (victor.marin@unirio.br)

Data/Hora: 20/05/2022 - 12:43:11, IP: 179.218.49.193

[BHA256]: acf70e461bb1d9efb445283313bd052b79b23d4911ce15b47287594e0a0159

victor augustus marin

Histórico de eventos registrados neste envelope

20/05/2022 13:28:19 - Envelope finalizado por robertamiyahira@gmail.com, IP 185.54.230.131
20/05/2022 13:28:19 - Assinatura realizada por robertamiyahira@gmail.com, IP 185.54.230.131
20/05/2022 13:28:06 - Envelope visualizado por robertamiyahira@gmail.com, IP 185.54.230.131
20/05/2022 12:43:11 - Assinatura realizada por victor.marin@unirio.br, IP 179.218.49.193
20/05/2022 12:43:01 - Envelope visualizado por victor.marin@unirio.br, IP 179.218.49.193
20/05/2022 12:41:49 - Assinatura realizada por ricardo.moreira@unirio.br, IP 179.83.233.159
20/05/2022 12:41:46 - Envelope visualizado por ricardo.moreira@unirio.br, IP 179.83.233.159
20/05/2022 12:41:35 - Envelope registrado na Blockchain por ricardo.moreira@unirio.br, IP 179.83.233.159
20/05/2022 12:41:34 - Envelope encaminhado para assinaturas por ricardo.moreira@unirio.br, IP 179.83.233.159
20/05/2022 12:21:32 - Envelope criado por ricardo.moreira@unirio.br, IP 179.83.233.159



Documento em conformidade com o padrão de assinatura digital ICP-Brasil e validade de acordo com o Instituto Nacional de Tecnologia da Informação

Os registros de assinatura presentes nesse documento pertencem única e exclusivamente a esse envelope.
Documento final gerado e certificado por Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro



Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela vida e pela saúde que me concebeu e por todas as bênçãos que Ele concede a mim e a minha família.

Posteriormente, gostaria de agradecer aos meus pais Edison e Maíra, por toda paciência, carinho, apoio e por serem meu suporte. Por sempre acreditarem em mim, neste projeto e, contribuírem incondicionalmente em minha formação profissional e pessoal pois, sem eles, nada disto seria realidade. Agradeço imensamente ao meu querido namorado Alexandre, por toda a paciência, amor, dedicação e companheirismo este tempo todo. Com certeza você foi parte fundamental desta minha jornada e o meu maior refúgio, sinto apenas gratidão por tê-lo em minha vida. E não menos importante, agradeço também aos meus amigos, por todos o carinho, ajuda e lealdade durante toda esta jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Victor Augustus, pelos inúmeros ensinamentos, pelo tempo cedido à pesquisa, por todo o empenho e profissionalismo com este projeto. Graças a você e suas incontáveis ajudas prestadas que este trabalho pode acontecer. A Cristiane, técnica de Laboratório, que foi essencial no momento das coletas e por toda a paciência dedicadas a este trabalho. E a todos os professores que contribuíram para a minha formação ao longo destes anos e auxiliaram para que pudesse me tornar a pessoa que sou hoje.

E por fim, à Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, por me concederem a oportunidade da realização desta Pós-Graduação e por todos os ensinamentos aprendidos nesta Instituição.

RESUMO

Os brotos são comumente consumidos crus em saladas e sanduíches ou em alimentos levemente cozidos e devido ao seu alto teor de água, são altamente perecíveis e sujeitos a um rápido desperdício causado por microrganismos endógenos e exógenos e, portanto, exigem processamento rápido e embalagem especializada. A avaliação da microbiota resistente aos antibióticos embora não seja habitual em alimentos, pode trazer informações mais completas que as obtidas com técnicas de isolamento, além de relevantes para a avaliação do potencial de um alimento atuar no processo de resistência. Esta pesquisa estabeleceu como metodologia analisar a susceptibilidade aos antibióticos em bactérias Gram-negativas oriundas de brotos de lentilha, girassol, alfafa e trevo, além da investigação da presença de genes que possam conferir resistência as bactérias presentes e estabeleceu um comparativo entre os diferentes pontos de corte de susceptibilidade. Os resultados mostraram uma resistência fenotípica elevada. Todas as 5 amostras de brotos evidenciaram uma microbiota altamente resistente. Nenhuma das 5 amostras mostraram resistência a todos os 10 antibióticos testados. A taxa de resistência de 9 antibióticos foi atingida em 100% das amostras. Antibióticos considerados críticos como os carbapenêmicos apresentaram microbiota resistente em 90% dos brotos, similar no caso das cefalosporinas, ceftazidima (3ª geração), também apresentou 90% de resistência. E, nenhuma amostra resistente à cefepima (quarta geração de cefalosporina) foi encontrada. Na investigação genotípica foram encontrados sete genes de resistência distintos em 58% dos isolados. Os resultados demonstram que os brotos podem apresentar microbiota com grande potencial de resistência, evidenciado fenotipicamente e genotipicamente neste trabalho. Os resultados demonstram a importância da área de alimentos como uma ferramenta a fim de reduzir o processo de resistência aos antibióticos.

Palavras-chave: brotos, segurança alimentar, bactérias Gram negativas, resistência a antibióticos.

ABSTRACT

Sprouts are commonly eaten raw in salads and sandwiches or in lightly cooked foods and due to their high water content they are highly perishable and subject to rapid waste caused by endogenous and exogenous microorganisms and therefore require rapid processing and specialized packaging. The evaluation of antibiotic-resistant microbiota, although not common in foods, can provide more complete information than those obtained with isolation techniques, in addition to being relevant to the evaluation of the potential of a food to act in the resistance process. This research established as a methodology to analyze the susceptibility to antibiotics in Gram-negative bacteria from lentil, sunflower, alfalfa and clover sprouts, in addition to investigating the presence of genes that can confer resistance to the bacteria present and establishing a comparison between the different points of susceptibility cut. The results showed a high phenotypic resistance. All 5 sprout samples showed a highly resistant microbiota. None of the 5 samples showed resistance to all 10 antibiotics tested. The resistance rate of 9 antibiotics was reached in 100% of the samples. Antibiotics considered critical such as carbapenems showed resistant microbiota in 90% of the shoots, similar in the case of cephalosporins, ceftazidime (3rd generation), also showed 90% resistance. And, no samples resistant to cefepime (fourth generation cephalosporin) were found. In the genotypic investigation, seven different resistance genes were found in 58% of the isolates. The results demonstrate that the sprouts can present microbiota with great resistance potential, evidenced phenotypically and genotypically in this work. The results demonstrate the importance of the food area as a tool to reduce the process of antibiotic resistance.

Keywords: sprouts, food safety, Gram negative bacteria, antibiotic resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Etapa de pré-seleção.....	45
Figura 2. Disco difusão.....	47
Figura 3. Gel de eletroforese dos produtos de PCR de integron classe 3 e tet A.....	50
Gráfico 1. Resistência fenotípica por amostra, de acordo com os parâmetros do CLSI.....	46
Gráfico 2. Resistência fenotípica total comparando os parâmetros do CLSI e do BrCast.....	48
Gráfico 3. Comparativo dos antibióticos que apresentaram variações na resistência fenotípica usando os parâmetros do CLSI e do BrCast.....	49

Tabela 1. Resumo das propriedades dos antibióticos utilizados.....	39
Tabela 2. Pontos de corte interpretativos BrCAST/EUCAST.....	40
Tabela 3. Sequência de nucleotídeos, tamanho dos genes e suas respectivas referências.....	41
Tabela 4. Quantidade de genes de resistência em amostras de brotos em isolados.....	50
Tabela 5. Resumo dos genes encontrados em cada isolado.....	51
Tabela 6. Resumo dos genes encontrados em cada isolado.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ARBs	Bactérias resistentes a antibióticos
ARGs	Genes de resistência a antibióticos
Ca ²⁺	Cálcio
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRC	Câncer de colorretal
CXCR4	Receptor de quimiocina
DIM	3,31-diindolilmetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ES	Serviços ecossistêmicos
ESBL-E	<i>Enterobacteriaceae</i>
ETARs	Estações de tratamento de águas residuais
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FW	Desperdício de comida
GLS	Glucosinolatos
GN	Gram-negativo
GPx	Glutathione peroxidase
HGT	Transferência horizontal de genes
HM	Broto de grama de cavalo fresco
I3C	Indol-3-carbinol

IFPRI	International Food Policy Research Institute
ITC	Isotiocianatos
LPS	Lipopolissacarídeos
MAR	Resistência a múltiplos antibióticos
MAPK	Mitogênio p38
MBR	Bactérias multirresistentes
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MGE	Elementos genéticos móveis
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator nuclear kappa-chainenhancer de células B
ODMs	Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
WHO	World Health Organization
ONU	United Nations
PAF	Polipose adenomatosa familiar
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Peptidoglicano
QS	<i>Quorum sensing</i>
RAM	Resistência antimicrobiana
RNA	Ácido ribonucleico
RPS	Raphasatina
RTE	Alimentos prontos para o consumo
SFE	Sulforafeno

SFN	Sulforafano
TRAMP	Adenocarcinoma transgênico de próstata de camundongo
UWTPs	Estações de tratamento de águas residuais urbanas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
--------------------------	-----------

1.1 PRODUÇÃO DE BROTOS.....	14
1.1.1 Aumento no Consumo de Vegetais.....	15
1.1.4 Broto de Lentilha.....	18
1.1.5 Broto de Alfafa.....	18
1.1.6 Broto de Trevo.....	19
1.1.7 Broto de Girassol.....	20
1.2 SEGURANÇA ALIMENTAR.....	20
1.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....	22
1.3.1 Surtos Associados ao Consumo de Brotos.....	24
1.4 ANTIBIÓTICOS E MECANISMO DE AÇÃO.....	25
1.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	27
1.5.1 Impactos na Saúde Mundial.....	28
1.5.2 Mecanismo de Resistência.....	30
1.5.3 Genes de Resistência.....	32
1.6 RELEVÂNCIA DO ESTUDO A NÍVEL MUNDIAL.....	34
1.6.1 Escassez de Estudos.....	36
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 MÉTODOS.....	38
3.1 AMOSTRAS.....	38
3.2 MÉTODOS DE PRÉ-SELEÇÃO.....	38
3.3 AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	38
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	41
3.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	44
4 RESULTADOS.....	45
4.1 AMOSTRAS.....	45
4.2 RESISTÊNCIA NA ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO.....	45

4.3 RESISTÊNCIA FENOTÍPICA.....	45
4.4 COMPARATIVO DE RESISTÊNCIA FENOTÍPICA.....	47
4.5 RESISTÊNCIA GENOTÍPICA.....	49
4.6 DETECÇÃO DA FAMÍLIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	51
5 DISCUSSÃO.....	52
5.1 RESISTÊNCIA FENOTÍPICA.....	52
5.2 RESISTÊNCIA GENOTÍPICA.....	55
5.2.1 Integrons.....	55
5.2.2 Genes de resistência a tetraciclina.....	60
5.2.3 Genes produtores de β -lactamases.....	61
5.2.4 Legumes e frutas como reservatório de bactérias gram negativas β lactâmicas e resistentes à colistina.....	66
6 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUÇÃO DE BROTOS

Os brotos são definidos como sementes ou grãos germinados, contendo toda ou parte da semente, destinados ao consumo humano. Produtos de brotos são comumente consumidos crus em saladas e sanduíches ou em alimentos levemente cozidos (SYMES; GOLDSMITH; HAINES, 2015).

A brotação é uma resposta comum a danos nos tecidos de plantas lenhosas e é uma fonte de regeneração que contribui para a composição e desenvolvimento de ecossistemas florestais (BOND; MIDGLEY, 2001; DEL TREDICI, 2001). Os brotos podem ter uma vantagem competitiva em relação a outras fontes de regeneração, como sementes, ou menor reprodução em função da supressão em áreas recentemente perturbadas (VICKERS et al., 2011), visto que o crescimento inicial dos brotos é suportado por um sistema radicular baseado nos carboidratos produzidos (DEL TREDICI, 2001).

Em geral, a produção de brotos diminui à medida que o tamanho da árvore-mãe aumenta para os carvalhos de sequeiro (*Quercus* spp.) (WEIGEL; PENG, 2002). Notou-se que o surgimento desses carvalhos diminui com o aumento da idade da árvore-mãe e é menor em locais de baixo potencial produtivo (DEY; JENSEN, 2002; WEIGEL; PENG, 2002). Descobriu-se que práticas silviculturais, como a conservação de árvores após a colheita, exercem poucos efeitos sobre a produção de brotos, mas afetam potencialmente as taxas de sobrevivência e crescimento dos mesmos (DEY; JENSEN; WALLENDORF, 2008; KEYSER; ZARNOCH, 2014).

As preocupações com a segurança alimentar relacionadas ao consumo de brotos de sementes aumentaram após uma série de surtos de doenças transmitidas por alimentos associadas ao seu consumo (BUCHHOLZ et al., 2011). Na Austrália, levantamentos microbiológicos de brotos foram realizados na Austrália Ocidental em 2000 (DH, 2006) e em New South Wales em 2005, 2006 e 2008 (NFA, 2008), que revelaram baixas taxas (10%) de contaminação em brotos de sementes por microrganismos, incluindo *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*. Na Austrália, mais de 120 casos de salmonelose transmitida por alimentos foram associados ao consumo de brotos crus em 2005 e 2006. Globalmente, relatos de surtos associados a uma variedade de microrganismos e brotos de sementes são comuns, incluindo

Salmonella spp., *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (DECHET et al., 2014; ERDOZAIN et al., 2013).

1.1.1 Aumento no Consumo de Vegetais

Frutos de vegetais são considerados unanimemente saudáveis (KRINSKY; JOHNSON, 2005), mas os brotos (sementes e brotos germinados) são alguns dos mais valiosos do ponto de vista nutricional. Sabe-se que existem grandes diferenças em relação ao valor nutricional das sementes em relação aos brotos. Através da germinação, alimentos funcionais podem ser obtidos (MARTON et al., 2010), desta forma os brotos fornecem níveis elevados de nutrientes (MARTON et al., 2010; OMI; IMTIYAZ, 2014; PAJAK et al., 2014). Os brotos são ricos em fitoquímicos, vitaminas, minerais, enzimas e aminoácidos, tendo grande importância na saúde humana (MARTON et al., 2010). Por sua riqueza de nutrientes e sua alta taxa de conversão de compostos anorgânicos em compostos orgânicos, os brotos são considerados alimentos com adequadas concentrações de selênio. Este fato acontece especialmente nos países europeus, onde foi observada deficiência desse mineral e diferentes estratégias são seguidas para fortificar os alimentos (FRIAS et al., 2010). Existem numerosos estudos (FRIAS et al., 2010; MARTON et al., 2010; PAJAK et al., 2014) para suplementação de selênio em diferentes brotos (girassol, rúcula, trigo, cevada, aveia, alface, chá verde, trevo, tremoço e agrião).

A obesidade e doenças relacionadas, como diabetes e doenças cardiovasculares, são um problema de saúde crescente e grave nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (TZIUMIS; ADAIR, 2014). O consumo de plantas crucíferas (família *Brassicaceae*) tem sido associada a efeitos metabólicos benéficos, embora os mecanismos celulares e moleculares subjacentes ainda não tenham sido totalmente elucidados (BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013). *Brassicaceae* contém grandes quantidades de glucosinolatos (GLS), compostos bioativos que são hidrolisados enzimaticamente em vários produtos de decomposição, incluindo isotiocianatos (ITC). Foi demonstrado que o tratamento com indol-3-carbinol (I3C) e 3,31-diindolilmetano (DIM), produtos de hidrólise da glucobrassicina, diminuem significativamente os níveis de glicose no sangue em camundongos C57BL/6 que receberam uma dieta rica em gorduras (POORNIMA; MIRUNALINI, 2014).

Há evidências epidemiológicas que revelam que o consumo de brócolis e vegetais está associado a redução do risco de mortalidade por doença cardíaca coronária (GENKINGER et al., 2004; CORNELIS; EL-SOHEMY; CAMPOS, 2007). Sulforafano é encontrado naturalmente como precursor da glucorafanina em vegetais crucíferos pertencentes à família *Brassicaceae* (brócolis, couve-flor, couve chinesa e couve) (HANLON et al., 2009). A enzima mirosinase, encontrada inerentemente em plantas no intestino humano, é responsável pela conversão enzimática da glucorafanina na forma ativa de sulforafano (SHAPIRO et al., 1998).

Estudos *in vitro* revelaram que o sulforafano induz antioxidantes através da ativação do fator de transcrição Nrf2 (XUE et al., 2008; ZAKKAR et al., 2009). Os genes de defesa antioxidante induzidos após a translocação nuclear do Nrf2 incluem hemocoxigenase 1 (HO1), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), glutatona peroxidase (GPx) e tioredoxina (Trx) (EVANS, 2011). Estes têm importantes efeitos reguladores inflamatórios atenuando a ativação da proteína cinase ativada por mitogênio p38 (MAPK) (ISHII et al., 2009; JYRKKANEN et al., 2008). Além disso, estudos pré-clínicos demonstraram que o sulforafano suprime a inflamação inibindo a ativação do fator nuclear kappa-chainenhancer de células B ativadas (NF-κB) (ZAKKAR et al., 2009; KIM et al., 2012).

Os brotos constituem um segmento de mercado crescente nos países desenvolvidos. Seu consumo se tornou cada vez mais popular entre as pessoas que procuram dietas saudáveis (EBERT, 2012). Brotos de sementes são fontes valiosas de substâncias naturais, como vitaminas, aminoácidos, fibras, oligoelementos e compostos antioxidantes (MARTINEZ-VILLALUENGA et al., 2010; VIDAL-VALVERDE et al., 2002). A germinação melhora o valor nutricional das sementes, graças, entre outros fatores, ao maior teor de vitaminas, melhor qualidade das proteínas e maior digestibilidade (LINTSCHINGER et al., 2000). Portanto, os brotos são excelentes exemplos de alimentos funcionais, definidos como diminuir o risco de várias doenças e/ou exercer efeitos de promoção da saúde (PASKO et al., 2009).

A brotação, a fase de germinação de uma semente, é um mercado crescente para o uso da soja como um vegetal comestível e nutritivo. Culturas como soja, feijão mungo, alfafa são altamente adequadas para produção de brotos e consumo humano (SILVA et al., 2013). Os brotos podem ser preparados dentro de 5 a 7 dias a partir da germinação inicial e podem estar disponíveis como vegetais ao longo do ano (SILVA et al., 2013). Durante os estágios iniciais da germinação, várias alterações bioquímicas ocorrem dentro da semente. Por exemplo,

macro moléculas como proteínas, polissacarídeos e gorduras podem se decompor em oligopeptídeos e aminoácidos livres, monossacarídeos, oligossacarídeos e ácidos graxos, respectivamente (BAU et al., 1997). Esse processo inicia o acúmulo de vários metabólitos primários e aumenta o conteúdo geral de nutrientes disponíveis, melhorando assim o valor nutricional dos brotos.

Durante a germinação, ocorre a reativação do metabolismo das sementes, promovendo a hidrólise de proteínas e carboidratos de armazenamento e a síntese/acúmulo de metabólitos com propriedades promotoras de saúde. É devido a isso que a germinação está associada à melhoria no valor nutritivo das sementes (KHATTAK et al., 2008; MÁRTON; MANDÓKI; CSAPÓ, 2010; SHOHAG et al., 2012).

Os brotos possuem vários benefícios à saúde: 1) o processo de brotamento reduz o conteúdo de vários componentes desfavoráveis e antinutricionais, como inibidor de tripsina e ácido fítico, relacionados a problemas na digestão (DOBLADO et al., 2007), 2) os brotos contêm uma quantidade aumentada de alguns dos compostos bioativos que têm papel na proteção das células contra os danos causados pelos radicais livres (HOCHSTEIN; ATALLAH, 1988), 3) a brotação produz enzimas que auxiliam na digestão e 4) a brotação libera aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais que, de outra forma não estariam disponíveis para nutrição humana (GHANI et al., 2016).

Os brotos também são reconhecidos como ingredientes frescos e saudáveis, com baixo teor calórico, alta atividade biológica, conteúdo reduzido de componentes antinutricionais (por exemplo, ácido fítico e flatulência causados por oligossacarídeos), biodisponibilidade de micronutrientes (por exemplo, minerais vestigiais), melhor digestibilidade e características sensoriais (KHATTAK et al., 2008; LUO et al., 2013).

Os brotos são um dos mais completos e nutricionalmente benéficos de todos os alimentos. Seu valor nutricional foi descoberto pelos chineses há milhares de anos. Recentemente, nos Estados Unidos, numerosos estudos científicos sugerem a importância dos brotos em uma dieta saudável. Esse tipo de componente funcional dos alimentos tem sido associado à prevenção e/ou tratamento de pelo menos quatro das principais causas de morte nos Estados Unidos como, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e hipertensão e com a prevenção e/ou tratamento de outras doenças médicas, como osteoporose, defeitos do tubo neural e artrite reumatoide. Embora o uso de brotos como fonte de alimento para o homem

seja antigo, apenas nos últimos tempos que a ciência começou a desvendar o seu potencial para a nutrição humana e animal (HUSSAIN; MURTAZA, 2018).

No que diz respeito aos brotos de *Brassica*, os mesmos tornaram-se um alimento saudável e popular, recomendado devido ao seu baixo teor de gordura e riqueza em fitoquímicos promotores de saúde (HAGEN et al., 2009). Eles têm um alto valor nutritivo (BONES; ROSSITER, 2006) e dependem de uma produção simples e barata. O conteúdo de GLS de brotos de brassica pode ser dez vezes maior do que em vegetais maduros (FAHEY et al., 1997; MARTINEZ-VILLALUENGA et al., 2008). Os brotos também mostram predominância de GLS alifáticos (PÉREZ-BALIBREA et al., 2008), reconhecidos por sua ação na prevenção de carcinogênese, mutagênese e outras formas de toxicidade de eletrófilos e formas reativas de oxigênio (FAHEY et al., 1997).

1.1.2 Broto de Lentilha

As lentilhas (*Lens culinaris*) servem como uma valiosa fonte alimentar de proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas e fibras alimentares (ROCHFORD; PANOZZO, 2007), fornecendo nutrientes essenciais para diversas populações ao redor do mundo, especialmente os vegetarianos. Estudos sobre a capacidade antioxidante de lentilhas demonstraram seu excelente potencial de eliminação de radicais livres em sistemas *in vitro* como o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfônico) (ABTS), e radicais hidroxila (ALSHIKH; DE CAMARGO; SHAHIDI, 2015; YEO; SHAHIDI, 2015).

O valor nutricional das proteínas decorre do seu conteúdo e perfil de aminoácidos. Os principais aminoácidos essenciais das lentilhas são arginina, leucina e lisina, enquanto os principais não essenciais são o ácido glutâmico, o ácido aspártico e a serina (IQBAL et al., 2006). Além disso, as lentilhas também são fontes de proteínas vegetais para a produção de peptídeos bioativos (UDENIGWE; ALUKO, 2012), que podem exercer efeitos anti-hipertensivos, imunomoduladores e redutores de colesterol, bem como atividade antioxidante, antineoplásica e antimicrobiana (SHAHIDI; ZHONG, 2008).

1.1.3 Broto de Alfafa

A alfafa (*Medicago sativa*) é uma excelente forragem para leguminosas, com forte adaptabilidade, variedades diversas, longa história de cultivo, ampla distribuição,

produtividade estável, alto valor nutricional e gosto agradável. É rica em proteínas, gorduras, minerais, vitaminas e aminoácidos, adequados para a manutenção da saúde (VERGARABARBERÁN et al., 2015).

Segundo Bora e Sharma (2011), o extrato de alfafa é utilizado por suas atividades hepatoprotetoras e estrogênicas, além de ser usado como um poderoso medicamento para o tratamento de distúrbios estomacais. Contêm proteínas completas de alto valor biológico e são excelentes fontes naturais de ácidos graxos insaturados essenciais. Além disso, também são boas fontes de lecitina e vitaminas que ajudam na preservação da saúde e na prevenção do envelhecimento prematuro. Ainda, são fontes de minerais que desempenham um papel importante no rejuvenescimento das células e na prevenção do envelhecimento prematuro (DE; TULIPA, 2019).

1.1.4 Broto de Trevo

O trevo (*Trifolium repens*) exibe um polimorfismo mendeliano para a produção de cianeto de hidrogênio (HCN), em que as plantas produzem HCN (cianogênicas) ou não possuem capacidade de produzir HCN (acianogênicas) (HUGHES, 2001). O HCN é uma defesa química antiherbívora potente que reduz os danos causados por muitos herbívoros invertebrados e mamíferos (THOMPSON; JOHNSON, 2016; VIETTE; TETTAMANTI; SAUCY, 2000).

É valorizado por sua compatibilidade com espécies de gramíneas, fornecimento de alimentos de alta qualidade a ruminantes, fixação de nitrogênio atmosférico e aumento da qualidade do solo; mas é suscetível à seca sazonal (HOFMANN; CAMPBELL, 2011). Os compostos naturais conhecidos no trevo incluem os isoflavonóides, também conhecidos como fitoestrógenos, saponinas e glicosídeos cianogênicos. Os fitoestrogênios são compostos de plantas que têm atividade estrogênica e/ou antiestrogênica e podem causar anomalias reprodutivas no gado. As isoflavonas, daidzeína, genisteína e seus derivados de éter metílico demonstraram estar presentes em toda a planta, mas em concentrações muito baixas (MAZUR et al., 1998; WU; WANG; SIMON, 2003).

1.1.5 Broto de Girassol

O broto de girassol (*Helianthus annuus*) possui importantes compostos com atividades farmacológicas. Dentre esses compostos, destacam-se os fenólicos, como o ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cafeoilquinóico, glucósido, glucopiranosídeo, cinarina, ácido gálico, protocatecuico, cumarico, ácido ferúlico e ácidos sinápicos (AMAKURA et al., 2014; PAJAK et al., 2014). Quanto aos flavonoides, vários flavonóides isolados desta planta foram encontrados como helianone, quercetina, kaempferol, luteolina, apigenina (KAMAL, 2011). Os pigmentos do girassol são clorofila, caroteno e xantofila (ALDA et al., 2011) e a composição de ácidos graxos dos cotilédones é o ácido linoléico, palmítico, esteárico e oleico (BACZEK-KWINTA; SALA, 2012; LEE et al., 2010). Contém uma alta concentração de vitamina A, B, C e E e também niacina e os minerais desta planta são cálcio, ferro, magnésio, fósforo, potássio, selênio e zinco (BLICHARSKA et al., 2014).

Em uma revisão, Saini e Sharma (2011) descreveram os usos tradicionais do broto de girassol como alimento e fonte de diferentes tratamentos para doenças. É usado como antienvhecimento, antidiabético (SAINI; SHARMA, 2013), atividade antimicrobiana e antioxidante (IBRAHIM; AJONGBOLO, 2014). Também foram usadas outras partes desta planta na prevenção de doenças hepáticas (VASAVI et al., 2014), nefrolitíase (KHAN; SHINGE; NAIKWADE, 2010) e doenças cardíacas (FEI et al., 2015).

1.2 SEGURANÇA ALIMENTAR

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) afirma que segurança alimentar existe quando todas as pessoas, em todos os momentos, possuem acesso a alimentos suficientes, seguros e nutritivos para satisfazer suas necessidades de uma vida ativa e saudável (FAO, 2005). Garantir a segurança para comida futura é considerada uma prioridade global (NACMCF, 2000; IFPRI, 2002). Na virada do milênio, 191 nações formalizaram seus compromissos com os oito Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODMs), um dos quais era reduzir a pobreza e a fome em 50% até 2015 (SOFI, 2005). Existem mais de 800 milhões de pessoas sem acesso suficiente a alimentos (SOFI, 2005) e embora mais de 40% dos africanos não consigam garantir uma alimentação adequada no dia-a-dia, muitas pessoas, tanto no mundo desenvolvido quanto em desenvolvimento, sofrem de obesidade (GARDNER; HALWEIL, 2000).

A segurança alimentar é um desafio que só pode ser cumprido ao abordar vários problemas relevantes. Os Relatórios anuais sobre a insegurança alimentar da FAO, Relatórios do Instituto Internacional de Pesquisa sobre Políticas Alimentares (IFPRI) e o Projeto de Desenvolvimento do Milênio da ONU destacam que a insegurança alimentar é uma consequência de numerosos fatores interligados, incluindo doenças frequentes, falta de saneamento básico, acesso limitado a água potável e falta de poder de compra (FAO, 2005; BRAUN; SWAMINATHAN; ROSEGRANT, 2004; SOFI, 2005).

A sociedade precisa garantir a segurança alimentar local e global, ou seja, disponibilidade, acesso e utilização de alimentos, e estabilidade dos três primeiros (FAO, 2014). Para apoiar a disponibilidade de alimentos, a produção agrícola tem aumentado nas últimas décadas, o abandono as práticas tradicionais de apoio aos serviços ecossistêmicos (ES) e substituindo-as por insumos externos. Até o momento, essa abordagem foi bem sucedida em atender às crescentes demandas globais por alimentos, rações e fibras, mas também exigiu custos ambientais. Por exemplo, os insumos lixiviados degradam o meio ambiente e colocam em risco bens públicos, como água limpa (TILMAN et al., 2001).

Dois dos efeitos mais severos da agricultura intensiva são o grande impacto nos ciclos bioquímicos e hidrológicos da Terra, que causaram uma cascata de efeitos que contribuem para as mudanças climáticas, degradação dos ecossistemas aquáticos e problemas de saúde humana (GALLOWAY et al., 2008; BOUWMAN et al., 2013). Mesmo na presença de disponibilidade suficiente de alimentos, esses efeitos podem afetar negativamente a segurança alimentar ao restringir o acesso tanto à comida devido à redução de renda quanto à utilização de alimentos devido à disponibilidade reduzida de água potável. A agricultura é, além disso, a principal causa da perda de biodiversidade terrestre (MAXWELL et al., 2016), principalmente da expansão agrícola, mas também como resultado de sua intensificação (KEHOE et al., 2017).

A perda de biodiversidade é, por sua vez, um importante fator de mudança nos ecossistemas (HOOPER et al., 2012). A agricultura intensiva também pode impactar negativamente a própria produção agrícola. A plantação de grãos se estabilizaram ou até diminuíram em regiões-chave (RAY et al., 2012), em parte devido ao cultivo com poucas colheitas em rotações curtas (BENNETT et al., 2012) e ao manejo inadequado de ES associado à fertilidade do solo e proteção de plantas (SETTLE et al. 1996; FOLEY et al.,

2005). Até mesmo a mera possibilidade de agricultura está ameaçada. A erosão do solo causada pela agricultura intensiva é um problema grave em várias áreas (PIMENTEL et al., 1995) e a mudança climática deve impactar negativamente a produção agrícola e sua estabilidade (CHALLINOR et al., 2014; LOBELL; TEBALDI, 2014).

1.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Produtos frescos como folhas de salada verde são reconhecidos como uma parte importante de uma dieta saudável, e seu consumo na União Europeia e nos Estados Unidos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, tornando este produto importante para a saúde humana (REKHY; MCCONCHIE, 2014; WANG et al., 2014). As folhas de salada (alfaces e espinafres), devido ao seu alto teor de água, são altamente perecíveis e sujeitas a um rápido desperdício causado por micróbios endógenos e exógenos e, portanto, exigem processamento rápido e embalagem especializada (OLAIMAT; HOLLEY, 2012). Salada de folhas também estão sujeitas à colonização por patógenos entéricos, como a *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (OLAIMAT; HOLLEY, 2012; SCHIKORA; GARCIA; HIRT, 2012; BERGER et al., 2010) e o perfil epidemiológico classifica as saladas como sendo a segunda fonte mais comum de surtos de intoxicação alimentar (OLAIMAT; HOLLEY, 2012; CROWE et al., 2015; CALLEJON et al., 2015).

Com base em investigações experimentais, parte da explicação pode ser que normalmente patógenos associados a animais podem, através de sua presença em solos, diretamente internalizar folhas de salada durante a germinação de sementes, entrando na vasculatura das plantas, possivelmente através dos pelos radiculares (BRANDL, 2006).

A colheita envolve o corte de folhas de caules, aparas, lavagem, embalagem, e transporte (OLAIMAT; HOLLEY, 2012). Pensa-se que a contaminação de produtos de saladas frescas ocorre através de rotas tais como contato com animais ou insetos, solo, irrigação contaminada, águas de lavagem, equipamentos não higienizados e manipulação humana. Práticas projetadas para reduzir crescimento de patógenos em produtos frescos de saladas incluem refrigeração após a colheita e processamento e embalagem em atmosfera modificada contendo níveis reduzidos de oxigênio (OLAIMAT; HOLLEY, 2012; EFSA, 2013).

As estimativas do número total de episódios de doenças transmitidas por alimentos são úteis para alocar recursos e priorizar intervenções. No entanto, chegar a essas estimativas é desafiador porque os alimentos podem ser contaminados por muitos agentes, por exemplo, uma variedade de bactérias, vírus, parasitas e produtos químicos, a transmissão pode ocorrer por mecanismos não alimentares através do contato com animais ou consumo de água contaminada. Além disso, a proporção de doenças transmitidas por alimentos difere pelo patógeno e pelos fatores do hospedeiro, e apenas uma pequena porção das doenças é confirmada por testes laboratoriais e relatada aos órgãos de saúde pública (SCALLAN et al., 2011).

A vigilância baseada em laboratório fornece informações cruciais para a avaliação dos alimentos e a respeito das respectivas doenças. No entanto, como apenas uma pequena porção das doenças é diagnosticada e relatada, avaliações periódicas do total de episódios de doença também são necessárias. Vários países realizaram estudos prospectivos baseados na população ou transversais para suplementar a vigilância e estimar o número total de doenças transmitidas por alimentos (FLINT et al., 2005). Em 2007, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou uma iniciativa para estimar o número global de doenças transmitidas por alimentos (KUCHENMULLER et al., 2009). Em 1999, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) forneceram estimativas abrangentes de doenças transmitidas por alimentos, hospitalizações e mortes nos Estados Unidos causadas por agentes conhecidos e desconhecidos (MEAD et al., 1999).

A segurança alimentar não é simples. Apesar das inúmeras campanhas de informação sobre segurança alimentar e esforços educacionais, aliado à décadas de microbiologia exploratória, a doença transmitida por alimentos continua sendo uma fonte de doença humana (GRIFFITH, 2006; JACOB; MATHIASSEN; POWELL, 2010). Falhas de segurança alimentar têm atraído atenção resultando em contaminação da população (HALLMAN; CUIE; HOOKER, 2009; DE JONGE et al., 2008). Segundo a OMS, todos os anos, pelo menos 600 milhões de pessoas no mundo adoecem e 420 mil morrem depois de ingerirem alimento contaminado (ONU, 2019).

Nas últimas décadas, o *United States Department of Food Inspection Service - Food Security* (USDA-FSIS), a *Food and Drug Administration - Food Security and Applied Nutrition Center* (FDA-CFSAN), e os departamentos estaduais e municipais de saúde

intensificaram a regulamentação e a aplicação da segurança alimentar bem como a inspeção da produção e distribuição de alimentos. Durante este período de tempo, o USDA-FSIS e a FDA-CFSAN também lançaram e prescreveram diversos sistemas de gestão de segurança alimentar, incluindo o Sistema de Análise de Pontos Críticos de Controle (APPCC) (NACMCF, 2000).

Com os avanços da tecnologia, técnicas mais novas e mais sofisticadas (voltada para aumentar a vida útil dos alimentos e eliminar ou prevenir a deterioração e/ou o crescimento de microrganismos patogênicos) continuam a ser desenvolvidas. Dois documentos publicados pela *Foodborne Diseases Active Surveillance Network* mostraram que *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Cryptosporidium* e a toxina Shiga da *Escherichia coli* (STEC) O157 continuam sendo as principais causas do número e incidência de infecções transmitidas por alimentos confirmadas laboratorialmente nos Estados Unidos (CDC, 2005; 2008).

Segundo o CDC, surtos menores, especialmente os que ocorrem dentro de um estado, são improváveis que sejam relatados a autoridades de saúde pública (CDC, 2009). Surtos que não causam doença grave, hospitalização ou morte, ou aqueles que não resultam em pacientes com sintomas desenvolvidos rapidamente também são improváveis de serem relatados a autoridades de saúde pública (CDC, 2009).

As tendências que afetam a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos incluem, mas não estão limitadas a, grande escala de produção e ampla distribuição de alimentos, a globalização do fornecimento de alimentos, o ato de comer fora de casa, a diversificação genômica microbiana, e por fim, a emergência de novos patógenos (NYACHUBA, 2010).

1.3.1 Surtos Associados ao Consumo de Brotos

Surtos de infecção transmitida por alimentos associados ao consumo de brotos não são raros. Os brotos de feijão são alimentos de alto risco e a contaminação geralmente começa com sementes contaminadas e o surgimento é desencadeado com a incubação a alta umidade, condições ideais para a multiplicação bacteriana (PENNINGTON, 2011).

Brotos de rabanete na cidade de Sakai, Japão, resultaram em 2764 casos confirmados (MICHINO et al., 1999). A *E. coli* O157: H7 sempre foi a principal responsável por surtos associados a produtos de carne bovina (CDC, 2010a; CDC, 2010b; GREENLAND et al.,

2009; STIRLING et al., 2007), no entanto, ela também foi associada com surtos em vegetais de folhas verdes (CDC, 2011; FRIESEMA et al., 2008).

A partir de maio de 2011, uma única cepa de *E. coli* encontrada em brotos infectou pessoas no norte da Alemanha, seguida por um surto semelhante na França um mês depois (JANSEN; KIELSTEIN, 2011). As infecções por *Escherichia coli* são relatadas com frequência (cerca de 800 por ano na Alemanha) entretanto, o surto de *E. coli* no país em 2011 mostrou, como uma forma específica de *E. coli* pode afetar um grande número de pessoas e resultar em um elevado número de mortes. Entre maio e junho de 2011, a *E. coli* afetou um total de 4321 pacientes e causou 53 mortes (GAULT et al., 2011).

Casos relatados em outros países tinham histórico recente de viagens ao norte da Alemanha (FRANK et al., 2011). Após investigações intensas e árduas, os pesquisadores determinaram a cepa do surto como *Escherichia coli* O104: H4, produtora de toxinas Shiga associada a vegetais. Casos anteriores de sorotipo *E. coli* O104 foram relatados na Coreia em 2005 (BAE et al., 2006), Alemanha em 2001 (MELLMANN et al., 2008) e Estados Unidos em 1995 (CDC, 1995). Também havia informações não publicadas relatando casos semelhantes na Geórgia em 2009, um na França em 2004 e um na Finlândia em 2010 (SCHEUTZ et al., 2011).

1.4 ANTIBIÓTICOS E MECANISMO DE AÇÃO

Antimicrobianos são compostos que podem inibir ou destruir o crescimento de microrganismos, como as bactérias, os vírus, os protozoários, as microalgas e os fungos. Os antibióticos são um tipo de antimicrobiano e são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias (BRANDT et al., 2015).

Quando estes agentes são originalmente produzidos por espécies de microrganismos, portanto de origem natural, são denominados antibióticos. Quando são produzidos de formas sintéticas, denominam-se quimioterápicos (FONSECA, 1991). Alguns antibióticos são usados para outros usos terapêuticos, como drogas anticâncer (por exemplo, actinomicina D, antraciclina, bleomicina, mitosanos, antracenos, enediyne e epotilonas) ou pesticidas (como oxitetraciclina e estreptomicina) (DEMAIN; SANCHEZ, 2009; CARS; MOLSTAD, 2001).

Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003). Antibióticos naturais geralmente apresentam estruturas químicas complexas importantes para as interações específicas e reconhecimento de alvos macromoleculares em bactérias patogênicas (WALSH, 2003).

Os antibióticos que estão em uso são moléculas naturais, sintéticas e semi-sintéticas. Antibióticos naturais são produzidos por bactérias e fungos para inibir ou matar microrganismos competidores, com efeito bacteriostático ou bactericida. Compostos semi-sintéticos são antibióticos naturais quimicamente alterados pela inserção de um aditivo dentro da formulação do medicamento, que melhora sua eficácia (GRENNI; ANCONA; CARACCILO, 2018).

Os antibióticos são moléculas complexas que podem ter diferentes grupos funcionais dentro de suas estruturas e podem ser divididos em diferentes categorias, com base em seu mecanismo de ação: a inibição da síntese da parede celular, alteração das membranas celulares, inibição da síntese proteica, inibição da síntese de ácidos nucleicos e antagonismo metabólico ou anti-competitivo (KÜMMERER, 2009). Após a administração, eles são apenas parcialmente metabolizados e, portanto, uma grande quantidade é excretada inalterada ou como metabolitos ativos através da urina e fezes (KEMPER, 2008).

Um antimicrobiano ideal, conforme Fonseca (1991), exerceria sua função lesando apenas o microrganismo invasor, sem causar dano ao hospedeiro. Seria, portanto, uma substância dotada de elevado parasitotropismo e baixo ou nenhum organotropismo. Em outras palavras, apresentaria toxicidade seletiva em relação ao parasita, sendo inofensiva para o hospedeiro. Um antibiótico ao atuar sobre um microrganismo que lhe seja sensível pode provocar dois tipos de efeitos: a parada de seu crescimento e conseqüentemente da reprodução ou a sua morte (FUCHS et al., 2004).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas entre outros). Os

antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (PUPO et al., 2006; ABRANHAM, 2003).

1.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Antibióticos são usados para tratamento ou prevenção de infecções bacterianas. Desde que a penicilina foi introduzida em terapia médica em 1942, centenas de outros antibióticos foram isolados ou sintetizados para o tratamento de infecções humanas e animais. Os antibióticos desempenharam um papel significativo no aumento da expectativa de vida testemunhada na segunda metade do século XX. Transformaram as modernas indústrias agropecuárias, a qual utilizaram antibióticos no tratamento de infecções e como profilaxia a fim de melhorar a eficiência do gado, tornando-o mais saudável (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

O uso excessivo e indevido de antibióticos estimulou a emergência de bactérias resistentes a antibióticos (ARBs) e genes de resistência a antibióticos (ARGs), reduzindo o seu potencial terapêutico contra os patógenos de animais (WRIGHT, 2010). A OMS caracteriza a resistência antimicrobiana como uma crise global de saúde pública que deve ser gerenciado com a máxima urgência (WHO, 2015).

O problema é particularmente agudo na China por conta dos fortes incentivos para a prescrição excessiva e uso difundido e indevido de doses sub-terapêuticas de antibióticos na agricultura (YEZLI; LI, 2012). Bactérias multirresistentes (MBRs), ou "superbactérias", que são resistentes a vários antibióticos diferentes tem sido relatadas no país e tais bactérias anteriormente relatadas na China estão a serem vistas causando infecções em outros países (QIAO et al., 2018).

Liu e colaboradores (2016) relataram o surgimento do primeiro mecanismo de resistência à colistina mediada por plasmídeo, MCR-1, de *Escherichia coli* em suínos e humanos em 2015. Na época, declarou a crença de que o gene está "atualmente confinado à China". No entanto, desde então, os cientistas descobriram o gene MCR-1 em todos os países. Os genes adicionais de resistência à colistina, MCR-2 e MCR3, e variantes desses genes também surgiram e se espalharam.

A resistência a antibióticos é uma preocupação de saúde crescente e multifacetada que resulta no aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes e no aumento dos custos

financeiros dos sistemas de saúde (O'NEILL, 2016a). As ARBs são encontradas em humanos, diversos hospedeiros animais e no meio ambiente. Cada um desses reservatórios contribui para a epidemiologia da resistência aos antibióticos (HOLMES; MOORE; SUNDSFJORD, 2016; MARSHALL; LEVY, 2011; ROBINSON; BU; CARRIQUE-MAS, 2016). Muitas revisões, metanálises e estudos observacionais avaliaram os direcionadores do surgimento e transmissão deste problema (HOLMES; MOORE; SUNDSFJORD, 2016; MARSHALL; LEVY, 2011). O uso excessivo de medicações, bem como a falta de aplicação de medidas eficazes de prevenção e controle de infecção são fatores-chave bem estabelecidos para este problema (O'NEILL, 2016b; ALLEGRANZI, 2016).

1.5.1 Impactos na Saúde Mundial

A resistência a antibióticos é relatada quando um medicamento perde sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano de forma eficaz. As bactérias tornam-se "resistentes" e continuam a multiplicar-se na presença de níveis terapêuticos dos antibióticos. Bactérias, quando se replicam mesmo na presença dos antibióticos, são chamadas de bactérias resistentes (O'NEIL, 2016b).

Os antibióticos são citotóxicos ou citostáticos para os microrganismos, permitindo que as defesas naturais do corpo, como o sistema imunológico, os eliminem. Eles frequentemente atuam inibindo a síntese de uma célula bacteriana, síntese de proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), por um agente desorganizador de membrana, ou outras ações específicas. Os antibióticos também podem entrar na parede celular da bactéria ligando-se a eles, usando os mecanismos de transporte dependentes de energia nos sítios ribossômicos, o que leva subsequentemente à inibição da síntese de proteínas (LEVY; MARSHALL, 2004).

A resistência a um antibiótico se desenvolve rapidamente e, portanto, é uma grande preocupação (LEVY, 1998). Com o aprimoramento da tecnologia, mais pessoas estão cientes dos malefícios causados pela resistência aos medicamentos disponíveis, no entanto, poucos tomam medidas proativas para conter a resistência ao não usar tais medicamentos. No mundo em desenvolvimento, quase todos os antibióticos estão disponíveis sem receita médica e podem ser comprados sem qualquer prescrição médica, que é um dos fatores mais importantes para causar sua resistência (GRIGORYAN; BURHERHOF; HAAJER-RUSKAMP, 2007).

Os antibióticos geralmente são eficazes, mas quando os microrganismos se tornam menos sensíveis ou mais resistentes, requer uma concentração maior do que a concentração normal do mesmo medicamento para obter-se um efeito. O surgimento de resistência antimicrobiana foi observado logo após a introdução de novos compostos antimicrobianos (CHADWICH; GOODE, 2007). Resistência aos antibióticos pode ocorrer como um processo de seleção natural, onde a natureza capacita todas as bactérias com algum grau de resistência de baixo nível (LEVY, 1992).

Desde a introdução em 1937 dos primeiros antimicrobianos eficazes, os microrganismos desenvolveram mecanismos específicos de resistência as sulfonamidas que tem afetado seu uso terapêutico. A resistência à sulfonamida foi originalmente relatada no final da década de 1930 e os mesmos mecanismos operam cerca de 90 anos depois (CHOPRA; ALDERBORN; PODCZECK, 2002).

Antibióticos agem para eliminar bactérias. Assim, as bactérias tendem a ter um processo natural que estimula sua resistência. Esse processo ocorre por meio de mutações nos genes (LAXMINARAYAN; BROWN, 2001). Antibióticos induzem pressão seletiva e os genes atuam em associação com pressão seletiva. As bactérias possuem a qualidade de transferir diretamente o material genético entre si através da transferência de plasmídeos, o que significa que a seleção natural não é o único mecanismo pelo qual a resistência evolui. Antibióticos de amplo espectro são prescritos em hospitais como uma solução para infecções nosocomiais no entanto, aumentam sua resistência (LOWY, 2003).

Os organismos resistentes não são apenas uma preocupação de laboratório, mas tornaram-se uma ameaça global responsável pelo elevado número de mortes e infecções potencialmente fatais (LIPP; HUG; COLWELL, 2002). As consequências dessas infecções são agravadas enormemente em situações variáveis, como violência, fome e desastres naturais. A OMS (2017) advertiu que uma era pós-antibiótico resultará em infecções frequentes e que pequenas lesões poderão resultar em morte caso não se consiga agir contra esse problema, isto é, bactérias multirresistentes causando mais mortes em todo o mundo. Mais de 25.000 pessoas morrem todos os anos por conta da resistência antibiótica na União Europeia. Na Tailândia a resistência causa mais de 38.000 mortes anualmente e nos Estados Unidos esse número ultrapassa 23.000 mortes no ano. Na Índia, mais de 58.000 bebês morrem

em um ano como resultado da infecção devido à resistência bacteriana, as vezes, herdada de suas mães (CDC, 2017).

Estimativas preocupantes demonstram que as mortes desencadeadas por resistência à antimicrobianos podem alcançar o número de 10 milhões de mortes em 2050, ultrapassando outras causas significativas de morte, a exemplo do diabetes, câncer e até mesmo acidentes de trânsito (VENTOLA, 2015). Para colocar esse número em perspectiva, atualmente, pelo menos 700.000 pessoas morrem de infecções resistentes a cada ano em todo o mundo, mais do que o número combinado de mortes causadas por tétano, cólera e sarampo. Esse fardo também não está muito atrás da mortalidade devido a aflições comuns, como doenças diarreicas ou diabetes (ISDA, 2011).

Tem sido uma prática padrão para a maioria das empresas farmacêuticas distribuir antibióticos que podem não ser mais eficazes ou sem aprovação regulamentar (CHOPRA; ALDERBORN; PODCZECK, 2002). Evidências mostram que o aumento do uso de antibióticos pode resultar em uma associação positiva com uma maior prevalência de microrganismos resistentes, enquanto o uso reduzido de antibióticos mostrou menores taxas de resistência. Há evidências claras de que os pacientes historicamente tratados com antibióticos são mais propensos a terem resistência. Além disso, a re-administração desses medicamentos do ciclo inicial acelera os mecanismos de resistência (LAXMINARAYAN; BROWN, 2001).

1.5.2 Mecanismo de Resistência

Antibióticos sustentam a medicina moderna. Seu uso reduziu a mortalidade infantil e aumentou a expectativa de vida, sendo cruciais para cirurgias invasivas e tratamentos como a quimioterapia. No entanto, o número de infecções causadas por bactérias multirresistentes está aumentando globalmente, e o espectro de infecções intratáveis está se tornando uma realidade. Os relatórios mais recentes do *Global Economic Forum* do *World Economic Forum* listaram a resistência aos antibióticos como uma das maiores ameaças à saúde humana (WALKER; FOWLER, 2011; WEF, 2013; 2014). Estima-se que na Europa 25.000 pessoas morram a cada ano como resultado de infecções bacterianas multirresistentes e que isso custa à economia da União Europeia 1.5 bilhões de euros anualmente (WALKER; FOWLER, 2011). Nos Estados Unidos, mais de 2 milhões de pessoas são infectadas com bactérias

resistentes a antibióticos anualmente, com 63.000 mortes como resultado direto (WHO, 2014). Além do aumento da resistência aos agentes existentes, há falta de desenvolvimento de novos antibióticos (HAMPTON, 2013).

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antibióticos, mas também podem adquirir resistência por meio de mutações em genes cromossômicos e por transferência horizontal de genes. A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana a um antibiótico específico é a capacidade de resistir à ação desse antibiótico, como resultado de características estruturais ou funcionais inerentes. O exemplo mais simples de resistência intrínseca em uma espécie individual resulta da ausência de um alvo suscetível de um antibiótico específico. Um exemplo disso refere-se ao lipopeptídeo daptomicina (aprovada pela primeira vez para uso clínico em 2003), que é ativa contra bactérias Gram-positivas, mas não é eficaz contra bactérias Gram-negativas. Isto é devido a uma diferença intrínseca na composição da membrana citoplasmática (BLAIR et al., 2015).

As bactérias Gram-negativas têm uma porção menor de fosfolipídios aniônicos na membrana citoplasmática do que bactérias Gram-positivas, o que reduz a eficiência da inserção mediada por Ca^{2+} da daptomicina na membrana citoplasmática, que é necessária para sua atividade antibacteriana (RANDALL et al., 2013). A resistência intrínseca de algumas bactérias Gram-negativas a muitos compostos é devido a uma incapacidade destes agentes atravessarem a membrana externa: por exemplo, o antibiótico glicopeptídeo vancomicina inibe a reticulação de peptidoglicano por ligação aos peptídeos alvo d-Ala-d-Ala, mas só é normalmente eficaz em bactérias Gram-positivas. Isso ocorre em função dos organismos Gram-negativos não poderem atravessar a membrana externa e acessar esses peptídeos no periplasma (TSUCHIDO; TAKANO, 1988).

Estudos têm levado à identificação de muitos genes responsáveis pela resistência intrínseca a antibióticos de diferentes classes, incluindo β -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Isto foi conseguido usando telas de alta produtividade de bibliotecas mutantes de genoma que foram criadas por inserção direcionada ou mutagênese por transposon aleatório em bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O rastreamento quanto à suscetibilidade a antibióticos identificou possíveis novas combinações de drogas nas quais um agente pode inibir um mecanismo

intrínseco de resistência e assim aumentar o espectro de atividade de outros antibióticos além das espécies-alvo normais (BLAKE; O'NEILL, 2013; LIU, 2010).

A compreensão da base genética da resistência bacteriana intrínseca e, conseqüentemente, do espectro de atividade de um antibiótico, pode, portanto, orientar o desenvolvimento de novas combinações de agentes com atividade aprimorada ou expandida contra espécies-alvo. Vários estudos identificaram sinergias *in vitro* entre combinações não convencionais de antibióticos que podem ser usadas para atacar patógenos particularmente problemáticos, como *Acinetobacter baumannii* e *Neisseria gonorrhoeae* (BARBEE et al., 2014; PRINCIPE, 2013).

Além da resistência intrínseca, as bactérias podem adquirir ou desenvolver resistência aos antibióticos. Isso pode ser mediado por vários mecanismos, que se dividem em três grupos principais: primeiro, aqueles que minimizam as concentrações intracelulares do antibiótico, como resultado da penetração deficiente na bactéria ou do efluxo de antibióticos; segundo, aqueles que modificam o alvo antibiótico por mutação genética ou modificação pós-traducional do alvo; e terceiro, aqueles que inativam o antibiótico por hidrólise ou modificação (BLAIR et al., 2015).

1.5.3 Genes de Resistência

A transferência horizontal de genes (HGTs) é um dos principais impulsionadores da disseminação de ARGs no ambiente (STEVENSON et al., 2017). Entre as três vias de HGTs, conjugação, transformação e transdução, a conjugação é a rotina mais dominante (VON WINTERSDORFF et al., 2016).

A conjugação é a transferência de DNA entre as bactérias doadoras e receptoras, que é realizada por contato físico direto célula-a-célula através de uma ponte de pilina gerada pela célula doadora (CHEE-SANFORD et al., 2009; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000). Geralmente, a frequência da conjugação é muito baixa, entretanto, quando há antibióticos no ambiente, especialmente em concentrações menores que a concentração mínima de inibição, participam como direcionadores seletivos nos processos de conjugação (ANDERSSON; HUGHES, 2014). Além disso, a transferência conjugativa de DNA pode ocorrer dentro ou através de gêneros bacterianos, embora estes últimos possam ocorrer com menos frequência (OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000).

Uma visão comum é que a resistência aos antibióticos pode emergir de ambientes hospitalares e muitos outros estudos centraram-se na disseminação de resistência a antibióticos em ambientes clínicos. No entanto, existe evidência crescente de que vários ecossistemas e, em particular, as estações de tratamento de águas residuais (ETARs) estão a comportar-se como reservatórios cruciais para as bactérias resistentes aos ARBs e ARGs (ZHANG; ZHANG; FANG, 2009). Surpreendentemente, foi documentado que mais ARBs e ARGs são detectados em áreas residenciais, em oposição àquelas detectadas em águas residuais hospitalares (LI et al., 2015).

As estações de tratamento de águas residuais urbanas (UWTPs) receberam muita atenção como principais receptores de ARBs, ARGs (RIZZO et al., 2013) e resíduos de antibióticos nesses ambientes (MICHAEL; RIZZO; MCARDELL, 2013). Sua capacidade de remover ARBs e ARGs também foi largamente discutido e demonstrado (MANAIA et al., 2016; WU; DOLFING; XIE, 2018).

No entanto, a maioria dos autores concorda que as cargas ARB e ARG liberadas por UWTPs em bom funcionamento podem ainda ter um impacto negativo no ambiente, com sérias implicações para a saúde humana (BERENDONK et al., 2015). Embora seja consensual que é importante melhorar os processos de tratamento de águas residuais, a fim de maximizar a remoção de ARBs e ARGs, não se sabe muito sobre as melhores estratégias para alcançar tal objetivo (BERENDONK et al., 2015; MANAIA et al., 2016).

Embora a desinfecção de águas residuais possa promover a redução das cargas microbianas totais e das concentrações bacterianas, pode criar as condições perfeitas para o crescimento de certos grupos de bactérias (MANAIA et al., 2016; MOREIRA et al., 2018). A manutenção ou propagação da resistência a antibióticos durante o tratamento de águas residuais pode ser devida a duas forças motrizes principais, a transferência de genes horizontal ARG e/ou a sobrevivência ou seleção de ARB (BERENDONK et al., 2015).

Supõe-se que o entendimento de quais grupos bacterianos são os principais veículos de disseminação, apontando uma boa estratégia para reconhecer indicadores bacterianos adequados de ARGs que sobrevivem ao tratamento. Este reconhecimento poderia ser a base para gerenciar os processos de tratamento de águas residuais, a fim de maximizar a redução ou eliminar esses grupos bacterianos (FERNANDES; VAZ-MOREIRA; MANAIA, 2019).

1.6 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Nas últimas décadas, um interesse crescente em relação às implicações da dieta e atividade física na saúde ocorreu na sociedade. Esse interesse reside na expansão da expectativa e na melhoria da qualidade de vida, o que levou a intervenções baseadas na incorporação de novos alimentos saudáveis na dieta humana. Prevê-se que esses novos alimentos constituam uma fonte valiosa de nutrientes bioativos, que contribuiriam para atrasar o aparecimento de várias doenças crônicas e incapacitantes, além de reduzir sua incidência e gravidade. Nesse sentido, os consumidores estão exigindo uma gama diversificada de alimentos que ofereçam benefícios à saúde e contribuam para o bem-estar. Para a concretização desse objetivo, uma ampla gama de plantas, culturas e alimentos tem sido estudada e caracterizada ao longo das últimas décadas em relação ao seu potencial de exercer efeitos sobre a saúde, de acordo com seu conteúdo nutricional e composição fitoquímica bioativa (GAN et al., 2017).

Nesse sentido, os brotos representam uma fonte valiosa de diversos micronutrientes (vitaminas, glucosinolatos). Devido a essa composição, os brotos comestíveis são um veículo valioso e uma oportunidade de impactar a saúde, fornecendo compostos bioativos benéficos, uma vez incorporados na dieta regularmente. Do ponto de vista comercial, está disponível um amplo espectro de brotos e sementes, incluindo, entre outros, soja, alfafa, brócolis, rabanete, trevo, lentilha e ervilha. Esse tipo de produto fresco está ganhando interesse, não apenas no campo da culinária gourmet ou na nutrição (por exemplo, vegetarianos e consumidores preocupados com a saúde), mas também (e conseqüentemente) na indústria de alimentos, impulsionada pelo interesse em brotos como uma fonte de nutrientes e metabólitos secundários saudáveis com um tempo de produção muito curto (5 a 10 dias, dependendo das espécies ou variedades) (CONZATTI et al., 2015).

O consumo de frutas e vegetais frescos é considerado uma estratégia eficiente na prevenção de uma série de doenças da como câncer, obesidade e doenças cardiovasculares (BERGER et al., 2010; HOORFAR, 2014). O câncer de próstata é o segundo câncer diagnosticado com mais frequência entre os homens em todo o mundo e é uma das principais causas de mortes relacionadas ao câncer nos Estados Unidos (SIEGEL; MOLEIRO; JEMAL, 2017). A doença é tipicamente de crescimento lento, e embora anormalidades no epitélio da próstata possam ser observadas em homens na faixa dos vinte ou trinta anos, o câncer de

próstata geralmente pode vir a se tornar uma preocupação clínica até mais tarde na vida (HAAS et al., 2008).

O longo período de latência do câncer de próstata sugere que estratégias terapêuticas que retardam a progressão da doença podem ser benéficas, retardando o início completo da doença e possivelmente diminuindo os procedimentos cirúrgicos invasivos, como a prostatectomia. Aumentar o período de latência do câncer de próstata também pode ser benéfico, aumentando o período de tempo durante o qual uma intervenção terapêutica pode ocorrer (HAAS et al., 2008).

No que se refere ao câncer de colorretal (CRC), este é uma das principais causas de mortalidade relacionadas ao câncer em todo o mundo. É o terceiro câncer mais comum em homens (aproximadamente 10% do total de casos de câncer) e o segundo em mulheres (9% do total de casos de câncer). As taxas mais altas estimadas estão na Austrália, Nova Zelândia, Canadá, Estados Unidos e partes da Europa e as mais baixas na África Ocidental, China, Índia e América do Sul, e projeta-se um aumento no futuro (KUIPERS et al., 2015; WCRFI, 2017).

Fatores genéticos e ambientais desempenham um papel importante na etiologia da CRC. Somente 5 a 10% de todos os casos de CRC são devidos a defeitos genéticos herdados, sendo a síndrome de Lynch e a polipose adenomatosa familiar (PAF) as mais comuns (VASEN; TOMLINSON; CASTELLS, 2015). Os demais casos ocorrem principalmente devido a hábitos alimentares e de estilo de vida. Os fatores de risco relacionados ao estilo de vida incluem aumento do peso corporal, consumo de álcool e alta ingestão de carne vermelha (DOUBENI et al., 2012; MARLEY; NAN, 2016).

Por outro lado, o consumo de leite, grãos integrais, frutas, legumes e verduras, resultando em uma alta ingestão de cálcio, fibras, vitaminas (folato e vitamina D) e compostos fenólicos diminui o risco de CRC (HAGGAR; BOUSHEY, 2009). Contudo, o risco de CRC é aumentado por colite crônica, doença inflamatória intestinal e diabetes mellitus tipo 2 (MARLEY; NAN, 2016; VASEN; TOMLINSON; CASTELLS, 2015).

Evidências recentes sugerem que dietas ricas em leguminosas podem ajudar na prevenção e/ou redução de doenças crônicas, incluindo CRC (LUNA-VITAL et al., 2016). O efeito protetor do consumo de leguminosas, brotos e sementes tem sido associado à presença de fibras alimentares (solúveis ou insolúveis) e compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e antocianinas) (CRUZ-BRAVO et al., 2014).

1.6.1 Escassez de Estudos

Foi demonstrado que muitos alimentos contêm *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) e, como tal, são fontes potenciais para a aquisição de ESBL-E por seres humanos. Nos últimos anos, a carne ganhou muito interesse como fonte potencial, mas uma grande variedade de itens alimentares está contaminada com ESBL-E, incluindo vegetais e água potável (EGERVÄRN et al., 2017; VAN HOEK et al., 2015; REULAND et al., 2014). Um estudo da Holanda e um da Coreia do Sul relataram ESBL-E em brotos de feijão, entre outros vegetais (REULAND et al., 2014; KIM et al., 2015). Isso é relevante, pois os brotos de feijão são frequentemente consumidos crus e, como tal, apresentam maior risco de transmissão do que os itens alimentares cozidos antes do consumo (EVERS et al., 2017). Foi demonstrado que os brotos de feijão têm o potencial de ser a fonte de surtos comunitários em larga escala com *Enterobacteriaceae* patogênico, como foi o caso de *E. coli* O104: H4, causando síndrome hemolítico-urêmica na Alemanha em 2011 (BIELASZEWSKA et al., 2011; BUCHHOLZ et al., 2011).

Persoons e colaboradores (2011) realizaram um estudo sobre resistência antimicrobiana em ambientes produtores de animais. No entanto, publicações limitadas prevalecem sobre se os vegetais ou o ambiente em que são produzidos tem o potencial de atuar como um reservatório de resistência antimicrobiana (DUFFY et al., 2005). De acordo com Sjölund-Karlsson e colaboradores (2013), vários estudos sobre resistência antimicrobiana de *Salmonella* em humanos, animais e carnes de varejo foram realizados, enquanto pesquisas limitadas sobre *Salmonella* associadas a produtos frescos são menos comuns. É essencial compreender a natureza dos desafios de segurança de produtos frescos, origens de resistência antimicrobiana, vias de contaminação, fatores de risco para o consumidor e abordagens para excluir ou reduzir a ocorrência de *Salmonella* e outros contaminantes. Existe a necessidade de realizar mais pesquisas e determinar as origens da resistência antimicrobiana em produtos frescos.

O trabalho visa preencher a escassez de estudos elucidando o conjunto de bactérias Gram-negativas, em brotos alimentares, permitindo a obtenção de informações mais conclusivas sobre a participação do alimento no processo de desenvolvimento de resistência a antibióticos. Por esse motivo, cabe-se ressaltar o ineditismo do estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar fenotipicamente e genotipicamente a susceptibilidade a antibióticos em bactérias Gram-negativas viáveis oriundas de brotos de lentilha, girassol, alfafa e trevo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever um comparativo entre os pontos de corte interpretativos de susceptibilidade do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST);

Verificar fenotipicamente a susceptibilidade da microbiota Gram-negativa presentes nos brotos;

Avaliar a presença de genes que conferem resistência à antibióticos em bactérias Gram-negativa presentes nos brotos.

3 MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Um total de 5 amostras de brotos prontos para o consumo (RTE), incluindo, amostras de lentilha, girassol, alfafa e trevo, foram adquiridas. A amostragem foi composta por 1 a 2 amostras dos respectivos brotos, disponíveis em duas redes de supermercados da cidade de Petrópolis/Rio de Janeiro, coletadas a partir de janeiro até março de 2020. Todas as amostras foram adquiridas antes da data limite, de fornecedores diferentes, lotes e marcas diferentes, transportadas refrigeradas para o laboratório em sua embalagem original em um período máximo de 1 hora e analisadas imediatamente após sua chegada.

3.2 MÉTODOS DE PRÉ-SELEÇÃO

A metodologia foi baseada no trabalho de Silva et al. (2020). Primeiramente, os brotos foram homogeneizados dentro da embalagem original e destes, os mesmos foram colocados em 225mL de Caldo GN (Gram-negativo) que tem por finalidade o enriquecimento seletivo para o cultivo de organismos Gram-negativos (HIMEDIA, 2011). Procedeu-se a incubação por 24 horas a $\pm 35^{\circ}\text{C}$ para pré-enriquecimento. Alíquotas de 1mL foram retiradas para posterior extração de DNA. Objetivando a pré-seleção da microbiota resistente, após 24 horas, 50 microlitros do caldo foram retirados, transferidos e posteriormente colocados em tubos contendo 5mL de Caldo triptona de soja - TSB (Oxoid, Reino Unido) e disco de antibiótico (Oxoid, Reino Unido) (CDC, 2008). Foram selecionados 10 antibióticos, um de cada classe de acordo com a Classificação de Ambler (AMBLER, 1980) totalizando 50 possíveis isolados. Os antibióticos usados foram: Cefepima (30 μg), Ertapenem (10 μg), Gentamicina (10 μg), Ampicilina (10 μg), Ampicilina Sulbactam (10/10 μg), Cloranfenicol (30 μg), Tetraciclina (30 μg), Ciprofloxacina (5 μg), Ceftazidima (30 μg) e Trimetoprima Sulfametoxazol (1.25/ 23.75 μg). Esta etapa de pré-seleção foi realizada em triplicata para todos os antibióticos testados.

3.3 AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA

Após 24 horas de crescimento, todos os tubos com crescimento (turvação) foram destinados a próxima etapa. Tal etapa era constituída da adaptação da técnica de disco difusão, uma alçada (10 microlitros) inoculada de forma a acarretar superfície com

crescimento homogêneo, em placa de Agar MacConkey, um meio diferencial e levemente seletivo para isolamento de organismos Gram-negativos. O disco antibiótico da classe selecionada foi colocado na superfície da placa recém-semeada e a mesma foi levada a estufa a $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$ por 16-18 horas (CDC, 2008; CLSI, 2015). Após 16-18 horas de incubação, cada placa foi examinada e os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e avaliados de acordo com tabela de Normas Interpretativas para zona de diâmetro e concentração inibitória mínima para família *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2017). Os valores de referência se encontram descritos na tabela abaixo.

Tabela 1: Resumo das propriedades dos antibióticos utilizados.

Agente Antibiótico	Concentração do Disco	Diâmetros das zonas de inibição (mm)		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Cefepima (CPM)	30 µg	≤18	19-24	≥25
Ertapenem (ETP)	10 µg	≤18	19-21	≥22
Gentamicina (GEN)	10 µg	≤12	13-14	≥15
Ampicilina (AMP)	10 µg	≤13	14-16	≥17
Ampicilina Sulbactam (ASB)	10/10 µg	≤11	12-14	≥15
Cloranfenicol (CLO)	30 µg	≤12	13-17	≥18
Tetraciclina (TET)	30 µg	≤11	12-14	≥15
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≤20	21-30	≥31
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≤17	18-20	≥21
Trimetoprima Sulfametoxazol (SUT)	1,25 µg /23,75 µg	≤10	11-15	≥16

Para controle positivo, todos os discos de antibiótico foram testados com *Escherichia coli* (ATCC 25922) concomitantemente ao teste.

Os isolados considerados resistentes e intermediários foram estocados em solução de TSB e 20% de glicerol. Os resultados fenotípicos foram comparados com os pontos de corte interpretativos do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Pontos de corte interpretativos BrCAST/EUCAST.

Agente Antibiótico	Concentração do Disco	Diâmetros das zonas de inibição (mm)		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Cefepima (CPM)	30 µg	<21	21-26	≥27
Ertapenem (ETP)	10 µg	<22	22-24	≥25
Gentamicina (GEN)	10 µg	<14	14-16	≥17
Ampicilina (AMP)	10 µg	<14	-	≥14
Ampicilina Sulbactam (ASB)	10/10 µg	<14	-	≥14
Cloranfenicol (CLO)	30 µg	<17	-	≥17
Tetraciclina (TET)	30 µg	-	-	-
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	<24	24-25	≥26
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	<19	21-22	≥22
Trimetoprima Sulfametoxazol (SUT)	1,25 µg /23,75 µg	<11	11 a 13	≥14

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA dos isolados considerados resistentes e intermediários, bem como do crescimento em Caldo GN (fase de pré-enriquecimento) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas GeneJET Genomic DNA Purification KIT (ThermoScientific, Lituânia).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Isolados intermediários e resistentes foram analisados por PCR para os genes descritos na tabela 3. Os primers foram sintetizados pela Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemanha) e Invitrogen Thermo Fisher Scientific (California, EUA) respaldados em sequências de oligonucleotídeos previamente publicadas.

Tabela 3: Sequência de nucleotídeos, tamanho dos genes e suas respectivas referências.

Primer	Sequência (5'-3')	Condições de PCR	Produto	Referência
tem (F)	CATTCCGTGTCGCCCTTATTC	10 min a 94 °C; 30 ciclos de 40s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	800	DALLENE et al., 2010
tem (R)	CATTCCGTGTCGCCCTTATTC			
shv (F)	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	10 min a 94°C; 30 ciclos de 40s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	713	DALLENE et al., 2010
shv (R)	ATCCCGCAGATAAATCACCA			
oxa (F)	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	10 min a 94°C; 30 ciclos de 40s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 60	564	DALLENE et al., 2010

oxa (R)	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.		
int – 1 (F)	CTGCGTTCGGTCAAGGTTCT	03 min a 94 °C; 35 ciclos de 60s a 94 °C, 60 s a 68 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	882	LANZ et al., 2003
int – 1 (R)	GGAATGGCCGAGCAGATCCT			
int – 2 (F)	CACGGATATGCGACAAAAAGG	03 min a 94 °C; 35 ciclos de 60s a 94 °C, 60 s a 68 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	788	LANZ et al., 2003
int – 2 (R)	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
int – 3 (F)	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	03 min a 94 °C; 35 ciclos de 60s a 94 °C, 60 s a 68 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	979	LANZ et al., 2003
int – 3 (R)	ACGGATCTGCCAAACCTGACT			
ctx – M (F)	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKA TGGC	15 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C, 2 min a 72 °C; e 10 min de extensão final a 72 °C.	593	MONSTEIN et al., 2007
ctx – M (R)	TGGGTRAARTARGTSACCAGAA YCAGCGG			

kpc (F)	GTATCGCCGTCTAGTTCTGC	05 min a 95 °C; 30 ciclos de 60 s a 95 °C, 60 s a 56 °C, 60 s a 72 °C; e 05 min de extensão final a 72 °C.	635	AZIMI et al., 2013
kpc (R)	GGTCGTGTTCCCTTTAGCC			
tet – a (F)	GGCCTCAATTCCTGACG	01 min a 94 °C; 30 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a 55 °C, 2 min a 72 °C; e 10 min de extensão final a 72 °C.	371	GUILLAUME et al., 2000
tet – a (R)	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC			
tet – b (F)	GAGACGCAATCGAATTCGG	01 min a 94 °C; 30 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a 56 °C, 2 min a 72 °C; e 10 min de extensão final a 72 °C.	228	GUILLAUME et al., 2000
tet – b (R)	TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC			
uni515 (F)	GTGCCAGCMGCCGCGGTA	03 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 s a 95°C, 60 s a 67 °C, 01 min a 72 °C; e 05 min de extensão final a 72 °C.	312	BARMAN et al., 2008
ent826 (R)	GCCTCAAGGGCACAACTCCAA G			

A. bp: base pairs; B. Ges, per and veb (multiplex PCR); tem, shv and oxa (multiplex PCR); C. S = g ou c; Y = c or t; M = a ou c.

Os protocolos dos autores descritos na tabela 3 serviram para basear as condições de reação encontradas. Para identificação da presença da família *Enterobacteriaceae*, foi utilizado o par de primers (ent826, uni515). Os genes kpc e o integron classe 1, também foram pesquisados no DNA multi-espécie proveniente da fase de pré-enriquecimento.

3.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Todos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1.5% (Hexapur Bio Lab, Holanda) com Tris-Borato-EDTA (Promega, EUA) na voltagem de 90V. A visualização do gel foi realizada através do transiluminador de UV (Forlab, Brasil).

4 RESULTADOS

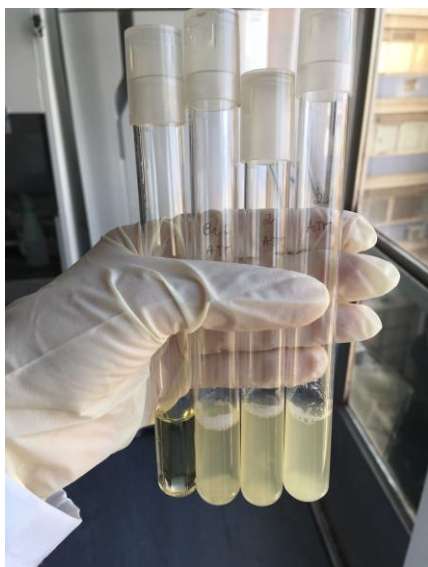
4.1 AMOSTRAS

Um total de 5 amostras de brotos do Brasil foram adquiridos de supermercados na cidade de Petrópolis/Rio de Janeiro. Todas as amostras analisadas apresentaram os requisitos necessários para comercialização. Todos os brotos foram produzidos no estado do Rio de Janeiro e sua composição era semelhante: sementes de brotos, livres de agrotóxicos e prontos para o consumo.

4.2 RESISTÊNCIA NA ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO

Na etapa de pré-seleção em 90% (45/50) dos isolados houve crescimento (Figura 1). Os isolados sem crescimento aconteceram somente nos antibióticos ciprofloxacina na amostra A e cefepima nas amostras B, C, D e E.

Figura 1: Etapa de pré-seleção



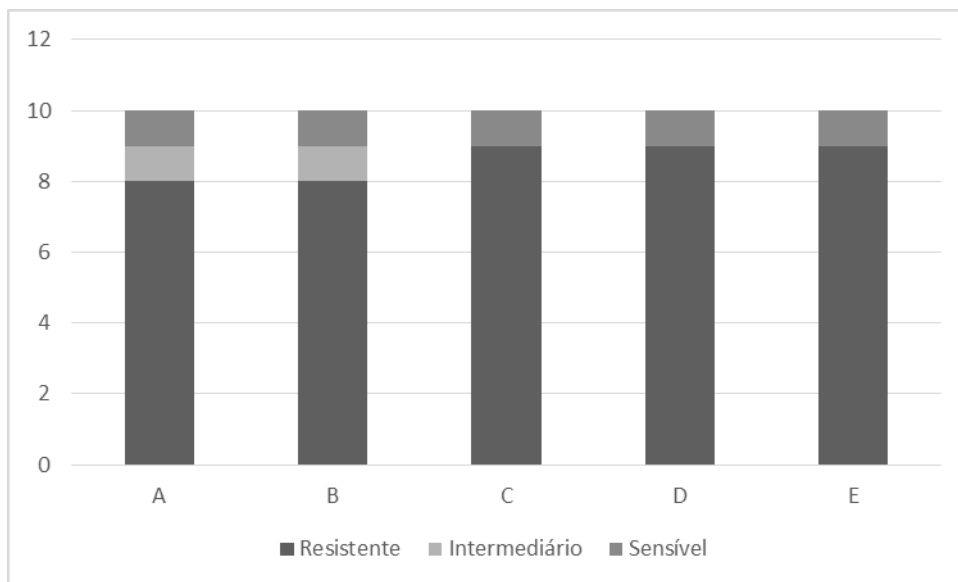
Da esquerda para a direita: tubo 1 sem inóculo; tubos 2, 3 e 4 triplicatas do isolado (amostra B – antibiótico atm)

4.3 RESISTÊNCIA FENOTÍPICA

Todas as 5 amostras de brotos evidenciaram uma microbiota altamente resistente, segundo os parâmetros estabelecidos pelo CLSI. Nenhuma das 5 amostras mostraram

resistência a todos os 10 antibióticos testados. A taxa de resistência de 9 antibióticos foi atingida em 100% das amostras (Gráfico 1).

Gráfico 1: Resistência fenotípica por amostra, de acordo com os parâmetros do CLSI.



No eixo X (A – E) as amostras de brotos. No eixo Y, o número de antibióticos testados.

Para os beta-lactâmicos (ceftazidima, ampicilina e ampicilina-sulbactam), assim como para ertapenem, tetraciclina e trimetoprima-sulfametoxazol nenhuma amostra se mostrou suscetível, representando 60% (6/10) dos antibióticos sem efetividade em todos os brotos analisados (Figura 2). Para os quatro antibióticos restantes, que mostraram alguma ação contra a microbiota, as resistências ainda se mostraram altas: 80,0% em cloranfenicol, 73,3% em ciprofloxacina (fluoroquinolona) e 66,7% em gentamicina. Nenhuma amostra resistente à cefepima (quarta geração de cefalosporina) foi encontrada.

Figura 2: Disco difusão



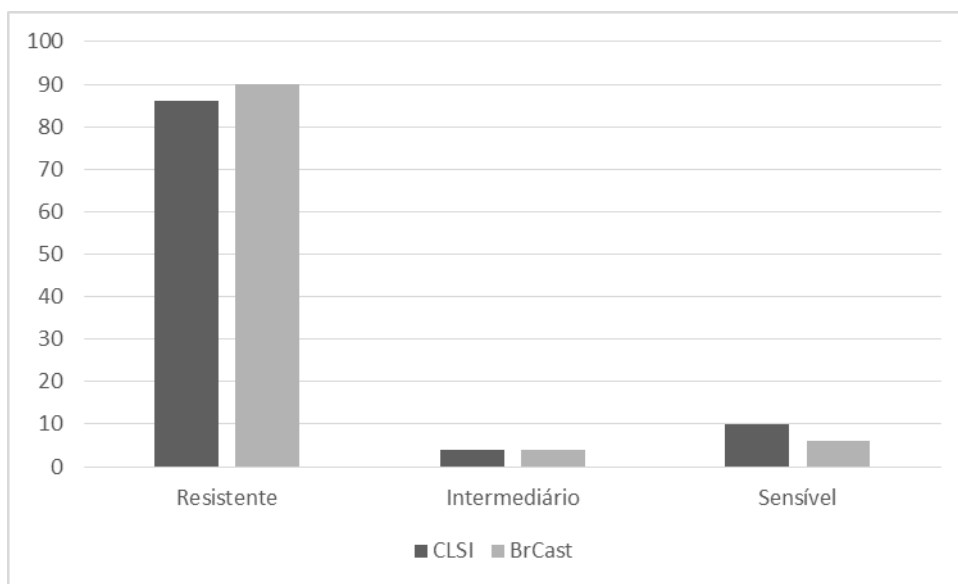
Isolado (amostra A - antibiótico gentamicina)

No total, 45 isolados distintos (fenotipicamente resistentes e intermediários) foram selecionados para investigação na PCR.

4.4 COMPARATIVO DE RESISTÊNCIA FENOTÍPICA

O trabalho foi fundamentado nos parâmetros estabelecidos pelo CLSI. Porém, quando comparados os resultados com os pontos de corte do Comitê Brasileiro sobre Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST) que é baseado no Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST), os índices de resistência atingem níveis ainda mais altos (BRCAST, 2017). Neste caso, isolados sensíveis foram reduzidos mais da metade (65%), representando apenas 8,7% do total e apenas três antibióticos mostraram eficácia, sendo eles cefepima, ciprofloxacina e cloranfenicol (Gráfico 2).

Gráfico 2: Resistência fenotípica total comparando os parâmetros do CLSI e do BrCast.

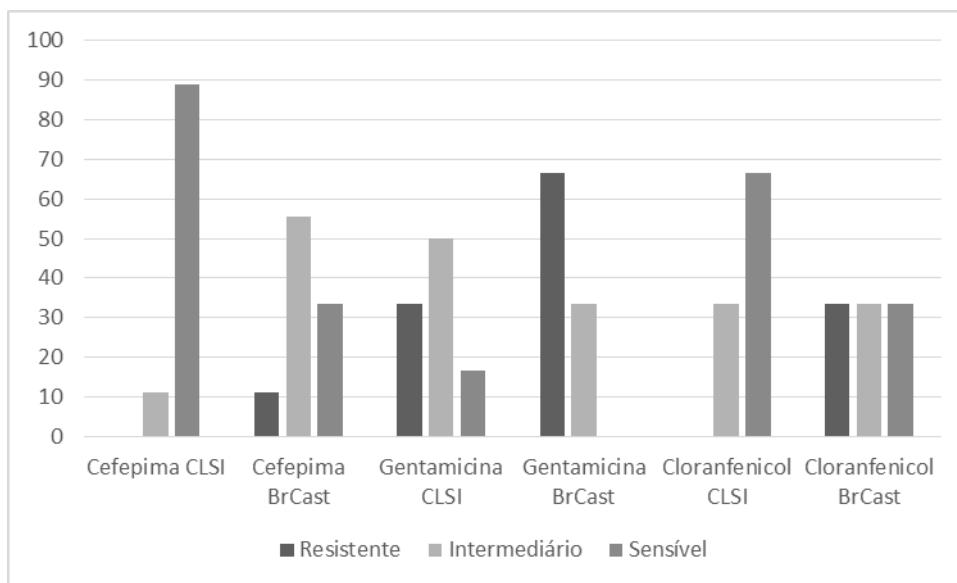


No eixo Y com valores percentuais. No eixo X a classificação das amostras.

Embora os pontos de corte sejam diferentes para todos os antibióticos testados, apenas 6 destes tiveram alteração em seus resultados, demonstrado no gráfico 3. Em 64,4% (29/45) dos isolados, não houve nenhuma formação de halo, demonstrando nestes casos, a total ineficácia destes antibióticos frente a microbiota gram-negativa. De forma alarmante, em nenhuma das amostras testadas com os antibióticos ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprima houve ao menos desenvolvimento de halo, e no caso de tetraciclina apenas uma amostra desenvolveu halo, porém ainda classificada como resistente.

Utilizando os parâmetros do BrCAST, os números de resistentes e de intermediários sofreram aumento enquanto a susceptibilidade foi bastante reduzida em todos os antibióticos. Em gentamicina, por exemplo, que de acordo com o CLSI apresentou 1 amostra suscetível e teria esse número reduzido a zero caso o novo parâmetro fosse utilizado. Outros antibióticos que sofreram modificação foram a cefepima e o cloranfenicol em que os isolados considerados sensíveis e intermediários foram reposicionados como intermediários e resistentes, respectivamente. De forma semelhante, no caso da gentamicina, o isolado considerado intermediário foi reposicionado como resistente. E, isolados considerados sensíveis foram considerados intermediários no caso da Cefepima (Gráfico 3).

Gráfico 3: Comparativo dos antibióticos que apresentaram variações na resistência fenotípica usando os parâmetros do CLSI e BrCast.



Eixo Y com os valores percentuais.

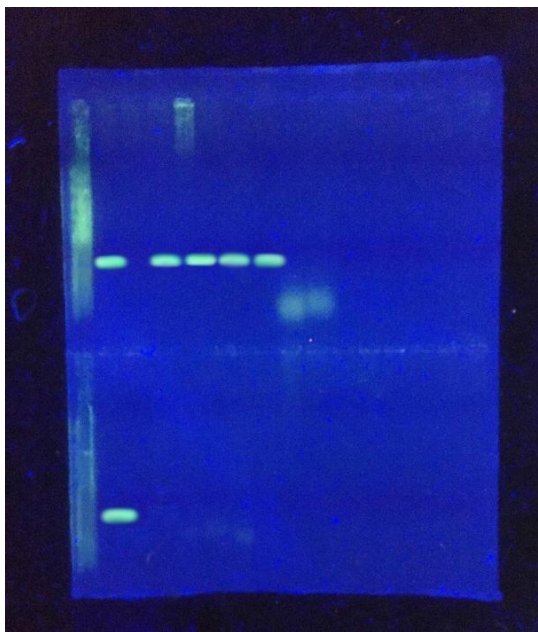
4.5 RESISTÊNCIA GENOTÍPICA

O ensaio da PCR foi realizado com amostras de DNA multi-espécie. No total, um subconjunto de 45 isolados (resistentes ou intermediários) foi testado quanto à presença de 11 genes de resistência diferentes. Foram encontrados sete genes de resistência distintos em 58% (29/50) isolados totalizando 41 genes.

Dos brotos analisados, todos apresentaram pelo menos um dos genes de resistência pesquisados. Dos 50 isolados de brotos, 22% (11/50) apresentaram ampliações correspondentes ao gene *int 1* (882pb), portanto, integrons de classe 1. Dos 45 isolados com fenótipo de múltipla resistência aos fármacos, 24,4% (11/45) apresentaram ampliações correspondentes ao gene *int 1* (882pb). Um isolado *int 1* positivo também foi positivo para *int 2* (788pb), portanto, integrons classe 2. Dos 18 isolados positivos para integrons, 8% (4/50) apresentaram ampliações referentes aos genes *int 2* (788pb) e *int 3*, portanto integrons de classe 2 e classe 3 (Figura 3).

A maior porcentagem encontrado nos brotos foi do elemento genético *ctx* (Tabela 4). Sendo encontrado em 13 isolados resistentes dos antibióticos testados, inclusive em isolado considerado intermediário ao antibiótico cloranfenicol aplicando os pontos de corte do CLSI.

Figura 3: Gel de eletroforese dos produtos de PCR de integron classe 3 e tet A.



Gel de agarose 1,5%, 90V, 1h30min, demonstrando amplicons obtidos com o par de iniciadores int 2 (forward e reverse), para amplificação do gene int 2. Poço 1 ladder 100bp -3kb, poço 2 controle positivo, poços 4, 5, 6 e 7 amostras A, C, D e E e antibióticos testados ampicilina e gentamicina, respectivamente.

Tabela 4: Quantidade de genes de resistência em amostras de brotos em isolados.

Gene	Amostra de broto	Quantidade de isolados
Int 1	100% (5/5)	22% (11/50)
Int 2	80% (4/5)	8% (4/50)
Int 3	80% (4/5)	8% (4/50)
Tet b	60% (3/5)	60% (3/5)
Ctx	100% (5/5)	26% (13/50)
Shv	40% (2/5)	8% (4/50)
Oxa	20% (1/5)	4% (2/50)

Os genes *kpc*, *ent*, *tem* e *tet a* não foram encontrados em nenhum dos isolados. Apenas 32% (16/50) dos isolados demonstraram resistência fenotípica e não apresentaram nenhum dos genes que foram selecionados para serem testados.

A distribuição da totalidade dos 41 genes encontrados distribuídos por cada isolado resistente está descrita nas tabelas 5 e 6. Um isolado alcançou o número de 3 diferentes genes presentes em uma mesma amostra.

4.6 DETECÇÃO DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE*

De acordo com a reação de PCR, a família *Enterobacteriaceae* não foi identificada em nenhum dos 50 isolados testados.

Tabela 5: Resumo dos genes encontrados em cada isolado.

	Ampicilina Sulbactam	Ampicilina	Gentamicina	Ertapenem	Cefepima
A	Int 1	Int 3			
B				Ctx	-
C		Int 2, shv	Int 3	Shv	-
D		Int 2, shv	Int 3	Shv	-
E		Int 2, oxa	Int 3	Oxa	-

Tabela 6: Resumo dos genes encontrados em cada isolado.

	Sulfametoxazol Trimetopima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Tetraciclina	Cloranfenicol
A	Ctx, int 1		-		Int 1, int 2, ctx
B		Int 1	Int 1		Ctx
C	Ctx, int 1	Ctx, int 1		Tet b	Ctx
D	Ctx, int 1	Ctx, int 1		Tet b	Ctx
E	Ctx, int 1	Ctx, int 1		Tet b	Ctx

(-) Representam isolados que não foram considerados resistentes fenotipicamente. Quadros em branco representam amostras resistentes, nos quais os genes testados não foram encontrados.

5 DISCUSSÃO

5.1 RESISTÊNCIA FENOTÍPICA

No presente estudo, 60% (6 de 10) dos antibióticos testados para amostras de brotos coletados em Petrópolis, se mostraram resistentes. Para os beta-lactâmicos (ceftazidima, ampicilina e ampicilina-sulbactam), assim como para ertapenem, tetraciclina e trimetoprima-sulfametoxazol nenhuma amostra se mostrou suscetível e para os quatro antibióticos restantes, que mostraram alguma ação contra a microbiota, as resistências ainda se mostraram altas: 80,0% em cloranfenicol, 73,3% em ciprofloxacina (fluoroquinolona) e 66,7% em gentamicina.

Os números de resistência encontrados no estudo são alarmantemente altos, o que é particularmente relevante, se tratando de um alimento pronto para consumo e que pode ser consumido sem a necessidade de aquecimento ou tratamento térmico que poderia reduzir os microrganismos presentes. Em todos os brotos analisados a microbiota se mostrou resistente em 9 dos 10 antibióticos testados.

Conforme Huizinga et al. (2018), além da resistência aos beta-lactâmicos, foram encontrados altos níveis de co-resistência a importantes agentes antimicrobianos nos isolados de brotos de feijão na Holanda, como ciprofloxacina, trimetoprima-sulfametoxazol e tobramicina. A resistência combinada a esses três antibióticos e ao fenótipo ESBL (*Enterobacteriaceae*) esteve presente em 50% dos isolados. Essa taxa de co-resistência é maior do que a encontrada em isolados de ESBL-E de portadores humanos, ou seja, 12% (REULAND et al., 2013). A resistência combinada aos três antibióticos e ao fenótipo ESBL para *K. pneumoniae* de hemoculturas em quatro hospitais periféricos no sul da Holanda foi de 18,3% (11 de 60 isolados, período 1-1-2010 ± 1-1-2018). Nenhum dos isolados do estudo apresentou resistência a carbapenêmicos ou colistina.

Huizinga et al. (2018), detectaram que os genes ESBL encontrados em brotos de feijão também foram encontrados na população humana. Por exemplo, os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-14}, que foram detectados em brotos de feijão no estudo, estão entre os genes ESBL mais frequentemente detectados em portadores humanos e infecções da corrente sanguínea na Holanda (VOETS et al., 2012; WILLEMSSEN et al., 2015; VAN DER BIJ et al., 2011). Também foi relatado que *bla*_{CTX-M-3} e *bla*_{CTX-M-27} estão presentes em infecções da corrente

sanguínea na Holanda (VAN DER BIJ et al., 2011). O gene ESBL mais comumente detectado no estudo, *bla_{SHV-2}*, também foi relatado como presente em amostras clínicas (VOETS et al., 2012). No entanto, os genes *bla_{SHV}* nem sempre são tipados para as variantes específicas dentro do grupo, dificultando a comparação dos tipos exatos de shv (WILLEMSEN et al., 2015; STUART et al., 2010).

No estudo de Abatcha, Effarizah e Rusul (2018) com vegetais folhosos, carcaças de frango e ambientes de processamento relacionados nos mercados de alimentos frescos da Malásia, 98% dos isolados produtores de ESBL/AmpC foram multirresistentes, enquanto 93,3% MDR (resistência a múltiplas drogas) foram relatados para isolados produtores de ESBL de um estudo semelhante na Tunísia (BEN SAID et al., 2015). Além disso, 100% dos isolados de água de irrigação do rio do estudo de Abatcha et al. (2018) apresentaram fenótipos de MDR, que é significativamente maior do que os 42,3% de MDR relatados anteriormente em isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL de água de rio (YE et al., 2017). No geral, 63,16% (12/19) dos isolados de espinafre de varejo na África do Sul mostraram um fenótipo de MDR, que é inferior ao MDR de 83,78% relatado anteriormente de espinafre em varejo na mesma localidade (RICHTER et al., 2019).

De acordo com Abatcha et al. (2018), a resistência a até quatro classes adicionais de antibióticos não-β-lactâmicos foram observadas nos isolados patogênicos potenciais produtores de MDR ESBL de amostras de água de rio e espinafre. Isso incluiu isolados de *K. pneumoniae* com resistência ao cotrimoxazol, um antibiótico clinicamente relevante, semelhante aos isolados clínicos em um estudo sul-africano (VASAIKAR et al., 2017). A ocorrência (36%) de *K. pneumoniae* produtora de ESBL MDR ao longo do primeiro cenário de produção foi alta, em comparação com estudos semelhantes onde foram relatadas ocorrências de 0% (Holanda) e 15% (China) (BLAAK et al., 2014; YE et al., 2017). Isso destaca o papel potencial que o ambiente agrícola pode ter como reservatório de patógenos oportunistas MDR na produção de produtos frescos.

No estudo de Zarzecka et al. (2021), os resultados da pesquisa indicaram uma discrepância entre o fenótipo e o genótipo de resistência em vários isolados. Alguns deles exibiram fenotipicamente a resistência ao antibiótico, embora os genes de resistência correspondentes não tenham sido encontrados, corroborando com os achados encontrados no presente estudo. A suscetibilidade a um antibiótico, apesar da presença de genes de resistência

apropriados, é explicada por diferenças na expressão desses genes, presença de pseudogenes ou mutações dentro deles que impedem a transcrição ou tradução. A resistência fenotípica a um antimicrobiano específico se deve a vários mecanismos genéticos, alguns dos quais permanecem desconhecidos (HUGHES; ANDERSSON, 2017).

Segundo Hartantyo et al. (2020), a resistência fenotípica a várias classes de antibióticos foi observada através de testes de difusão em disco e transporte de elementos genéticos associadas ao aumento da virulência (8%, 11 de 147) foi observada por PCR. Os isolados multirresistentes foram provenientes de vegetais crus, fígado de frango ou porco e um prato de aves pronto para consumo; um isolado de *K. pneumoniae* multirresistente de brotos de feijão cru foi resistente a uma cefalosporina de terceira geração (ceftriaxona).

No estudo de Hartantyo et al. (2020), *K. pneumoniae* foi detectado em 21% (147 de 698) das amostras de alimentos crus e RTE (alimentos prontos para o consumo) coletadas em Cingapura. Uma maior taxa de positividade para *K. pneumoniae* foi observada em alimentos crus (45%, 66 de 146) em comparação com amostras RTE (15%, 81 de 552). *K. pneumoniae* foi encontrado em 58% (50 de 86) de vegetais crus (broto de feijão, cebolinha, pimenta, salsa, alface, pepino, cenoura e gengibre) e 27% (16 de 60) de frango cru e fígado de porco.

As taxas de resistência a antibióticos de *K. pneumoniae* isoladas de alimentos crus foram cerca de 97% (64 de 66) resistentes à ampicilina e 20% (13 de 66) eram resistentes à tetraciclina. Taxas de resistência inferiores a 15% foram observadas para ciprofloxacina (12%, 8 de 66), cloranfenicol (8%, 5 de 66), sulfametoxazol-trimetoprim (8%, 5 de 66), amoxicilina-ácido clavulânico (6%, 4 de 66), ácido nalidíxico (2%, 1 de 66), amicacina (2%, 1 de 66) e ceftriaxona (2%, 1 de 66). Nenhum isolado de *K. pneumoniae* (0 de 66) mostrou resistência à gentamicina ou norfloxacina (HARTANTYO et al., 2020).

Para as autoridades de saúde pública, abordar a questão das bactérias resistentes aos antibióticos na cadeia de abastecimento alimentar requer esforços concertados entre as agências. A nível internacional, a OMS delineou um plano de ação global para combater a resistência antimicrobiana. Embora seja ideal conter a propagação da resistência aos antibióticos por meio da proibição do uso de antibióticos na agricultura e na produção de alimentos, essas restrições extremas podem enfrentar oposição. Aumento do custo de produção de alimentos devido à redução no rendimento total e tamanho de crescimento dos

animais, bem como o aumento da ocorrência de doenças animais e infecções transmitidas por alimentos (CLSI, 2014; DOYLE, 2006) quando os antibióticos não são usados, é uma preocupação. Assim, tanto a administração quanto a regulação de antibióticos precisam ser realizadas com prudência.

No ambiente natural, durante a germinação das sementes, ocorre o aumento de suas respostas defensivas por meio da biossíntese de fenólicos incluindo vitaminas, enzimas e receptores modificados (RANDHIR; SHETTY, 2007). Entre os mecanismos defensivos aprimorados durante a germinação (brotação), as defesas antimicrobianas podem estar altamente envolvidas. No entanto, essas defesas não foram cobertas adequadamente em brotos germinados na maioria das plantas medicinais que produzem sementes. Os metabólitos fenólicos de plantas estão ganhando interesse devido ao seu potencial papel na prevenção e tratamento de doenças humanas. Nos últimos anos, o uso de fitoconstituintes como agente antimicrobiano natural comumente chamado de “biocidas” vem ganhando popularidade (SMID; GORRIS, 1999). As leguminosas são consideradas alimentos básicos para diferentes classes de pessoas em todo o mundo. A partir do estudo de Valli e Gowrie (2019), os resultados são evidências claras de que os brotos têm uma forte propriedade antibacteriana natural, pois os brotos frescos mostraram zona de inibição proeminente contra bactérias patogênicas e também mostraram zona mínima de inibição contra *Escherchia coli*, o que indicou que quando esses brotos são consumidos não afetará nossa flora microbiana natural intestinal. Essas propriedades biológicas e a presença de potenciais metabólitos secundários como terpenóides e flavonóides também podem ser responsáveis pela atividade antibacteriana natural dos brotos.

5.2 RESISTÊNCIA GENOTÍPICA

5.2.1 Integrons

No presente estudo, nos brotos analisados a maior prevalência encontrada foi de integron classe 1, encontrado em isolados resistentes em 5 dos 10 antibióticos testados e em 22% (11/50) das amostras. A maior quantidade foi verificada em sulfametoxazol/trimetoprima e ceftazidima, onde foi detectado em 80% dos isolados e ampicilina/sulbactam, ciprofloxacina e cloranfenicol com 20% em ambas. Por outro lado, os integrons classe 2 e classe 3, foram

encontrados em isolados resistentes em apenas 2 dos 10 antibióticos testados e em 8% (4/50) das amostras.

Os resultados do estudo de Mohamed et al. (2020) mostraram que todos os 18 (100%) dos isolados de vegetais prontos para o consumo contêm integrons de classe 1, conforme indicado pelo tamanho do produto de PCR de 483 *pb*. Integrons são elementos de genes móveis que contêm dois segmentos conservados e um cassete de gene variável central que comumente codifica para resistência a antibióticos. No estudo, todos os isolados de legumes prontos para o consumo foram positivos para integrons classe 1, que é maior do que a taxa relatada para *E. coli* isolada de carne cozida na China (14,7%) (YU et al., 2016).

A transferência horizontal de genes (HGT) foi considerada um importante mecanismo de transferência de ARGs (genes de resistência a antibióticos) (PARTRIDGE et al., 2018). Os integrons, que poderiam capturar os cassetes de genes contendo ARGs, bem como estar localizados nos transposons, plasmídeos conjugativos e sequências de inserção, foram comumente escolhidos para rastrear o potencial HGT (PARTRIDGE et al., 2018; SHI et al., 2018). Os integrons foram originalmente encontrados em relação aos ARGs (STOKES; HALL, 1989), e até agora têm sido frequentemente descobertos em genomas bacterianos sequenciados (CHEN et al., 2015).

Para Wang et al. (2020), as relações de integrons com ARGs, sugerindo o papel central na ocorrência e disseminação de ARGs possivelmente desempenhados por integrons (*intl1* e *intl2*) em sistemas de tratamento de FW (desperdício de comida). Esses resultados foram consistentes com estudos anteriores sobre esterco, esgoto e resíduos sólidos urbanos (HE et al., 2014; SU et al., 2015; WANG et al., 2019). Além disso, a abundância relativa aumentada de *intl1*, *intl2* e ARGs totais do FW inicial ao FW tratado, bem como as fortes correlações, podem sugerir que os integrons apresentam contribuições significativas na disseminação de ARGs durante os processos de tratamento de FW. Os integrons existiam amplamente em ambientes ecológicos (GILLINGS et al., 2008), e também foi relatado que os ARGs estavam altamente localizados em cassetes de integrons (AN et al., 2018). Integrons geralmente incorporados em MGEs (elementos genéticos móveis) e eram altamente abundantes em cepas bacterianas clínicas e ambientais (NDI; BARTON, 2011; PARTRIDGE et al., 2009; YAN et al., 2010).

Conforme Lei et al. (2019), das 51 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de amostras de alimentos RTE (comidas prontas para o consumo), nenhum isolado *intI2*-positivo e *intI3*-positivo foi detectado. Entretanto, todos os isolados foram positivos para o gene *intI1*. Esses resultados são consistentes com os achados de um estudo anterior focado em *V. parahaemolyticus* isolado de pepinos-do-mar cultivados (*Apostichopus japonicas*) relatados na China (JIANG et al., 2014), mas é contraditório com os achados de estudos anteriores focados em *V. parahaemolyticus* coletado de amostras ambientais e clínicas no Chile, nas quais nenhum dos genes de integrases de classe 1, 2, 3 foi detectado (DAUROS et al., 2011). Esses resultados também confirmam o fato de que os integrons de classe 1 são os integrons mais comuns em bactérias Gram-negativas (FANG et al., 2019; ODUMOSU et al., 2013).

Segundo Xiong et al. (2019), todos os 11 genes RAM (resistentes a antibióticos), de carne crua e produtos aquáticos, vegetais e frutas frescas no sul da China, que conferem resistência a seis classes principais de antibióticos, tetraciclina, aminoglicosídeo, cloranfenicol, eritromicina, sulfonamida e quaternium, e *intI1* de integron de classe 1 foram detectados em amostras de alimentos crus ou frescos isolados de Guangzhou e Xiamen. Os resultados mostram que os genes RAM em amostras de alimentos não são apenas diversos, mas também notavelmente abundantes, o que juntos oferece uma maior probabilidade de dispersão e/ou transferência horizontal na cadeia alimentar. A disseminação de genes RAM está fortemente ligada a elementos genéticos móveis, como plasmídeos, integrons e transposons, dos quais integrons de classe 1 têm uma grande responsabilidade pelo enriquecimento de genes RAM em bactérias transmitidas por alimentos (GHALY et al., 2017).

Portanto, foram analisadas a ocorrência e abundância *intI1* do integron de classe 1, e seus mais comumente contêm cassetes de resistência que codificam genes *aadA*, bem como *qacE*, *sull* e *sulIII* nas amostras de alimentos crus ou frescos. Esses cinco genes foram muito prevalentes e abundantes nas amostras, com detecção de frequência de 91,60%, 95,80%, 92,44%, 93,28% e 95,80%, respectivamente. A distribuição generalizada dos genes *intI1*, *aadA*, *qacE*, *sull* e *sulIII* foi consistente com relatórios anteriores (JIANG et al., 2017; WANG et al., 2015). Esses genes associados a integrons podem desempenhar papéis significativos na disseminação e manutenção da resistência antimicrobiana na cadeia alimentar (XIONG et al., 2019).

Os resultados da distribuição de integrons classe 1 em diferentes tipos de alimentos, demonstrou menor prevalência deste gene associado a produtos aquáticos. Foi relatada a menor prevalência destes genes em bactérias isoladas de produtos aquáticos quando comparadas com as bactérias de produtos agrícolas (FENG et al., 2011; TRONGJIT; ANGKITTITRAKUL; CHUANHUEN, 2016; YANG et al., 2017).

Segundo Trocado et al. (2021) foram encontrados oito diferentes genes de resistência em sucos de frutas frescas de um hospital público do Rio de Janeiro, são eles: shv, tem, int2, int3, ctx, oxa-48, tetA e tetB. Considerando a quantidade de amostras, foram encontrados 102 genes no total, incluindo genes de resistência e genes da família *Enterobacteriaceae*. Todas as amostras apresentaram pelo menos um dos oito genes de resistência pesquisados. Os genes não encontrados foram: int1, ges, per, veb, oxa, ndm, vim e imp.

Para Trocado et al. (2021), os integrons das classes 2 e 3 (int2 e int3) representam um achado importante deste estudo, demonstrando a possibilidade de resistência adquirida mediada por elementos genéticos móveis, uma vez que os integrons abrigam os cassetes gênicos, capazes de incorporar novos genes (HALL, 2001; OPAL; MEDEIROS, 2005). Nenhum dos isolados apresentou a presença de int1, mas 4 isolados apresentaram int 2 (amostras A e B: suco de laranja) e apenas 1 isolado apresentou o int3 (amostra E: suco de laranja). No entanto, Jones-Dias et al. (2016) mostraram a presença do integron 1 em maior número ao avaliar isolados de bactérias pertencentes a *Enterobacteriaceae* de frutas e hortaliças frescas e uma menor representação do integron 2 e 3, confirmando também a menor participação das classes 2 e 3 de integrons na multirresistência a antibióticos (JONES-DIAS, 2016).

O estudo de Jones-Dias et al. (2016) concentrou-se na avaliação de produtos cultivados organicamente e convencionalmente em relação à não suscetibilidade a antibióticos e ao conteúdo de integrons. No geral, levou a três principais descobertas globais. Primeiro, bactérias Gram negativas foram isoladas de frutas e vegetais crus e não lavados. A detecção de bactérias Gram negativas resistentes a antibióticos de diferentes espécies em amostras distintas de hortaliças de varejo, após a seleção de diferentes morfotipos, mostrou diversidade de espécies bacterianas e uma variedade de padrões e mecanismos de suscetibilidade a antibióticos. De fato, as abordagens de morfotipo de colônia têm o potencial de super ou subestimar a verdadeira diversidade de espécies, devido à variação na morfologia da colônia

dentro de espécies individuais ou à incapacidade de diferenciar uma morfologia de colônia comum a várias espécies (LEBARON et al., 1998).

Assim, no estudo de Jones-Dias et al. (2016), foram focados na avaliação e avaliação da diversidade enquanto quaisquer conclusões quantitativas foram tiradas com cautela. No geral, foi detectada distribuição similar de espécies em produtos vegetais de produção orgânica e convencional. No entanto, deve-se notar que a manipulação inadequada de produtos frescos pode contribuir em algum grau para a presença de bactérias resistentes a antibióticos em produtos alimentícios (VAN HOEK et al., 2015). Em segundo lugar, a comparação com outros relatos de bactérias Gram negativas recuperadas de vegetais revelou que este estudo encontrou níveis mais baixos de resistência. Estes geralmente incluíam não suscetibilidade à cefalosporina de terceira geração em *Enterobacteriaceae*, sugestivo de produção de ESBL (KIM et al., 2015). A terceira conclusão principal foi que certos produtos orgânicos e convencionais continham isolados que abrigavam integrons de classe 1, 2 e/ou 3 que também carregavam genes de resistência a antibióticos adquiridos clinicamente não relacionados, o que pode contribuir para a disseminação da resistência a antibióticos na cadeia alimentar.

Uma alta porcentagem dos isolados produtores de ESBL/AmpC no estudo de Richter et al. (2020) abrigava ainda integrons, o que é consistente com relatórios anteriores (BEN SAID et al., 2015; YE et al., 2017). Os integrons de classe 1 foram detectados em 47,96% dos isolados produtores de MDR ESBL/AmpC de ambos os cenários, correspondendo aos resultados relatados (MA et al., 2017; YE et al., 2017). Semelhante aos resultados relatados por Freitag et al. (2018), nenhum integron de classe 2 foi detectado no estudo atual. Isso contrasta com estudos anteriores onde os integrons de classe 2 foram predominantemente detectados, seguidos por integrons de classe 1 de vegetais crus de salada vendidos no Canadá (BEZANSON et al., 2008). Neste estudo foi interessante que os integrons classe 3 foram os mais prevalentes, detectados em 72,92% (35/48) dos isolados produtores de ESBL/AmpC. Isso contrasta com estudos anteriores em que apenas integrons de classe 1 foram detectados em amostras de água e alimentos de varejo (YE et al., 2017).

5.2.2 Genes de resistência a tetraciclina

Em nosso estudo 100% dos brotos analisados tiveram microbiota resistente a tetraciclina e em 60% dos casos a resistência está provavelmente relacionada à presença de um gene encontrado (tet b). Em 60% (3/5) dos brotos tet b estava presente.

No estudo Blau et al. (2018), quase todos os isolados da salada mista contendo *E. coli* foram resistentes a antibióticos de pelo menos uma classe, e dois isolados foram resistentes a oito classes de antibióticos, tetraciclina, penicilinas, cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, fenicolis e trimetoprima. A maioria das *E. coli* resistentes à tetraciclina também apresentou resistência à ampicilina e amoxicilina (84%) e trimetoprima (73%). Resistências à ofloxacina, ciprofloxacina, sulfadiazina e estreptomicina também foram comuns.

Segundo Lam et al. (2020), foram examinados a frequência de alface carregando diferentes genes de resistência. Vinte amostras de alface de cada método de produção foram adquiridas em supermercados locais de Hong Kong. Foram comparados a frequência de amostras com tetb, tetx, sul1, sul2 e int1 nos três grupos por PCR. Nenhuma diferença significativa foi encontrada em todos os genes testados. Tet b foi encontrado em 13 amostras de alface convencional e 10 de alface orgânica e hidropônica.

O índice de resistência a múltiplos antibióticos (MAR) no estudo de Abatcha, Effarizah e Rusul (2018), em vegetais folhosos, carcaças de frango e ambientes de processamento relacionados nos mercados de alimentos frescos da Malásia, de *Salmonella* variou de 0,08 a 0,83, e o padrão de resistência mais prevalente foi STeS₃. Onze dos 16 genes resistentes, dentre eles, tet a e tet b, foram detectados entre os isolados de *Salmonella* resistentes.

No estudo de Abatcha, Effarizah e Rusul (2018), dos 83 isolados resistentes à tetraciclina, apenas tet a foi encontrado em 76 isolados e 3 foram positivos para ambos tet a/tet b, respectivamente. Nenhum isolado foi positivo para tet c e tet g. Semelhante ao tet a, o gene tet b é difundido entre *Salmonella* e foi localizado em plasmídeos transferíveis (LOPES et al., 2016), e é facilmente transferido (ROBERTS, 2005).

Foram encontrados oito diferentes genes de resistência no estudo de Trocado et al. (2021) em amostras de frutas frescas, incluindo tet a e tet b. Os genes tet a e tet b são conhecidos por codificar resistência às tetraciclina através do sistema de bomba de efluxo.

Esses dois genes foram encontrados em amostras de diversos alimentos, incluindo vegetais e frutas, laranja por exemplo, sendo o gene tet a presente em maior número seguido pelo tet b (XIONG et al. 2019). Tal fato que contrapõem os resultados do presente estudo.

5.2.3 Genes produtores de β -lactamases

Em nossas análises, o gene produtor de ESBL encontrado em maior número de amostras foi o ctx, presente em 5 dos 5 brotos analisados, sendo identificado em 26% (13/50) dos isolados resistentes. Com prevalência entre os isolados resistentes a: ertapenem, sulfametoxazol/trimetropima, ceftazidima e cloranfenicol. Para o gene shv, foram encontrados em 2 das 5 amostras analisadas, em 8% (4/50) isolados, incluindo ampicilina e ertapenem. Por fim, o gene oxa foi encontrado em 1 dos 5 brotos em isolados resistentes com um percentual de 4% (2/50).

No estudo de Huizinga et al. (2018), 19,1% das amostras de brotos de feijão estavam contaminadas com ESBL-E, com uma porcentagem notável de isolados de *Klebsiella* na ausência de *E. coli*. Os isolados são resistentes a várias outras classes de antibióticos e são geneticamente muito diversos ao longo do tempo. Portanto, brotos de feijão são uma possível fonte comunitária de *Klebsiella* spp. produtora de ESBL.

Os genes ESBL detectados em brotos de feijão também foram detectados na população humana. Por exemplo, os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-14}, que foram detectados em brotos de feijão no estudo atual, estão entre os genes ESBL mais frequentemente detectados em infecções de transporte humano e da corrente sanguínea na Holanda (VOETS et al., 2012; WILLEMSSEN et al., 2014; VAN DER BIJ et al., 2011).

Também foi relatado que *bla*_{CTX-M-3} e *bla*_{CTX-M-27} estão presentes em infecções da corrente sanguínea na Holanda (VAN DER BIJ et al., 2011). Embora genes ESBL semelhantes sejam encontrados em brotos de feijão e humanos, é difícil julgar o impacto do reservatório do gene ESBL em brotos de feijão em humanos, pois este estudo não foi projetado para fazer uma comparação direta. No entanto, brotos de feijão têm o potencial de espalhar *Enterobacteriaceae* para humanos, como foi demonstrado por vários surtos de *Enterobacteriaceae* patogênicas em humanos no passado (BIELASZEWSKA et al., 2011; BUCHHOLZ et al., 2011).

Todos os isolados produtores de ESBL continham genes *bla*_{CTX-M} nos vegetais analisados no estudo de Freitag et al. (2018), três em combinação com um gene *bla*_{TEM}. Quatro dos genes *bla*_{CTX-M} pertenciam ao grupo *bla*_{CTX-M-9}: *bla*_{CTX-M-14} (n=2), *bla*_{CTX-M-65} e *bla*_{CTX-M-125} em um único isolado cada. Dois genes, *bla*_{CTX-M-15}, pertenciam ao grupo *bla*_{CTX-M-1}. O gene restante, *bla*_{CTX-M-2}, pertencia ao grupo *bla*_{CTX-M-2}. De acordo com os resultados do estudo de Huizinga et al. (2018), também Kim et al. (2015) encontraram o grupo *bla*_{CTX-M-9} sendo o mais prevalente (somente *bla*_{CTX-M-14}), seguido pelo grupo *bla*_{CTX-M-1} (somente *bla*_{CTX-M-15}). O *bla*_{CTX-M-65} foi bem descrito em isolados de *E. coli* de humanos e animais saudáveis na China e Coreia (YANG et al., 2014; ZHENG et al., 2012) e na América (TATE et al., 2017). Um estudo da Suíça (ZURFLUH et al., 2015) encontrou *bla*_{CTX-M-65} em alimentos da República Dominicana e do Vietnã. Até onde se sabe, este é o primeiro isolamento de *bla*_{CTX-M-65} em alimentos da Europa (originária da Holanda). Um estudo da Holanda investigou a prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL e AmpC em vegetais de varejo (VAN HOEK et al., 2015). Neste estudo, um isolado de *E. coli* de aipo branqueado carregava um gene *bla*_{SHV-12}. E nenhum gene *bla*_{CTX-M} foi encontrado.

Dois MDR *E. coli* que abrigam os genes ESBL clinicamente importantes *bla*_{CTX-M-3} e *bla*_{CTX-M-27} foram isolados a partir de água de lavagem reciclada (NUESCH-INDERBINEN et al., 2015). O isolado produtor de *ctx-m-27* pertencia à cepa pandêmica altamente virulenta de *E. coli* B2:ST131, que está associada a infecções graves em humanos, predominantemente infecções do trato urinário e bacteremia (ROGERS; SIDJABAT; PATERSON, 2011). Como essa água de lavagem reciclada é usada para irrigação de culturas, ela representa uma fonte potencial de contaminação cruzada com patógenos (GIL et al., 2009). A detecção de uma *E. coli* produtora de ESBL é ilustrativa da necessidade de também controlar a qualidade microbiana dessa água.

Um estudo relatou que vários tipos de ESBLs, incluindo os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, foram detectados com mais frequência em *E. coli* e *K. pneumoniae* no Japão (CHONG et al., 2011). Os resultados do estudo de Kim et al. (2015), indicam que o mecanismo genético subjacente à propagação de genes ESBL tornou-se mais variável e complexo. Todos os 14 isolados positivos de brotos de alfafa para *ctx-m* carregavam o gene *bla*_{CTX-M} pertencente ao cluster *ctx-m-1* ou *ctx-m-9*. O sequenciamento de todo o gene *bla*_{CTX-M} identificou todos os isolados *ctx-m* do grupo 9 produzindo *ctx-m-14* (n = 9), e todos os

isolados ctx-m do grupo 1 produzindo ctx-m-15 (n = 3) ou ctx-m-55 (n = 2). Os tipos ctx-m, particularmente ctx-m-15 e ctx-m-14, são o tipo mais prevalente de ESBLs no mundo (EWERS et al., 2012). O ctx-m-14 também está entre os tipos de ESBL mais prevalentes observados em animais de companhia (30%) e aves (33%), na Ásia (EWERS et al., 2012). O ctx-m-55 é conhecido por ser um derivado do ctx-m-15 (KIRATISIN et al., 2007), e é disseminado principalmente na China (ZHANG et al., 2011). Lee et al. (2013) relataram um caso de ctx-m-55 em uma mulher coreana que viajou para a China e sugeriram que bactérias produtoras de ESBL podem se disseminar pela população. *E. coli* produtora de ctx-m-55, detectada em vegetais neste estudo, indicam que produtos frescos também podem ser suspeitos de serem portadores de organismos produtores de ESBL (KIM et al., 2015).

Conforme Margot et al. (2016), as três *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL isoladas de amostras de brotos pertenciam às espécies *Klebsiella variicola*, *Enterobacter cloacae* e *E. coli*. O isolado de *Klebsiella variicola* abrigou o gene *bla*_{CTX-M-14} clinicamente importante e originou-se de uma mistura de brotos (feijão mungo, lentilha e grão de bico). O isolado de *Enterobacter cloacae* que abrigou *bla*_{CTX-M-3} originou-se de uma amostra de brotos de feijão mungo. O isolado de *E. coli* foi obtido de outra amostra de brotos de feijão mungo, abrigava o gene *bla*_{CTX-M-14} clinicamente importante e pertencia ao filogruppo A de *E. coli*. Todos os 3 isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL eram resistentes a ampicilina, cefalotina e cefotaxima. Este isolado de *E. coli* foi adicionalmente resistente à tetraciclina e o isolado de *Enterobacter cloacae* à amoxicilina-ácido clavulânico.

No estudo de Huizinga et al. (2018), os seguintes genes ESBL foram detectados em brotos de feijão: em 9 (34,6%) isolados o gene *bla*_{SHV-2}, em 5 (19,2%) o gene *bla*_{CTX-M-3}, em 4 (15,4%) tanto o gene *bla*_{SHV-27} quanto gene *bla*_{CTX-M-3}, em 3 (11,5%) o gene *bla*_{CTX-M-14}, em 3 (11,5%) o gene *bla*_{CTX-M-27} e em 2 (7,7%) o gene *bla*_{CTX-M-15} gene. Em dois isolados contendo o gene *bla*_{CTX-M-3}, o gene *bla*_{SHV-99} também foi detectado, com um nucleotídeo incompatível.

O gene ESBL mais comumente detectado no estudo atual, *bla*_{SHV-2}, também foi relatado como presente em amostras clínicas (VOETS et al., 2012). No entanto, o *bla*_{SHV} os genes nem sempre são tipados para as variantes específicas dentro do grupo, dificultando a comparação dos tipos exatos de shv (WILLEMSSEN et al., 2015; STUART et al., 2010).

De acordo com Voets et al. (2012), a distribuição populacional de beta-lactamase que confere resistência a cefalosporinas, demonstrou que os genes dos grupos ctx-m foram

detectados com mais frequência (em 446 isolados), seguidos pelos genes shv (em 56 isolados) e tem (em 46 isolados). O sequenciamento de 314 isolados revelou 16 variantes ctx-m, 3 variantes shv, 4 variantes tem, uma ges-1 e uma per-5. Os isolados ctx-m-15 foram, em média, suscetíveis a 4,5 dos 8 antibióticos testados, o que foi menor do que os isolados que abrigam tem-52, ctx-m-1 ou ctx-m-14 e um padrão de co-resistência semelhante aos isolados que abrigam shv-12 (HUIZINGA et al., 2018).

Conforme Zurfluh et al. (2015), nove cepas foram identificadas como produtoras de ESBL do tipo shv dentre as hortaliças frescas pesquisadas. Cinco (55,6%) eram shv-2 e três (33,3%) eram shv-12. Um (11,1%) produtor de shv-2a foi detectado. Cinco isolados de *K. pneumoniae* (19,2%) abrigavam shv-2, um (3,8%) carregava shv-2a e um carregava shv-12. Como achado incidental, observou-se que os genes não ESBL *bla*_{SHV-26}, *bla*_{SHV-36}, *bla*_{LEN-LIKE} e *bla*_{OKP-5A-LIKE} estavam presentes em vários isolados de *K. pneumoniae*. O isolado de *E. aerogenes* continha *bla*_{CTX-M-15} e o isolado de *C. sakazakii* transportava *bla*_{SHV-2}.

Segundo Kim et al. (2015), os tipos tem, shv e ctx-m são as famílias de ESBL clinicamente mais importantes (PATERSON; BONOMO, 2005). Todos os 19 isolados produtores de ESBL identificados no estudo com vegetais prontos para o consumo abrigavam os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, sozinhos ou em combinação, que carregavam *bla*_{SHV} sozinho, enquanto 3 (15,8%), 3 (15,8%), 4 (21,1%) e 7 (36,8%) apresentaram co-ocorrência de *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M}, respectivamente.

Tem e shv, os tipos predominantes de famílias de ESBL relatados na década de 1990 (PATERSON; BONOMO, 2005), têm sido frequentemente detectados. Um estudo relatou que vários tipos de ESBLs, incluindo os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, foram detectados com mais frequência em *E. coli* e *K. pneumoniae* no Japão (CHONG et al., 2011). Os resultados indicam que o mecanismo genético subjacente à propagação de genes ESBL tornou-se mais variável e complexo.

Ao contrário do gene ctx-m, alguns genes tem e shv são fenotipicamente ESBLs-negativos como certas substituições de aminoácidos ao redor do sítio ativo da enzima responsável pela hidrólise das cefalosporinas de terceira geração (COHEN STUART et al., 2010). Embora as variantes não ESBL, bem como as variantes ESBL, tenham sido detectadas neste estudo, todos os isolados abrigaram pelo menos uma das variantes ESBL.

Segundo Usui et al. (2019), foram identificadas e caracterizadas cepas produtoras de ESBL em vegetais frescos. Com o teste de disco duplo, foi observada sinergia em 10 *Pseudomonas* spp. isolados de 10 amostras, indicativos de produção de ESBL. Oito tipos de *Pseudomonas* spp. dessas cepas foram identificadas com base no sequenciamento do gene 16S rRNA. A PCR e o sequenciamento confirmaram que 7 desses 10 isolados abrigavam o gene *bla*_{TEM-116} e os outros três abrigavam o gene *bla*_{SHV-12}.

Foram encontradas bactérias produtoras de ESBL em 7,7% das amostras de vegetais frescos que foram testados. Embora os métodos de isolamento fossem diferentes, taxas de contaminação de 6 a 25% de bactérias produtoras de ESBL em vegetais foram relatadas em vários países (ISEPPI et al., 2018; KIM et al., 2015; REULAND et al., 2014). Os únicos genes ESBL detectados neste estudo foram *bla*_{SHV-12} e *bla*_{TEM-116}; *bla*_{CTX-M}, uma b-lactamase frequentemente isolada de gado e carnes japonesas (HAYASHI et al., 2018; HIKI et al., 2014; KOJIMA et al., 2005), não foi detectada neste estudo. Esses resultados sugerem ainda que os tipos prevalentes de genes ESBL entre os vegetais japoneses diferem daqueles em gado e carnes de varejo. Embora a origem dos genes ESBL em vegetais japoneses detectados neste estudo não seja clara, os resultados sugerem que ARGs, incluindo ESBLs, em vegetais japoneses não são apenas derivados de animais (USUI et al., 2019).

No geral, o ARG mais comumente detectado no estudo de Raseala, Ekwanzala e Momba (2020) foi *bla*_{TEM} em 85% (n = 34) de *E. coli* O157:H7 produtora de ESBL. Um total de 416 amostras de solo (n = 104), esterco (n = 104), água de irrigação (n = 104) e amostras de corpo d'água (n = 104) foram coletadas da Fazenda TUT Bon Accord. Esta propriedade tem algumas habitações existentes bem como currais de gado, e outras infraestruturas agrícolas e a maior parte da área é cultivada. Os principais animais da fazenda incluem bovinos, suínos e galinhas que receberam antibióticos veterinários para tratamento e promoção do crescimento. Planta repolho, couve-flor, brócolis, couve de Bruxelas e espinafre são cultivados nesta premissa. O ARG *bla*_{TEM} foi seguido por *bla*_{OXA}, que foi encontrado em 70% (n = 28) dos isolados. Todos os isolados do solo apresentaram *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA}, enquanto que os isolados da água de irrigação e esterco tiveram nove detecções para *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA}. Nenhum isolado transportou *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA} ou *sul1* do estrume e da massa de água.

O uso de antibióticos não é recomendado para o tratamento da infecção causada por *E. coli* O157:H7 (AMIRLAK; AMIRLAK, 2006). No entanto, relatos de cepas de *E. coli* resistentes podem exigir tratamentos em indivíduos imunocomprometidos e crianças. Assim, no estudo de Raseala, Ekwanzala e Momba (2020), foram avaliados a espinha dorsal genética de uma classe de antibióticos de primeira linha “classe beta-lactâmicos” que é usada contra bactérias Gram-negativas que conferem multirresistência a antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenêmicos (ertapenem). *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA} são os genes que conferem resistência à ampicilina e cefalotina e são caracterizados por sua alta atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina e pelo fato de serem pouco inibidos pelo ácido clavulânico.

5.2.4 Legumes e frutas como reservatório de bactérias gram negativas β-lactâmicas e resistentes à colistina

No estudo de Zurfluh et al. (2015), os autores avaliaram a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL em 68 vegetais importados da República Dominicana, Índia, Tailândia e Vietnã via aeroporto nacional de Zurique, e 101 amostras foram adquiridas na cidade de Zurique. No total, 60 produtores de ESBL foram recuperados, incluindo *E. coli* produtora de *bla*_{CTX}, *bla*_{SHV} (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{SHV-12}) e cepas de *K. pneumoniae* (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-63}, *bla*_{SHV-2}, *bla*_{SHV-2A} e *bla*_{SHV-12}). Além disso, os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{SHV-2} foram identificados em *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *C. sakazakii*, respectivamente.

Na África, o primeiro registro de ESBL e/ou GNB (resistente aos carbapenêmicos) positivo para cefalosporinase foi observado em 2019 na África do Sul. Neste relatório, 545 amostras de vegetais, incluindo espinafre, pepino, tomate, feijão verde e alface, foram coletadas de quitandas, vendedores ambulantes de carrinhos, varejistas formais e vendedores em dois mercados de agricultores de setembro de 2017 a maio de 2018. Os genes ESBL foram detectados em 39 cepas, enquanto a produção de AmpC foi observada em 20 cepas pertencentes a 10 gêneros de *Enterobacteriaceae* incluindo *S. fonticola*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *E. cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cowanii*, *Enterobacter ludwigii*, *R. aquatilis*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* e *Proteus penneri*. Diferentes genes *bla*_{CTX-M} foram obtidos, incluindo *bla*_{CTX-M-14} (n = 15),

*bla*_{CTX-M-15} (n = 6), *bla*_{CTX-M-27} (n = 4) e *bla*_{CTX-M-55} (n = 3). Além disso, o gene *bla*_{TEM-3} (n = 3), bem como os genes *bla*_{SHV} que codificam *bla*_{SHV-18} (n = 6), *bla*_{SHV-28} (n = 1) e *bla*_{SHV-154} (n = 1) foram detectados. Três isolados carregavam mais de um gene ESBL; duas cepas (*E. cowanii* e *E. coli*) continham o gene *bla*_{TEM-3} em associação com os genes *bla*_{SHV-18} e *bla*_{CTX-M-14}, respectivamente, enquanto um isolado de *E. coli* carregava *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{SHV-18} e genes *bla*_{TEM-3} (RICHTER et al., 2019).

Na China, uma pesquisa nacional investigou a prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL em alimentos de varejo, onde foram obtidos quatro isolados. Três foram identificados como *E. coli* e um como *C. freundii* isolado de vegetais de varejo, incluindo tomate, pepino e coentro. O isolado de *C. freundii* carregava os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}, enquanto dois isolados de *E. coli* carregavam os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} e uma outra cepa de *E. coli* carregava os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} (YE et al., 2018). Na Malásia, os genes ESBL ou AmpC foram detectados em dois isolados de *E. coli* (*bla*_{CTX-M-55} e *bla*_{CTX-M-65}) e dois de *K. pneumoniae* (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-28} e *bla*_{DHA-1}) de coentro e pimenta, respectivamente (KURITTU et al., 2021).

No continente americano, diferentes isolados de *Enterobacteriaceae* abrigavam os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M-1}, bem como os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY} e foram detectados em alface americana e folhas verdes, respectivamente nos Estados Unidos (BHUTANI et al., 2015; PARKER et al., 2021). Além disso, sete isolados de *E. coli* carregando o gene *bla*_{CTX-M-15} foram relatados em folhas de alface, alfafa e salsa/coentro no Equador (ORTEGA-PAREDES et al., 2018), enquanto *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{SHV-106} e *bla*_{SHV-142}-positivo *Enterobacteriaceae* foram relatados no Canadá a partir de amostras vegetais importadas (JUNG; RUBIN, 2020).

6 CONCLUSÃO

Este estudo fornece uma referência para uma melhor compreensão do risco de brotos frescos na transmissão de bactérias Gram negativas resistentes. Dado que os produtos frescos são frequentemente consumidos crus, isso permite a transferência desses genes de resistência a antibióticos para as bactérias intestinais humanas. Além disso, medidas adequadas, incluindo a melhoria da qualidade da água e das práticas agrícolas, precisam ser consideradas para garantir a segurança do consumidor em todo o mundo.

Os brotos apresentaram uma microbiota Gram negativa com grande potencial de resistência, evidenciado através da resistência fenotípica encontrada, bem como a diversidade dos genes encontrados, totalizado sete genes, sendo eles: int 1, int 2, int 3, tetb, ctx, shv e oxa. A comparação dos pontos de corte mostraram que a utilização dos parâmetros do BrCAST/EUCAST podem trazer resultados mais rigorosos de susceptibilidade a antibióticos. Os resultados demonstram a importância da área de alimentos como uma ferramenta a fim de reduzir o processo de resistência aos antibióticos.

REFERÊNCIAS

- ABATCHA, M. G.; EFFARIZAH M. E.; RUSUL, G. Prevalence, antimicrobial resistance, resistance genes and class 1 integrons of Salmonella serovars in leafy vegetables, chicken carcasses and related processing environments in Malaysian fresh food markets. **Food Control**, v. 91, p. 170-180, 2018.
- ABRANHAM, D.J. **Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery**. 5. ed. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003.
- ABIRAAMI, V. S.; GOWRIE, S. U. Sprouts as functional food- an approach towards the identification of natural antibiotic resistance breakers. **Journal of Drug delivery & Therapeutics**, v. 9, n. 1-S, p. 23-25, 2019.
- ALDA, S. et al. The dynamic of pigments level in sunflower sprouts after zinc compounds supplementing in growth. **Journal of Horticulture and Forestry**, New York, v. 15, n. 2, p. 212-216, fev. 2011.
- ALLEGRANZI, B. **New IPC recommendations from WHO-the importance of IPC actions in fighting the AMR burden**. Geneva: World Health Organization, 2016.
- ALSHIKH, N.; DE CAMARGO, A.; SHAHIDI, F. Phenolics of selected lentil cultivars: Antioxidant activities and inhibition of low-density lipoprotein and DNA damage. **Journal of Functional Foods**, St. John's, v. 18, n. 1, p. 1022-1038, jun. 2015.
- AMAKURA, Y. et al. Isolation of phenolic constituents and characterization of antioxidant markers from sunflower (*Helianthus annuus*) seed extract. **Phytochemistry Letters**, Matsuyama, v. 6, n. 2, p. 302-305, mai. 2013.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 289, n. 1036, p. 321-331, mai. 1980.
- AMIRLAK, I.; AMIRLAK B. Haemolytic uraemic syndrome: an overview (Review Article). **Nephrology**, v. 11, n. 3, p. 213-218, 2006.
- AMINOV, R.I.; MACKIE, R.I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. **FEMS Microbiology Lett**, Aberdeen, v. 271, n. 2, p. 147-161, jun. 2007.
- AN, X. et al. Impact of wastewater treatment on the prevalence of integrons and the genetic diversity of integrin. **Gene**, v. 84, p. 1-15, 2018.
- ANDERSSON, D.I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, Uppsala, v. 12, n. 7, p. 465-478, jul. 2014.

AZIMI, L. et al. Evaluation of Phenotypic Methods for Detection of Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase-Producing K. Pneumoniae in Tehran. **Journal of Medical Bacteriology**, Tehran, v. 2, n. 3, p. 26-31, 2013.

BACZEK-KWINTA, R.; SALA, A. What the antioxidant activity of sprouts depends on. **Oxidation Communications**, Sofia, v. 35, n. 4, p. 990-1000, mai. 2012.

BAE, W.K. et al. A case of hemolytic uraemic syndrome caused by Escherichia coli O104:H4. *Yons. Medical Journal*, Boston, v. 47, n. 2, p. 437-438, mai. 2006.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Potential efficacy of broccoli sprouts as a unique supplement for management of type 2 diabetes and its complications. **Journal of Medicinal Food**, Chicago, v. 16, n. 5, p. 365-382, mai. 2013.

BARBEE, L. A. et al. *In vitro* synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Seattle, v. 69, n. 6, p. 1572–1578, jun. 2014.

BARMAN, M. et al. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. **Infection and immunity**, Chicago, v. 76, n. 3, p. 907-915, mar. 2008.

BAU, H.M. et al. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and anti-nutritional factors of soybean (*Glycine max*) seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Nancy, v. 73, n. 1, p. 1-9, jun. 1997.

BEN SAID, L. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 86-92, 2015.

BENNETT, A.J. et al. Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations. **Biological Reviews**, Warwick, v. 87, n. 1, p. 52-71, fev. 2012.

BERENDONK, T.U. et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, Dresden, v. 13, n. 5, p. 310-317, mai. 2015.

BERGER, C.N. et al. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 12, n. 9, p. 2385-2397, set. 2010.

BEZANSON, G. S. et al. Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 37-42, 2008.

BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 11, n. 4, p. 671-676, mar. 2011.

BLAIR, J.M.A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, Birmingham, v. 13, n. 1, p. 42-51, jan. 2015.

BLAKE, K.L.; O'NEILL, A.J. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Leeds, v. 68, n. 1, p. 12-16, jan. 2013.

BLAAK, H. et al. Extended spectrum beta-lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. **Int. J. Food Microbiol**, v. 8, n. 16, p. 168-169, 2014.

BLAU, K. et al. The Transferable Resistome of Produce Antibiotic-Resistant Bacteria in Hydroponic Lettuce in Retail: A Comparative Survey *Salmonella enterica* serovar Kentucky recovered from human clinical cases in Maryland, USA (2011–2015). **mBio**, v. 9, n. 6, p. e01300-18, 2018.

BLICHARSKA, E. et al. Determination of microelements in sprouts grown on metal-enriched solutions by ion chromatography. **Acta Chromatographica**, Katowice, v. 26, n. 4, p. 739-747, out. 2014.

BOND, W.J.; MIDGLEY, J.J. Ecology of sprouting in woody plants: The persistence niche. **Trends in Ecology & Evolution**, Rondebosch, v. 16, n. 1, p. 45-51, jan. 2001.

BONES, A.M.; ROSSITER, J.T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**, Ashford, v. 67, n. 11, p. 1053-1067, jun. 2006.

BORA, K.S.; SHARMA, A. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. **Pharmaceutical Biology**, Luton, v. 49, n. 2, p. 211-220, abr. 2011.

BOUWMAN, L. et al. Exploring global changes in nitrogen and phosphorus cycles in agriculture induced by livestock production over the 1900–2050 period. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Utrecht, v. 110, n. 52, p. 20882–20887, mai. 2013.

BRANDL, M.T. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. **Annual Review of Phytopathology**, Albany, v. 44, n. 1, p. 367-392, 2006.

BRANDT, K.K. et al. Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. **Environment International**, Beijing, v. 85, n. 1, p. 189-205, dez. 2015.

BRAUN, J.; SWAMINATHAN, M.; ROSEGRANT, M. **Agriculture, Food Security, Nutrition and the Millennium Development Goals, Essay in 2003–2004 IFPRI Annual Report**. Washington: International Food Policy Research Institute, 2004.

BRYAN, A.; SHAPIR, N.; SADOWSKY, M. J. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 2503-2507, 2014.

BRCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST Tabelas de pontos de corte para interpreta. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, p. 1-58, 2017.

BUCHHOLZ, M.D. et al. German Outbreak of Escherichia coli O104:H4 Associated with Sprouts. **New England Journal of Medicine**, London, v. 365, n. 19, p. 1763-1770, nov. 2011.

CALLEJON, R.M. et al. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. **Foodborne Pathogens Disease**, Sevilla, v. 12, n. 1, p. 32-38, jan. 2015.

CARS, O.; MOLSTAD, S.; MELANDER, A. Variation in antibiotic use in the European Union. **Lancet**, Washington, v. 357, n. 9271, p. 1851-1853, jun. 2001.

CDC. **Antibiotic Resistance the Global Threat**. Atlanta: CDC, 2017.

CDC. **Investigation announcement: multistate outbreak of E. coli O157:H7 infections linked to romaine lettuce**. Atlanta: U.S. Department of Health & Human Service, 2011.

CDC. **Investigation update: multistate outbreak of human Salmonella Newport infections linked to raw alfalfa sprouts**. Atlanta: U.S. Department of Health & Human Service, 2010b.

CDC. Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing , Klebsiella spp . and E . coli from Rectal Swabs. **Centers for Disease Control and Prevention**, n. 5, p. 1-6, 2009.

CDC. **Multistate outbreak of E. coli O157 infections associated with beef from National Steak and Poultry Centers for Disease Control and Prevention**. Atlanta: U.S. Department of Health & Human Service, 2010.

CDC. **Outbreak of acute gastroenteritis attributable to Escherichia coli serotype O104:H21 – Helena Montana, 1994**. Atlanta: U.S. Department of Health & Human Service, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **FoodNet Annual Report**. Atlanta: U.S. Department of Health & Human Service, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – 10 States**. Atlanta: U.S. Department of Health & Human Service, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – 10 States**. Atlanta: U.S. Department of Health & Human Service, 2008.

CHADWICH, D.J.; GOODE, J.A. **Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection e Spread**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

CHALLINOR, A.J. et al. A meta-analysis of crop yield under climate change and adaptation. **Nature Climate Change**, Cali, v. 4, n. 1, p. 287-291, mar. 2014.

CHEE-SANFORD, J.C. et al. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. **Journal of Environmental Quality**, Urbana, v. 38, n. 3, p. 1086–1108, abr. 2009.

CHEN, B. et al. The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, South China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 61-67, 2015.

CHONG, Y.; ITO, Y.; KAMIMURA, T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 1499-1504, 2011.

CHOPRA, R.; ALDERBORN, G.; PODCZECK, F. The influence of pellet shape and surface properties on the drug release from uncoated and coated pellets. **International Journal of Pharmaceutics**, London, v. 239, n. 2, p. 171-178, jun. 2002.

CLSI. M 100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2017.

CLSI. M02-A12 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2015.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement. CLSI Document M100-S24. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2015.

CONZATTI, A. et al. Clinical and molecular evidence of the consumption of broccoli, glucoraphanin and sulforaphane in humans. **Nutricion Hospitalaria**, Boston, v. 31, n. 2, p. 559-569, nov. 2015.

CORNELIS, M.C.; EL-SOHEMY, A.; CAMPOS, H. GSTT1 genotype modifies the association between cruciferous vegetable intake and the risk of myocardial infarction. **American Journal of Clinical Nutrition**, Toronto, v. 86, n. 3, p. 752-758, set. 2007.

CROWE, S.J. et al. Vital signs: multistate foodborne outbreaks - United States, 2010–2014. **Morbidity and mortality weekly report**, Texas, v. 64, n. 43, p. 1221-1225, nov. 2015.

CRUZ-BRAVO, R.K. et al. The fermented non-digestible fraction of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) triggers cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cells. **Genes and Nutrition**, Boston, v. 9, n. 1, p. 1-12, jun. 2014.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Hamburg, v. 65, n. 3, p. 490-495, mar. 2010.

DAUROS, P. et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Chile in 2005 and in 2007. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, p. 502-510, 2011.

DE JONGE, J. et al. How trust in institutions and organizations builds general consumer confidence in the safety of food: a decomposition of effects. **Appetite**, Wageningen, v. 51, n. 2, p. 311-317, set. 2008.

DE, L.C.; TULIPA, A. HEALTHY FOOD FOR HEALTHY LIFE. **Journal of Global Biosciences**, Maharashtra, v. 8, n. 9, p. 6453-6468, nov. 2019.

DECHET, A.M. et al. Outbreaks caused by sprouts, United States, 1998–2010: lessons learned and solutions needed. **Foodborne Pathogens Disease**, Portland, v. 11, n. 8, p. 635-644, ago. 2014.

DEL TREDICI P. Sprouting in temperate trees: A morphological and ecological review. **Botanical Review**, Cambridge, v. 67, n. 2, p. 121-140, abr. 2001.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics**, Madison, v. 62, n. 1, p. 5-16, jan. 2009.

DEPARTMENT OF HEALTH (DH). **Doubts about sprouts environmental health guide**. Australia: Journal of Food Protection, 2006.

DEY, D.C.; JENSEN, R.G. **Stump Sprouting Potential of Oaks in Missouri Ozark Forests Managed by Even- and Uneven-aged Silviculture**. In: Anais do Segundo Simpósio do Projeto Ecossistema da Floresta Ozark de Missouri: Resultados pós-tratamento do experimento paisagístico. Newtown Square: USDA Forest Service, 2002. p. 102-113.

DEY, D.C.; JENSEN, R.G.; WALLENDORF M.J. **Single-tree harvesting reduces survival and growth of oak stump sprouts in the Missouri Ozark Highlands**. In: Proc. of the 16th Central Hardwood Forest conference. Newtown Square: USDA Forest Service, 2008. p. 26-37.

DOBLADO, R.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. Changes in vitamin C content and antioxidant capacity of raw and germinated cowpea (*Vigna sinensis* var. *carilla*) seeds induced by high pressure treatment. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 918-923, abr. 2007.

DOUBENI, C.A. et al. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. **Journal of the National Cancer Institute**, London, v. 104, n. 18, p. 1353-1362, jun. 2012.

DOYLE, M. P. Dealing with antimicrobial resistance. **Food Technol**, v. 8, n. 6, p. 22- 29, 2006.

- DUFFY, E.A. Concentrations of *Escherichia coli* and genetic diversity and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, packing shed equipment, and fresh produce in Texas. **Journal of Food Protection**, Texas, v. 68, n. 10, p. 70-79, out. 2005.
- EBERT, A.W. Sprouts, microgreens, and edible flowers: the potential for high value specialty produce in Asia. **SEAVEG**, Chiang Mai, v. 12, n. 1, p. 216-227, jan. 2012.
- EFSA. Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1. (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). **EFSA Journal**, London, v. 11, n. 1, p. 1-138, 2013.
- EGERVÄRN, M. et al. Unexpected common occurrence of transferable extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in Swedish surface waters used for drinking water supply. **Science of the Total Environment**, Munich, v. 587, n. 3, p. 466-472, jun. 2017.
- ERDOZAIN, M.S. et al. Failures in sprouts-related risk communication. **Food Control**, Manhattan, v. 30, n. 2, p. 649-656, 2013.
- EVANS, P.C. The influence of sulforaphane on vascular health and its relevance to nutritional approaches to prevent cardiovascular disease. **EPMA**, London, v. 2, n. 2, p. 9-14, mai. 2011.
- EVERS, E.G. et al. Comparative exposure assessment of *esbl* producing *Escherichia coli* through meat consumption. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 2, p. 10-17, fev. 2017.
- EWERS, C. et al. Extended-spectrum β lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 646-655, 2012.
- FAHEY, J.W.; ZHANG, Y.; TALALAY, P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Baltimore, v. 94, n. 19, p. 10367-10372, set. 1997.
- FANG, J. et al. Antimicrobial resistance profiles and characteristics of integrons in *Escherichia coli* strains isolated from a large-scale centralized swine slaughterhouse and its downstream markets in Zhejiang, China. **Food Control**, v. 95, p. 215-222, 2019.
- FAO. **The State of Food Insecurity in the World 2014**. Rome: Food and Agriculture Organization, 2014.
- FEI, Y. et al. New monoterpene glycosides from sunflower seeds and their protective effects against H₂O₂-induced myocardial cell injury. **Food Chemistry**, Hamburg, v. 187, n. 1, p. 385-390, out. 2015.
- FENG, J. L. et al. Identification and characterization of integron-associated antibiotic resistant *Laribacter hongkongensis* isolated from aquatic products in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 337-341, 2011.

FERNANDES, T.; VAZ-MOREIRA, I.; MANAIA, C.M. Neighbor urban wastewater treatment plants display distinct profiles of bacterial community and antibiotic resistance genes. **Environmental Science and Pollution Research**, Lisboa, v. 98, n. 1, p. 1-10, 2019.

FLINT, J.A. et al. Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: an international review. **Clinical Infectious Diseases**, Port of Spain, v. 41, n. 5, p. 698-704, set. 2005.

FOLEY, J.A. et al. Global consequences of land use. **Science**, Columbia, v. 309, n. 5734, p. 570-574, ago, 2005.

FONSECA, A.L. **Antibióticos na clínica diária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Epume, 1991.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Assessment of the World Food Security Situation, Food and Agricultural Organisation of the United Nations**. Rome: Committee on World Food Security, 2005.

FRANK, C. et al. Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. **Eurosurveillance**, Berlin, v. 16, n. 21, p. 1-19878, mai. 2011.

FREIRE-MORAN, L.; ARONSSON, B.; MANZ, C. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria-Time to react is now. **Drug Resistance Updat**, London, v. 14, n. 2, p. 118-124, abr. 2011.

FREITAG, C. et al. Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among Escherichia coli isolates from fresh vegetables. **Veterinary Microbiology**, v. 219, p. 63-69, 2018.

FRIAS, J. et al. Changes in nutritional value and cytotoxicity of garden cress germinated with different selenium solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 58, n. 4, p. 2331-2336, mai. 2010.

FRIESEMA, I. et al. An international outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 infection due to lettuce, September–October 2007. **Eurosurveillance**, Bilthoven, v. 13, n. 50, p. 1-19065, dez. 2008.

FUCHS, F. et al. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GALLOWAY, J.N. et al. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, Virginia, v. 320, n. 5878, p. 889-892, mai. 2008.

GAN, R.Y. et al. Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. **Trends in Food Science & Technology**, Washington, v. 59, n. 1, p. 1-14, jan. 2017.

GARDNER, G.; HALWEIL, B. **Overfed and Underfed: The Global Epidemic of Malnutrition**. In: Peterson, J. Washington: Worldwatch Institute, 2000.

- GAULT, G. et al. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, southwest France, June 2011. **Eurosurveillance**, Paris, v. 16, n. 26, p. 1-9905, jun. 2011.
- GIL, M. et al. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 37-45, 2009.
- GILLINGS, M. R. et al. Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, n. 1, p. 56-62, 2008.
- GENKINGER, J.M. et al. Fruit, vegetable and antioxidant intake and all-cause, cancer and cardiovascular disease mortality in a community-dwelling population in Washington County, Maryland. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 160, n. 12, p. 1223-1233, dez. 2004.
- GERMAN INSTITUT FOR RISK ASSESSMENT (BfR). **Bundesinstitut für Risikobewertung. EHEC outbreak: BfR confirms contamination of sprouts with O104:H4**. Disponível em: <http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2011/17/ehec_ausbruch_bfr_bestatigt_kontamination_von_sprossen_mit_o104_h4-70934.html>. Acesso em: 9 fev 2022.
- GHALY, T. M. et al. Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria. **PLoS One**, v. 12, n. 6, e0179169, 2017.
- GHANI, M. et al. Soybean Sprouts: A Review of Nutrient Composition, Health Benefits and Genetic Variation. **Plant Breeding and Biotechnology**, Baltimore, v. 4, n. 4, p. 398-412, jan. 2016.
- GREENLAND, K. et al. Nationwide outbreak of STEC O157 infection in the Netherlands, December 2008–January 2009: continuous risk of consuming raw beef products. **Eurosurveillance**, Bilthoven, v. 14, n. 8, p. 1-19129, fev. 2009.
- GRENNI, P.; ANCONA, V.; CARACCILO, A.B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, Monterotondo Scalo, v. 136, n. 1, p. 25-39, jan. 2018.
- GRIFFITH, C. J. Food safety: where from and where to? **British Food Journal**, London, v. 108, n. 1, p. 6-15, dez. 2006.
- GRIGORYAN, L.; BURGERHOF, J.G.; HAAIJER-RUSKAMP, F.M. Is self-medication with antibiotics in Europe driven by prescribed use? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Groningen, v. 59, n. 1, p. 152-156, jan. 2007.
- GUILLAUME, G. et al. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. **FEMS Microbiology Ecology**, Cambridge, v. 32, n. 1, p. 77-85, 1 abr. 2000.

- HAAS, G.P. et al. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. **Canadian Journal of Urology**, New York, v. 15, n. 1, p. 3866-3871, fev. 2008.
- HAGEN, S.F. et al. Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea L. var. acephala*). **Postharvest Biology Technology**, Tromsø, v. 51, n. 1, p. 36-42, jan. 2009.
- HAGGAR, F., BOUSHEY, R. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, Washington, v. 6, n. 212, p. 191-197, dez. 2009.
- HALL, R. M. Integrons. **Encyclopedia of Genetics**, v. 1, p. 1041-1045, 2001.
- HALLMAN, W.; CUI, C.; HOOKER, N. **Consumer responses to food recalls: 2008 national survey report**. Rutgers: Food Policy Institute, 2009.
- HAMPTON, T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. **JAMA**, Washington, v. 310, n. 16, p. 1661-1663, out. 2013.
- HANLON, N. et al. Repeated intake of broccoli does not lead to higher plasma levels of sulforaphane in human volunteers. **Cancer Letters**, Surrey, v. 284, n. 1, p. 15-20, out. 2009.
- HARTANTYO, S. H. P. et al. Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Potential, Antibiotic Resistance, and Risks to Food Safety. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 7, p. 1096-1103, 2020.
- HAYASHI, W. et al. High prevalence of blaCTX-M-14 among genetically diverse *Escherichia coli* recovered from retail raw chicken meat portions in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 98-104, 2018.
- HE, L. Y. et al. Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlot environments: identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 13120-13129, 2014.
- HIKI, M. et al. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. **Irish Veterinary Journal**, v. 67, p. 14, 2014.
- HIMEDIA. **HiMedia-Technical Data GN Broth**, 2011. Disponível em: <<http://himedialabs.com/TD/M242.pdf>>. Acesso em: 4 jul. 2019.
- HOCHSTEIN, P.; ATALLAH, A.S. The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. **Mutation Research**, Los Angeles, v. 202, n. 2, p. 363-375, dez. 1998.
- HOFMANN, R.W.; CAMPBELL, B.D. Response of *Trifolium repens* to UV-B radiation: morphological links to plant productivity and water availability. **Plant biology**, Stuttgart, v. 13, n. 6, p. 896-901, abr. 2011.

HOLMES, A.H.; MOORE, L.S.P.; SUNDSFJORD, A. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, jan. 2016.

HOOFAR, J. **Global Safety of Fresh Produce: A Handbook of Best Practise, Innovative Commercial Solutions and Case Studies**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2014.

HOOPER, D.U. et al. A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. **Nature**, Washington, v. 486, n. 1, p. 105-108, jun. 2012.

HUGHES, M. Cyanogenic polymorphism in *Trifolium repens L.* (white clover). **Heredity**, Canberra, v. 66, n. 3, p. 105-115, fev. 2001.

HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. 2017. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev**, v. 41, n. 3, p. 374-391, 2017.

HUIZINGA, P. et al. Extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) isolated from bean sprouts in the Netherlands. **PLoS One**, v. 13, n. 8, e0203338, 2018.

HUSSAIN, A.; MURTAZA, I. Effect of natural elicitors on physical and sensory qualities of fenugreek (*Trigonella Foenum-Graecum L.*) sprouts. **International Journal of Microbiology Research**, Washington, v. 10, n. 4, p. 54-63, abr. 2018.

HUTTANI, N. et al. Occurrence of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase-producing bacteria on iceberg lettuce retailed for human consumption. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 547547, 2015.

IBRAHIM, T.A.; AJONGBOLO, K.F. Phytochemical screening and antimicrobial activity of crude extracts of *Basella alba* and *Helianthus annuus* on selected food pathogens. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Daegu, v. 3, n. 2, p. 27-31, ago. 2014.

INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA (ISDA). Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. **Clinical Infectious Diseases**, London, v. 52, n. 2, p. 397-428, 2011.

INTERNATIONAL FOOD POLICY RESEARCH INSTITUTE (IFPRI). **Reaching Sustainable Food Security for All by 2020: Getting the Priorities and Responsibilities Right**. Washington: International Food Policy Research Institute, 2002.

IQBAL, A. et al. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry**, Hamburg, v. 97, n. 2, p. 331-335, nov. 2006.

ISHII, T. et al. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: Activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. **Circulation Research**, Tsukuba, v. 94, n. 5, p. 609-616, mar. 2009.

- ISEPPI, R. et al. Extended-spectrum b-lactamase, AmpC, and MBL-producing gram-negative bacteria on fresh vegetables and ready-to-eat salads sold in local markets. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, p. 1156-1164, 2018.
- JACOB, C.; MATHIASSEN, L.; POWELL, D. Designing effective messages for microbial food safety hazards. **Food Control**, Manhattan, v. 21, n. 1, p. 1-6, jan. 2010.
- JANSER, A.; KIELSTEIN, J.T. The new face of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infections. **Eurosurveillance**, Hannover, v. 16, v. 25, p. 1-19898, jun. 2011.
- JIANG, X. et al. Examination of quaternary ammonium compound resistance in *Proteus mirabilis* isolated from cooked meat products in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2417, 2017.
- JIANG, Y. et al. Characterization of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, p. 147-154, 2014.
- JONES-DIAS, D. et al. Architecture of class 1, 2, and 3 integrons from gram negative bacteria recovered among fruits and vegetables. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1400, 2016.
- JUNG, D.; RUBIN, J. E. Identification of antimicrobial resistant bacteria from plant-based food products imported into Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 319, p. 108509, 2020.
- JURADO-RABADÁN, S. et al. Detection and linkage to mobile genetic elements of tetracycline resistance gene *tet(M)* in *Escherichia coli* isolates from pigs. **BMC Vet Res**, v. 10, n. 155, 2014.
- JYRKKANEN, H.K. et al. Nrf2 regulates antioxidant gene expression evoked by oxidized phospholipids in endothelial cells and murine arteries in vivo. **Circulation Research**, Tsukuba, v. 103, n. 4, p. 1-9, out. 2008.
- KAMAL, J. Quantification of alkaloids, phenols and flavonoids in sunflower (*Helianthus annuus L.*). **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island Lagos, v. 10, n. 16, p. 3149-3151, nov. 2011.
- KARUNIAWATI, A.; SAHARMAN, Y.; LESTARI, D. Detection of Carbapenemase Encoding Genes in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients at Intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. **Acta medica Indonesiana**, Palu City, v. 45, n. 1, p. 101-106, 2013.
- KEHOE, L. et al. Biodiversity at risk under future cropland expansion and intensification. **Nature Ecology and Evolution**, Victoria, v. 1, n. 2, p. 1129-1135, jul. 2017.
- KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological indicators**, Kiel, v. 8, n. 1, p. 1-13, jan. 2008.

- KEYSER, T.L.; ZARNOCH, S.J. Stump sprout dynamics in response to reductions in stand density for nine upland hardwood species in the southern Appalachian Mountains. **Forest Ecology and Management**, Asheville, v. 319, n. 1, p.29-35, mai. 2014.
- KHAN, N.I.; SHINGE, S.; NAIKWADE, N.S. Antilithiatic effect of Helianthus annuus Linn. Leaf extract in ethylene glycol and ammonium chloride induced nephrolithiasis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 180-184, set. 2010.
- KHATTAK, A. et al. Effect of germination time and type of illumination on proximate composition of chickpea seed (*Cicer arietinum L.*). **American Journal of Food Technology**, New York, v. 3, n. 1, p. 24-32, mai. 2008.
- KIM, H.S. et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Bilthoven, v. 207, n. 3, p. 83-86, nov. 2015.
- KIM, J.Y. et al. Sulforaphane suppresses vascular adhesion molecule-1 expression in TNF- α stimulated mouse vascular smooth muscle cells: Involvement of the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathways. **Vascular Pharmacology**, Munich, v. 56, n. 3, p. 131-141, mar. 2012.
- KIM, W. et al. Inhibition of *Salmonella enterica* growth by competitive exclusion during early alfalfa sprout development using a seed-dwelling *Erwinia persicina* strain EUS78. **International Journal of Food Microbiology**, v. 312, 108374, 2020.
- KIRATISIN, P. et al. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum betalactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 349-355, 2007.
- KIUPERS, E.J. et al. Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primer**, Boston, v.1, n. 15065, p. 1-51, out. 2015.
- KOJIMA, A. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 3533-3537, 2005.
- KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, Baltimore, v. 26, n. 6, p. 459-516, mai. 2005.
- KUCHENMULLER, T. et al. Estimating the global burden of foodborne diseases-a collaborative effort. **Eurosurveillance**, Geneva, v. 14, n. 18, p. 203-211, mai, 2009.
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, Freiburg, v. 75, n. 4, p. 417-434, abr. 2009.

- KURITTU, P. et al. Plasmid-borne and chromosomal ESBL/AmpC genes in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in global food products. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 592291, 2021.
- LAILA, O.; MURTAZA, I. Seed sprouting: a way to health promoting treasure. **International Journal of Current Research and Review**, Mumbai, v. 6, n. 23, p. 70-74, jan. 2014.
- LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical Escherichia coli from different animal species in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, Switzerland, v. 91, n. 1, p. 73-84, 2 jan. 2003.
- LAXMINARAYAN, R.; BROWN, G.M. Economics of antibiotic resistance: A theory of optimal use. **Journal of Environmental Economics and Management**, Asheville, v. 42, n. 2, p. 183-206, set. 2001.
- LEBARON, P. et al. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. **FEMS Microbiology Letters**, v. 160, p. 137-143, 1998.
- LEE, Y.H. et al. Variations of seed traits, oil content and fatty acid composition in sunflower accession. **Korean Journal of Crop Science**, Seoul, v. 55, n. 1, p. 245-252, abr. 2010.
- LEE, W. et al. CTXM-55-type extended-spectrum β -lactamase-producing Shigella sonnei isolated from a Korean patient who had travelled to China. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 33, p. 141-144, 2013.
- LEI, T. et al. Characterization of class 1 integrons harboring bla_{VEB-1} in Vibrio parahaemolyticus isolated from ready-to-eat foods in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 318, p. 108473, 2020.
- LEVY, S.B. **The Antibiotic Paradox**. 1. ed. Michigan: Springer; 1992.
- LEVY, S.B. The challenge of antibiotic resistance. **Scientific American**, Boston, v. 278, n. 3, p. 32-39, mar. 1998.
- LEVY, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, Boston, v. 10, n. 12, p. 122-129, dez. 2004.
- LI, J. et al. Antibiotic-resistant genes and antibiotic-resistant bacteria in the effluent of urban residential areas, hospitals, and a municipal wastewater treatment plant system. **Environmental Science and Pollution Research**, Hangzhou, v. 22, n. 6, p. 4587-4596, mar. 2015.
- LINTSCHINGER, J. et al. Selenium-enriched sprouts. A raw material for fortified cereal-based diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Graz, v. 48, n. 11, p. 5362-5368, nov. 2000.
- LIPP, E.K.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Effects of global climate on infectious disease: The cholera model. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 757-770, out. 2002.

LIU, A. et al. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Los Angeles, v. 54, n. 4, p. 1393-1403, abr. 2010.

LIU, A.G. et al. Enhancement of broccoli indole glucosinolates by methyl jasmonate treatment and effects on prostate carcinogenesis. **Journal of Medicinal Food**, Illinois, v. 17, n. 11, p. 1177-1182, nov. 2014.

LIU, Z. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infectious Diseases**, Cambridge, v. 16, n. 2, p. 161-168, jun. 2016.

LOBELL, D.B.; TEBALDI, C. Getting caught with our plants down: the risks of a global crop yield slowdown from climate trends in the next two decades. **Environmental Research Letters**, Stanford, v. 9, n. 7, p. 1-9, jun. 2014.

LOPES, G. B. et al. Antimicrobial resistance and class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment. **Veterinary microbiology**, v. 194, p. 84-92, 2016.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, mai. 2003.

LUNA-VITAL, D.A. et al. Dietary peptides from the non-digestible fraction of: *Phaseolus vulgaris* L. decrease angiotensin II-dependent proliferation in HCT116 human colorectal cancer cells through the blockade of the renin-angiotensin system. **Food and Function**, Atlanta, v. 7, n. 5, p. 1-11, mar. 2016.

LUO, Y. et al. Effects of germination on iron, zinc, calcium, manganese, and copper availability from cereals and legumes. **CyTA – Journal of Food**, Birmingham, v. 12, n. 1, p. 22-26, dez. 2013.

MA, L. et al. The Prevalence of Integrons as the Carrier of Antibiotic Resistance Genes in Natural and Man-Made Environments. **Environmental Science & Technology**, v. 51, p. 5721-5728, 2017.

MANAIA, C.M. et al. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Porto, v. 100, n. 4, p. 1543-1557, fev. 2016.

MARGOT, H. et al. Occurrence of *Salmonella*, *L. monocytogenes*, Shiga toxin-producing *E. coli* and ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in sprout samples collected from the Swiss market. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 11, n. 2, p. 155-157, 2016.

MARLEY, A.R.; NAN, H. Epidemiology of colorectal cancer. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, Boston, v. 7, n. 3, p. 105-114, fev. 2016.

- MARSHALL, B.M.; LEVY, S.B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, Boston, v. 24, n. 4, p. 718-733, out. 2011.
- MARTINEZ-VILLALUENGA, C. et al. Influence of lupin (*Lupinus luteus* L. cv. and *Lupinus angustifolius* L. var. zapaton) and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) germination on microbial population and biogenic amines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 1, p. 7391-7398, mai. 2006.
- MARTINEZ-VILLALUENGA, C. et al. Time dependence of bioactive compounds and antioxidant capacity during germination of different cultivars of broccoli and radish seeds. **Food Chemistry**, London, v. 120, n. 1, p. 710-716, abr. 2010.
- MARTON, M. et al. The role of sprouts in human nutrition. A review. **Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria**, Birmingham, v. 3, n. 1, p. 81-117, out. 2010.
- MÁRTON, N.; MANDÓKI, Z.; CSAPÓ, J. Evaluation of biological value of sprouts. I. Fat content, fatty acid composition. **Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria**, Birmingham, v. 3, n. 1, p. 53-65, jun. 2010.
- MAXWELL, S.L. et al. The ravages of guns, nets and bulldozers. **Nature**, Chicago, v. 536, n. 7615, p. 143-145, ago. 2016.
- MAZUR, W.M. et al. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Helsinki, v. 9, n. 4, p. 193-200, abr. 1998.
- MEAD, P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Georgia, v. 5, n. 5, p. 607-625, set. 1999.
- MELLMANN, A. et al. Analysis of collection of hemolytic uraemic syndrome – associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, Washington, v. 14, n. 1, p. 1287-1290, jun. 2008.
- MICHAEL, I.; RIZZO, L.; MCARDELL, C.S. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. **Water Research**, Washington, v. 47, n. 3, p. 857-995, mar. 2013.
- MICHINO, H. et al. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City Japan, associated with consumption of white radish sprouts. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 150, n. 1, p. 787-796, abr. 1999.
- MOHAMED, S. A. et al. Detection of class 1 integron-associated gene cassettes and tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from ready to eat vegetables. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 55, p. 327-331, 2020.
- MONSTEIN, H.J. et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla SHV, bla TEM and bla CTX-M genes in Enterobacteriaceae. **APMIS**, Copenhagen, v. 115, n. 12, p. 1400-1408, dez. 2007.

MOREIRA, N.F.F. et al. Solar treatment (H₂O₂, TiO₂-P25 and GO-TiO₂ photocatalysis, photo-Fenton) of organic micropollutants, human pathogen indicators, antibiotic resistant bacteria and related genes in urban wastewater. **Water Research**, Washington, v. 135, n. 1, p. 195-206, nov. 2018.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS (NACMCF). Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines. **Journal of Food Protection**, Chicago, v. 61, n. 6, p. 1246-1259, jun. 2000.

NDI, O. L.; BARTON, M. D. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. **J. Fish Dis**, v. 34, n. 8, p. 589-599, 2011.

NSW FOOD AUTHORITY (NFA). **Report on the microbiological quality of sprouts**. Newington, 2008, 39 p.

NÜESCH-INDERBINEN, M. et al. Assessment of the Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Ready-to-Eat Salads, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts from the Swiss Market. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 6, p. 1178-1181, 2015.

NYACHUBA, D. G. Foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, Amherst, v. 68, n. 5, p. 257-269, mar. 2010.

O'NEILL, J. **Infection prevention, control and surveillance: limiting the development and spread of drug resistance**. 1. ed. London: Review on antimicrobial resistance, 2016a.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**. 1. ed. London: Review on antimicrobial resistance, 2016b.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, Arizona, v. 405, n. 6784, p. 299-304, mai. 2000.

ODUMOSU, B. T.; ADENIYI, B. A.; CHANDRA, R. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 29, 2013.

OLAIMAT, A.N.; HOLLEY, R.A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Winnipeg, v. 32, n. 1, p. 1-19, out. 2012.

ONU. **Doenças transmissíveis pela comida matam 420 mil pessoas por ano no mundo, diz ONU**, 2019. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/doencas-transmissiveis-pela-comida-matam-420-mil-pessoas-por-ano-no-mundo-diz-onu/>>. Acesso em: 7 abr. 2020.

OPAL, S. M.; MEDEIROS, A. A. **Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria Principles and Practice of Infectious Disease**. 6. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 253-270, 2005.

ORTEGA-PAREDES, D. et al. Escherichia coli hyperepidemic clone ST410-A harboring blaCTX-M-15 isolated from fresh vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador. **International Journal of Food Microbiology**, v. 280, p. 41-45, 2018.

PAJAK, P. et al. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, London, v. 143, n. 1, p. 300-306, mai. 2014.

PARKER, E. et al. AmpC- and Extended-Spectrum B-Lactamase-producing Enterobacteriaceae detected in fresh produce in central Ohio. **Journal of Food Protection**, v. 84, p. 920-925, 2021.

PARTRIDGE, S. R. et al. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p. 757-784, 2009.

PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1-61, 2018.

PASKO, P. et al. Anthocyanins: total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 1, p. 994-998, fev. 2009.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 657-686, 2005.

PENNINGTON, H. Escherichia coli O104, Germany 2011. **Lancet Infectious Diseases**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 652-653, out. 2011.

PÉREZ-BALIBREA, S.; MORENO, D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 88, n. 1, p. 904-910, jan. 2008.

PERSOONS, D.K. et al. The importance of sample size in the determination of a flock-level antimicrobial resistance profile for Escherichia coli in broilers. **Microbial Drug Resistance**, Washington, v. 17, n. 3, p. 513-519, mar. 2011.

PIMENTEL, D. et al. Environmental and economic costs of soil erosion and conservation benefits. **Science**, Boston, v. 267, n. 5201, p. 1117-1123, fev. 1995.

POIREL, L. et al. Detection of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Kenya. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Hamburg, v. 55, n. 2, p. 934-936, fev. 2011.

POORNIMA, J.; MIRUNALINI, S. Regulation of carbohydrate metabolism by indole-3-carbinol and its metabolite 3,3'-diindolylmethane in high-fat diet-induced C57BL/6J mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Munich, v. 385, n. 2, p. 7-15, abr. 2014.

PRINCIPE, L. *In vitro* activity of doripenem in combination with various antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: possible options for the treatment of

complicated infection. **Microbial Drug Resistance**, Lecco, v. 19, n. 5, p. 407-414, out. 2013.

PUPO, M. T. et al. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. 1. ed. Kerala: Research Signpost, 2006, cap. 4.

QIAO, M. et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment. **Environment International**, Beijing, v. 110, n. 1, p. 160-172, jan. 2018.

RANDALL, C. P. et al. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other Gram-negative pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Leeds, v. 57, n. 1, p. 637-639, jan. 2013.

RANDHIR, R.; SHETTY, K. Mung bean processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 197-204, 2007.

RASSAM, P. Supramolecular assemblies underpin turnover of outer membrane proteins in bacteria. **Nature**, New York, v. 523, n. 1, p. 333-336, jul. 2015.

RASEALA, C. M.; EKWANZALA, M. D.; MOMBA, M. N. B. Multilocus-based phylogenetic analysis of extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* O157:H7 uncovers related strains between agriculture and nearby water sources. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 12, p. 1899-1906, 2020.

RAY, D.K. et al. Recent patterns of crop yield growth and stagnation. Nat. Commun. 3, 1293 regulatory networks involved in plant pathogenesis by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* B728a. **PLoS One**, Texas, v. 11, n. 3, p. 1502-1513, mar. 2012.

REKHY, R. MCCONCHIE, R. Promoting consumption of fruit and vegetables for better health. Have campaigns delivered on the goals? **Appetite**, Sydney, v. 79, n. 1, p. 113-123, ago. 2014.

REULAND, E.A. et al. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 33, n. 10, p. 1843-1846, out. 2014.

REULAND, E. A. et al. High prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae carriage in Dutch community patients with gastrointestinal complaints. **Clin Microbiol Infect**, V. 19, n. 6, p. 542-549, 2013.

RICHTER, L. et al. Occurrence, identification, and antimicrobial resistance profiles of extended-spectrum and AmpC β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* from fresh vegetables retailed in Gauteng Province, South Africa. **Foodborne Pathogens Dis**, v. 16, n. 6, p. 421-427, 2019.

RICHTER, L. et al. Occurrence, Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum-and AmpC- β -Lactamase Producing *Enterobacteriaceae* Isolated From Selected

Commercial Spinach Supply Chains in South Africa. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 638, 2020.

RIZZO, L. et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. **Science of the Total Environment**, Fisciano, v. 447, n. 1, p. 345-360, mar. 2013.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS microbiology letters**, v. 245, n. 2, p. 195-203, 2005.

ROBINSON. T.P.; BU, D.P.; CARRIQUE-MAS, J. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Liverpool, v. 110, n. 7, p. 377-380, jul. 2016.

ROCHFORD, S.; PANOZZO, J. Phytochemicals for health, the role of pulses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Victoria, v. 55, n. 20, p. 7981-7994, out. 2007.

ROGERS, B. A.; SIDJABAT, H. E.; PATERSON, D. L. Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1-14, 2011.

SAINI, S.; SHARMA, S. Antidiabetic effect of Helianthus annuus L., Seeds ethanolic extract in streptozotocin-nicotinamide induced Type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 382-387, mai. 2013.

SAINI, S.; SHARMA, S. *Helianthus annuus* (Asteracea): A review. **The Journal of Phytopharmacology**, Rajasthan, v. 3, n. 2, p. 465-470, abr. 2011.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, New Zealand, v. 65, n. 5, p. 725-759, out. 2006.

SCALLAN, E. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Georgia, v. 17, n. 1, p. 7-15, jan. 2011.

SCHEUTZ, F. et al. Characteristics of the entero aggregative Shiga toxin/verotoxin-producing Escherichia coli O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. **Eurosurveillance**, Copenhagen, v. 16, n. 24, p. 1-19889, jun. 2011.

SCHIKORA, A.; GARCIA, A.V.; HIRT, H. Plants as alternative hosts for Salmonella. **Trends in Plant Science**, Giessen, v. 17, n. 5, p. 245-249, mai. 2012.

SETTLE, W.H. et al. Managing tropical rice pests through conservation of generalist natural enemies and alternative prey. **Ecology**, Bantul, v. 77, n. 7, p. 1975-1988, out. 1996.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **Journal of AOAC International**, St. John's, v. 91, n. 4, p. 914-931, ago. 2008.

SHAPIRO, T.A. et al. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Baltimore, v. 7, n. 12, p. 1091-1100, dez. 1998.

SHI, Q. et al. Co-occurrence of 3 different resistance plasmids in a multi-drug resistant *Cronobacter sakazakii* isolate causing neonatal infections. **Virulence**, v. 9, p. 110-120, 2018.

SHOHAG, M.J.; WEI, Y.; YANG, X. Changes of folate and other potential health-promoting phytochemicals in legume seeds as affected by germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Munich, v. 60, n. 36, p. 9137-9143, fev. 2012.

SIEGEL, R.L.; MOLEIRO, K.D.; JEMAL, U.M.A. Cancer statistics, 2017. **Cancer Journal for Clinicians**, Atlanta, v. 69, n. 1, p. 7-34, jan. 2017.

SILVA, C. R. et al. Resistome in gram-negative bacteria from soft cheese in Brazil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 430-440, 2020.

SILVA, L.R. et al. Glycine max (L.) Merr., *Vigna radiata* L. and *Medicago sativa* L. sprouts: A natural source of bioactive compounds. **Food Research International**, Porto, v. 50, n. 1, p. 167-175, jan. 2013.

SJÖLUND-KARLSSON, M. et al. Occurrence of beta-lactamase genes among non-Typhi *Salmonella enterica* isolated from humans, food animals, and retail meats in the United States and Canada. **Microbial Drug Resistance**, Washington, v. 19, n. 3, p. 191-197, nov. 2013.

SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M. **Natural antimicrobials for food preservation**. 1. ed. New York: Rahman M.S., p. 285-308, 1999.

SOFI. **Eradicating world hunger-key to achieving the Millennium Development Goals, Economic and Social Department (ES), Food and Agricultural Organisation, FAO**. Washington: The State of Food Insecurity in the World 2005, 2005.

STEVENSON, C. et al. Gene mobility promotes the spread of resistance in bacterial populations. **ISME Journal**, York, v. 11, n. 8, p. 1930-1932, ago. 2017.

STIRLING, A. et al. Cowden, J., 2007. An outbreak of *Escherichia coli* O157 phage type 2 infection in Paisley, Scotland. **Eurosurveillance**, Glasgow, v. 12, n. 34, p. 1-3253, ago. 2007.

STOKES, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, v. 3, p. 1669-1683, 1989.

STUART, J. C. et al. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1377-1381, 2010.

SU, J. Q. et al. Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting. **Environmental Science & Technology**, v. 29, p. 7356-7363, 2015.

SYMES, S.; GOLDSMITH, P.; HAINES, H. Microbiological Safety and Food Handling Practices of Seed Sprout Products in the Australian State of Victoria. **Journal of Food Protection**, Victoria, v. 78, n. 7, p. 1387-1391, mar. 2015.

TATE, H. et al. Comparative analysis of extended spectrum β -lactamase CTX-M-65-producing *Salmonella enterica* serovar *Infantis* isolates from humans, food animals, and retail chickens in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, e488-e517, 2017.

THOMPSON, K.A.; JOHNSON, M.T.J. Antiherbivore defenses alter natural selection on plant reproductive traits. **Evolution**, Ontario, v. 70, n. 4, p. 796-810, abr. 2016.

TILMAN, D. et al. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, Princeton, v. 292, n. 5515, p. 281-284, abr. 2011.

TSUCHIDO, T.; TAKANO, M. Sensitization by heat treatment of *Escherichia coli* K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Leeds, v. 32, n. 11, p. 1680-1683, nov. 1988.

TROCADO, N. D. et al. Phenotypic and genotypic detection of antibiotic-resistant bacteria in fresh fruit juices from a public hospital in Rio de Janeiro. *Archives of Microbiology*, v. 203, n. 4, p. 1471-1475, 2021.

TRONGJIT, S.; ANGKITTITRAKUL, S.; CHUANCHUEN, R. Occurrence and molecular characteristics of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from broilers, pigs and meat products in Thailand and Cambodia provinces. **Microbiology and Immunology**, v. 60, n. 9, p. 575-585, 2016.

TZIOUMIS, E.; ADAIR, L.S. Childhood dual burden of under- and overnutrition in low- and middle-income countries: A critical review. **Food and Nutrition Bulletin**, Chicago, v. 35, n. 2, p. 230-243, jun. 2014.

UDENIGWE, C.C.; ALUKO, R.E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, Winnipeg, v. 77, n. 1, p. 11-24, jan. 2012.

USUI, M. et al. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Bacteria on Fresh Vegetables in Japan. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 10, p. 1663-1666, 2019.

VAN DER BIJ, A. K. et al. Clinical and molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in the Rotterdam Area, Netherlands. **Antimicrobial Chemotherapeutic Agents**, v. 55, n. 7, p. 3576-3578, 2011.

VAN HOEK, A. et al. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Bilthoven, v. 204, n. 2, p. 1-8, jul. 2015.

- VASAIKAR, S. et al. Molecular characteristics and antibiotic resistance profiles of *Klebsiella* isolates in Mthatha, Eastern Cape province, South Africa. **Int. J. Microbiol.**, v. 2017, p. 7, 2017.
- VASAVI, A. et al. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of *Helianthus annuus* flowers against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced toxicity. **International Journal of Pharmacology and Toxicology**, Columbus, v. 4, n. 2, p. 132-137, jun. 2014.
- VASEN, H.F.A.; TOMLINSON, I.; CASTELLS, A. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, Washington, v. 12, n. 2, p. 88-97, mai. 2015.
- VENTOLA, C.L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P&T**, Bethesda, v. 40, n. 4, p. 277-283, abr. 2015.
- VERGARABARBERÁN, M. et al. Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. **Food Chemistry**, Hamburg, v. 8, n. 169, p. 28-33, fev. 2015.
- VICKERS, L.A. et al. Predicting forest regeneration in the Central Appalachians using the REGEN expert system. **Journal of Sustainable Forestry**, Atlanta, v. 30, n. 8, p. 790-822, 2011.
- VIDAL-VALVERDE, C. et al. New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. **European Food Research and Technology**, Madrid, v. 215, n. 6, p. 472-477, dez. 2002.
- VIETTE, M.; TETTAMANTI, C.; SAUCY, F. Preference for acyanogenic white clover (*Trifolium repens*) in arvicola terrestres. II. Generalization and new investigations. **Journal of Chemical Ecology**, Fribourg, v. 26, n. 1, p. 101-122, jan. 2000.
- VOETS, G. M. et al. Population distribution of Beta-lactamase conferring resistance to third-generation cephalosporins in human clinical Enterobacteriaceae in the Netherlands. **PLoS One**, v. 7, n. 12, e52102, 2012.
- VON WINTERSDORFF, C.J.H. et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, Maastrich, v. 7, n. 1, p. 7-10, fev. 2016.
- WALKER, D.; FOWLER, T. **Annual Report of the Chief Medical Officer: Volume Two, 2011: Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance**. Birmingham: Department of Health, 2011, 154 p.
- WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. 1. ed. Washington: ASM Press, 2003.
- WANG, F. H. et al. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. **Journal of Hazardous Materials**, v. 299, p. 215-221, 2015.

WANG, P. et al. Distribution of antibiotics, metals and antibiotic resistance genes during landfilling process in major municipal solid waste landfills. **Environmental Pollution**, v. 255, p. 113222, 2019.

WANG, P. et al. Fate of integrons, antibiotic resistance genes and associated microbial community in food waste and its large-scale biotreatment systems. **Environment International**, v. 144, p. 106013, 2020.

WANG, X. et al. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. **BMJ**, London, v. 349, n. 1, p. 44-49, jul. 2014.

WEIGEL, D.R.; PENG, C.Y.J. Predicting stump sprouting and competitive success of five oak species in southern Indiana. **Canadian Journal of Forest Research**, Vancouver, v. 32, n. 4, p. 703-712, abr. 2002.

WHO. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva, 2015, 28 p.

WILLEMSSEN, I. et al. Trends in Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) producing enterobacteriaceae and ESBL genes in a Dutch teaching hospital, measured in 5 yearly point prevalence surveys (2010–2014). **PLoS One**, v. 10, p. 1-10, 2015.

WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL (WCRFI). **Worldwide data | World Cancer Research Fund International**, 2015. Disponível em: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data2015>. Acesso em: 10 nov. 2019.

WORLD ECONOMIC FORUM (WEF). **Global Risks 2013 – Eighth Edition**. Geneva, 2013, 79 p.

WORLD ECONOMIC FORUM (WEF). **Global Risks 2014 – Ninth Edition**. Geneva, 2014, 60 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014**. Geneva, 2014, 257 p.

WHO. **Fact sheet 2016- Antibiotic resistance**. Washington, 2017, 10 p.

WRIGHT, G.D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, Hamilton, v. 13, n. 5, p. 589-594, out. 2010.

WU, D.; DOLFING, J.; XIE, B. Bacterial perspectives on the dissemination of antibiotic resistance genes in domestic wastewater biotreatment systems: beneficiary to victim. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New Jersey, v. 102, n. 2, p. 597-604, jan. 2018.

WU, Q.; WANG, M.; SIMON, J.E. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, New Brunswick, v. 1016, n. 2, p. 195-209, out. 2003.

- XIONG, L. et al. Characterization of antimicrobial resistance genes and class 1 integrase gene in raw meat and aquatic product, fresh vegetable and fruit, and swine manure in southern China. **Food Control**, v. 104, p. 240-246, 2019.
- XUE, M. et al. Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease. **Diabetes**, New York, v. 57, n. 3, p. 2809-2817, nov. 2008.
- YAN, H. et al. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in clinical bacterial isolates from patients in South China. **Journal of Health Sciences**, v. 56, p. 442-450, 2010.
- YANG, X. et al. F33: A-, B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and *blaCTX-M-55/-14/-65* in *Escherichia coli* from chickens in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 688, 2014.
- YANG, X. et al. Prevalence of Antimicrobial resistance and integron gene cassettes in *Escherichia coli* isolated from yaks (*Poephagus grunniens*) in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 274-279, 2017.
- YE, Q. et al. Antibiotic-resistant extended spectrum β -Lactamase- and plasmid-mediated AmpC-Producing *enterobacteriaceae* isolated from retail food products and the pearl river in Guangzhou, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 96, 2007.
- YEO, J.D.; SHAHIDI, F. Critical evaluation of changes in the ratio of insoluble bound to soluble phenolics on antioxidant activity of lentils during germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Hamburg, v. 63, n. 2, p. 379-381, jan. 2015.
- YEZLI, S.; LI, H. Antibiotic resistance amongst healthcare-associated pathogens in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Hampshire, v. 40, n. 5, p. 389-397, nov. 2017.
- YU, T. et al. Characterization and horizontal transfer of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from cooked meat products. **J. Infectar. Dev. Ctries**, v. 10, n. 1, p. 68-73, 2016.
- ZAKKAR, M. et al. Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, London, v. 29, n. 11, p. 1951-1857, nov. 2009.
- ZARZECKA, U.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A. Occurrence of antibiotic resistance among Enterobacterales isolated from raw and ready-to-eat food – phenotypic and genotypic characteristics. **International Journal of Environmental Health Research**, p. 1-12, 2021.
- ZEIGHAMI, H.; HAGHI, F.; HAJIAHMADI, F. Molecular characterization of integrons in clinical isolates of *betalactamase-producing Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Iran. **Journal of Chemotherapy**, Hamburg, v. 27, n. 3, p. 145-151, jun. 2015.

ZHANG, X.X.; ZHANG, T.; FANG, H.H. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Hong Kong, v. 82, n. 3, p. 397-414, mar. 2009.

ZHANG, W. et al. Wide dissemination of multidrug-resistant *Shigella* isolates in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1527-2535, 2011.

ZHENG, H. et al. Prevalence and characterization of CTX-M β -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 305-310, 2012.

ZURFFLUH, K. et al. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 9, p. 3115-3120, 2015.

ZURFLUH, K. First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 4, p. 38, 2015.