

REGINA COELI DE OLIVEIRA TÔRRES

**UTILIZAÇÃO DE ÁGUA DE COCO VERDE (*Cocos nucifera* L.)
NA COMPOSIÇÃO DE MEIOS PARA CULTURA DE *Escherichia coli***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Regine Helena Silva dos
Fernandes Vieira

Co-orientador: Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna

Florianópolis

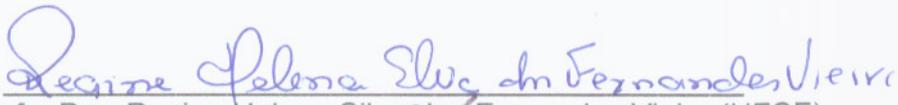
2005

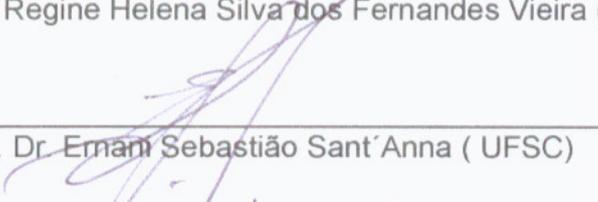
**UTILIZAÇÃO DE ÁGUA DE COCO VERDE (*COCOS NUCIFERA L.*) NA COMPOSIÇÃO
DE MEIOS PARA CULTURA DE *ESCHERICHIA COLI***

Por

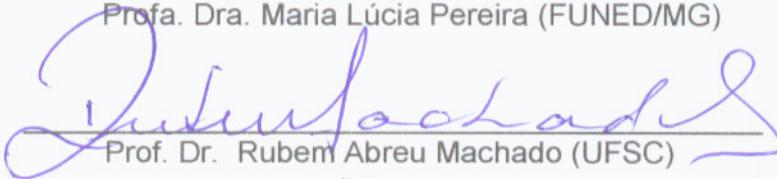
Regina Coeli de Oliviera Torres

Tese aprovada como requisito para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela Comissão formada por:

Presidente: 
Profa. Dra. Regina Helena Silva dos Fernandes Vieira (UFCE)

Membro: 
Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna (UFSC)

Membro: 
Profa. Dra. Maria Lúcia Pereira (FUNED/MG)

Membro: 
Prof. Dr. Rubem Abreu Machado (UFSC)

Coordenadora: 
Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz

Florianópolis, 21 de julho de 2005.

Meus olhos no Coqueiral

Regine Limaverde

No balançar das palmas do coqueiro
busco a paz que tanto me falta.

No verde do coqueiral
busco a esperança de um Brasil melhor.

Na água dos cocos que bebo
busco a tecnologia que me faz maior.

No talhe do coqueiro
busco a inspiração para o meu poema.

E te vejo, forte, longo, calmo.
Um coqueiro, enchendo meus olhos.
Alimento, saciando minha fome.
Uma esperança na minha vida cansada.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Regine Vieira pela orientação, aprendizado, convivência, amizade, estímulo e principalmente pela acolhida em seu laboratório, onde realizamos grande parte dos experimentos durante minha breve, mas proveitosa permanência em Fortaleza.

Ao Prof. Dr. Ernani Sant'Anna pela co-orientação, apoio, convívio e aprendizado acadêmico ao longo desses 15 anos e principalmente pelo incentivo para que eu fizesse o Doutorado.

Aos professores Dr. Adauto Fontelle (Labomar/UFC) e Dr. Paulo Ogliari (UFSC) pelas orientações e auxílios na estatística.

Ao Prof. Dr. Gustavo Fernandes Vieira (UFC/UVA) por seu empenho e disponibilidade para transmitir seus conhecimentos.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC e do Instituto de Ciências do Mar/Labomar da UFC pelas colaborações.

Aos amigos do CAL e do Labomar, Ângela, Cris, Elane, Eliane, Jaciara, Maristela, Léa e Luciano; Bel, Cris, Edite, Gleire, Hildinha, Leyla, Norma, Osca e Suzy, pela divertida convivência.

Ao secretário da Pós-Graduação, Sérgio, pela amizade e paciência com nossas solicitações “prá ontem”.

Às minhas grandes amigas Anna John, Elza e Eunice por dividirem comigo alegrias, tristezas e conhecimentos.

A Joana e Sílvio pelas minhas queridas netas Vi e Sô.

A Marcelo meu companheiro de alegrias e infortúnios, meu carinho especial para compensar a falta de tempo.

A meus pais meu agradecimento especial.

Ao CNPq pelo breve mais importante apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 CULTURA DO COCO (<i>Cocos nucifera</i> L.).....	2
2.1.1 Produção de coco (<i>Cocos nucifera</i> L.).....	3
2.2 COMPOSIÇÃO DA ÁGUA DE COCO (<i>Cocos nucifera</i> L.).....	6
2.3 MEIOS DE CULTURA.....	10
2.4 <i>Escherichia coli</i>	12
2.5 CARACTERÍSTICAS DE OSTRAS.....	14
2.6 CINÉTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 MICRORGANISMO.....	17
3.2 PESQUISA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>E. coli</i> ISOLADAS DE OSTRAS.....	17
3.3 ÁGUA DE COCO VERDE (<i>Cocos nucifera</i> L.).....	19
3.4 AVALIAÇÃO DA ÁGUA DE COCO VERDE (<i>Cocos nucifera</i> L.) PARA O CRESCIMENTO DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	19
3.4.1 Preparo dos caldos.....	20
3.4.2 Condições de cultivo.....	21
3.4.3 Avaliação do crescimento.....	22
3.5 ADIÇÃO DE NITROGÊNIO À ÁGUA DE COCO VERDE PARA O CRESCIMENTO DE <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	22

3.5.1	Preparo dos caldos experimentais.....	23
3.5.2	Condições de cultivo.....	24
3.5.3	Avaliação do crescimento.....	24
3.6	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>E. coli</i>	26
3.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	26
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
3.8.1	Influência dos suplementos nitrogenados no crescimento de <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	26
3.8.2	Influência dos tratamentos (concentração e fonte de nitrogênio) em relação à água de coco sem suplemento, no crescimento de <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	27
3.8.3	Influência dos meios de cultura (água de coco, CL e TSB) no crescimento de <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	28
3.8.4	Influência dos meios de cultura sobre os coeficientes de regressão (b) da cultura de <i>E. coli</i>	28
3.8.4.1	Comparação entre os coeficientes (b) de regressão de nove populações de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	28
3.8.4.2	Comparação entre os coeficientes (b) de regressão da população de duas cepas de <i>Escherichia coli</i>	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5	CONCLUSÕES.....	52
	RECOMENDAÇÕES.....	54
	ANEXO.....	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE TABELAS

1	Produção brasileira de coco (<i>Cocos nucifera</i> L.), no período de 2000-2004, por região geográfica e principais Estados produtores (mil frutos).....	4
2	Área (hectare) colhida de coco (<i>Cocos nucifera</i> L.) e rendimento médio (frutos por hectare), no período de 2000-2004, por região geográfica e principais Estados produtores.....	5
3	Determinação dos tratamentos (caldos) utilizando água de coco verde (<i>Cocos nucifera</i> L.), variedade gigante (Ceará, Brasil), para o crescimento de <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	21
4	Elaboração de caldos à base de água de coco verde, enriquecida com diferentes fontes de nitrogênio, para o crescimento de <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	23
5	Resultado das determinações de volume (mL) e pH da água de coco verde utilizada nos experimentos.....	31
6	População inicial e final de <i>E. coli</i> ATCC 25922 a 35 °C e valores de pH dos caldos.....	32
7	População de <i>E. coli</i> ATCC 25922 (ln UFC/mL) a 37 °C em caldos à base de água de coco verde enriquecida com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio e em Caldo 1, CL e TSB.....	36
8	Coefficientes de Correlação, r , entre DO e \log_{10} UFC/mL e seus intervalos de equivalência, determinados em caldos de cultura com <i>E. coli</i> , a 37 °C.....	38
9	Velocidade específica de crescimento, μ , tempo de duplicação, t_d , e duração da fase exponencial da cultura de <i>E. coli</i> ATCC 25922 em caldos água de coco, CL e TSB.....	48
10	Velocidade instantânea de crescimento, μ (h^{-1}), de duas cepas de <i>E. coli</i> a 37 °C em caldos à base de água de coco, CL e TSB.....	49

LISTA DE FIGURAS

- 1 Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 1, à base de água de coco verde; ● In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,6226 + 1,0191X$, $r^2 = 0,9889$ 40
- 2 Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 2, à base de água de coco verde enriquecida com 0,5 % de peptona; ■ In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 15,1629 + 1,2181X$, $r^2 = 0,9769$ 41
- 3 Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 3, à base de água de coco verde enriquecida com 1,0 % de peptona; ◆ In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 15,1316 + 1,5607X$, $r^2 = 0,9768$ 41
- 4 Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 4, à base de água de coco verde enriquecida com 0,1 % de sulfato de amônia; ■ In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,9804 + 1,2480X$, $r^2 = 0,9731$ 42
- 5 Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 5, à base de água de coco verde enriquecida com 0,5 % de sulfato de amônia; ◆ In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,0998 + 1,5995X$, $r^2 = 0,9660$ 43
- 6 Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 6, à base de água de coco verde enriquecida com 0,5 % de extrato de levedura; ■ In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,7856 + 1,5043X$, $r^2 = 0,9882$ 44
- 7 Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 7, à base de água de coco verde enriquecida com 1,0 % de extrato de levedura; ◆ In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,5281 + 1,6630X$, $r^2 = 0,9714$ 44
- 8 Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo CL; ● In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 13,3356 + 1,1026X$, $r^2 = 0,9863$ 45
- 9 Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo TSB; ● In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 15,0419 + 1,1912X$, $r^2 = 0,9763$ 46
- 10 Curva de crescimento de *Escherichia coli* CE-7A em Caldo 2; ■ In UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,8369 + 1,4929X$, $r^2 = 0,9605$ 46

RESUMO

Escherichia coli ATCC 25922 foi cultivada em água de coco verde. Tal substrato foi testado *in natura* e diluído, submetido ou não a ajuste de pH e a dois processos de esterilização, filtração e autoclavação. Dos nove caldos testados – população inicial de 10^5 UFC/mL e incubação a 35 °C/24 h - foi selecionado um, e denominado Caldo 1, devido à viabilidade econômica e crescimento bacteriano de 3 ciclos logarítmicos. O Caldo 1 - água de coco verde diluída em partes iguais (1:1) com água destilada, esterilizada a 121 °C/10 min e pH 7,1 – foi utilizado para determinar a velocidade específica de crescimento bacteriano e após suplementação, respectivamente, com 0,5 e 1,0 % de peptona (Caldos 2 e 3) e extrato de levedura (Caldos 6 e 7) e 0,1 e 0,5 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Caldos 4 e 5) foram inoculados até 10^5 - 10^6 UFC/mL e incubados a 37 °C com agitação de 200 rpm. Comparativamente, foram testados os Caldos Lactose (CL) e Soja Triptona (TSB), e uma cepa de *E. coli* isolada de ostras, somente em Caldo 2. Foram obtidos resultados significativos ($P < 0,05$) entre o Caldo 1 e os Caldos 7, 5, 3 e 6, com tempos de duplicação, t_d , de 40,8; 25,0; 26,1; 26,6 e 27,6 min, respectivamente; e entre os Caldos 7 e CL (37,7 min). Resultados semelhantes ($P > 0,05$) foram observados entre os Caldos 2, 4 e TSB, t_d de 34,1; 33,3 e 34,9 min, respectivamente, e no Caldo 2 com a cepa isolada de ostras, t_d de 27,9 min.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; água de coco verde; velocidade de crescimento.

ABSTRACT

Escherichia coli ATCC 25922 was grown in green coconut water. This substrate was tested *in natura* and diluted, submitted or not to pH adjustments and to two sterilization processes, filtration and autoclavation. From the nine broths tested – initial population of 10^5 CFU/mL and incubation at 35 °C/24 h - one was selected and called Broth 1, due to its economic advantages and bacterial growth of 3 logarithmic cycles. Broth 1 - green coconut water diluted (1:1) with distilled water, sterilized at 121 °C/10 min and pH 7.1 - was used to determine bacterial specific growth rate and, after supplementation respectively with 0.5 and 1.0 % peptone (Broths 2 and 3) and yeast extract (Broths 6 and 7) and 0.1 and 0.5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Broths 4 and 5), was inoculated to 10^5 - 10^6 UFC/mL and incubated at 37 °C with 200 rpm agitation speed. For comparison, Lactose Broth (LB) and Tryptic Soy Broth (TSB) were tested, and one *E. coli* strain isolated from oysters only in Broth 2. Significant results ($P < 0.05$) were obtained between Broth 1 and Broths 7, 5, 3 and 6, with doubling time - t_d of 40.8, 25.0, 26.1, 26.6 and 27.6 min, respectively; and between Broth 7 and LB (37.7 min). Similar results ($P > 0.05$) were observed between Broths 2, 4 and TSB, t_d was 34.1, 33.3 and 34.9 min respectively, and in Broth 2 with the strain isolated from oysters, t_d of 27.9 min.

Keywords: *Escherichia coli*; green coconut water; growth rate.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o 4º produtor mundial de coco, com uma produção estimada em cerca 3 milhões de toneladas (aproximadamente 2 bilhões de frutos) em 2004. Nos últimos dez anos (1995-2004) o aumento da produção foi superior a 370%, enquanto a taxa mundial foi inferior a 10%, passando o país do 9º para o 4º lugar, atrás apenas de Filipinas, Indonésia e Índia (FAO, 2004).

A região Nordeste do Brasil é responsável por mais de 70% da produção nacional de coco e 85% da área (ha) colhida, onde se destacam os Estados da Bahia, Ceará e Sergipe (IBGE, 2004).

O coqueiro-gigante é a variedade mais comum em todo o Nordeste brasileiro (SREBERNICH, 1998; TASSARO, 1998).

A água de coco (*Cocos nucifera* L.) é uma solução ácida natural e estéril que contém sais minerais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras e fatores de crescimento e, por isso, vem sendo estudada como meio de cultivo e promotor de crescimento celular (BLUME *et al.*, 1998); como solução de rehidratação oral no tratamento de enfermidades diarreicas (FAGUNDES NETO *et al.*, 1989); como diluente do sêmen de caprinos e ovinos (NUNES & SALGUEIRO, 1999) e como meio de cultivo de embriões bovinos (BLUME *et al.*, 1998).

Considerando a disponibilidade, o baixo custo e a composição química da água de coco verde (*Cocos nucifera* L.), planejou-se um experimento com o objetivo de utilizar a água de coco verde como meio de crescimento para *Escherichia coli* - um microrganismo pouco exigente em termos de nutrientes e um importante indicador das condições higiênico-sanitárias dos alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DO COCO (*Cocos nucifera* L.)

A palmeira tropical que dá o coco-da-praia, coco-da-baía ou, simplesmente, coco (*Cocos nucifera* L.), é de origem controversa. Para alguns é oriunda da Índia, para outros é proveniente de ilhas do Pacífico e há ainda os que a julgam africana. No Brasil - na Bahia - o coco chegou em 1553, a bordo das embarcações portuguesas, provenientes das ilhas de Cabo Verde, para onde também tinha sido levado pelos portugueses, como relata o viajante Gabriel Soares de Sousa. Da região do Recôncavo Baiano, espalhou-se por toda a costa do Brasil levado, provavelmente, por dispersão natural, através das correntes marítimas (TASSARO, 1998).

O coqueiro está presente em mais de 80 países ao redor do globo – na Ásia, na África, na América Central e do Sul e no Caribe - e tem grande importância na vida e na economia de várias populações regionais. Ele vive bem na praia, próximo do mar e do sal, mas esta não é a única condição para que seja cultivado com sucesso. Atualmente, estão em andamento projetos de cultivo do coqueiro-da-baía em áreas irrigadas do sertão nordestino com bons rendimentos (TASSARO, 1998).

Os cocos produzidos no Brasil são das variedades gigante, anã e híbrida. A variedade gigante produz frutos grandes, de coloração verde ou marrom e polpa espessa, indicada para uso na indústria e consumo *in natura*. Podem atingir até 35 m de altura; a frutificação tem início aos 5 - 6 anos de idade e em condições ideais, cada planta pode produzir 60 a 80 frutos/ano ou até 120 frutos/ano em culturas irrigadas. Sua vida útil é de 60 a 80 anos com produção durante todo o ano. A variedade anã no Brasil, é representada pelas subvariedades de cores verde, vermelha e amarela. Podem atingir 12 m de altura e iniciam a produção, em média, com 3 anos de idade. Os frutos são pequenos, com pouca espessura de polpa e destina-se ao consumo *in natura* (água). Em culturas não irrigadas, apresenta potencial para produção de 100 a 120 frutos/planta/ano, distribuída durante o ano todo, com uma vida útil de 30 a 40 anos. A variedade híbrida é restrita, em virtude da

pequena quantidade produzida e dos elevados custos das sementes (MINAS GERAIS, 2001).

2.1.1 Produção de coco (*Cocos nucifera* L.)

Segundo dados da FAO (2004), a produção mundial estimada de coco em 2004 foi de 53.602.584 toneladas em uma área colhida de 10.728.630 hectares. A Ásia foi responsável por cerca 85% da produção. Os maiores produtores foram: Indonésia, Filipinas e Índia com 15.650.000; 13.700.000 e 9.700.000 toneladas, respectivamente. O Brasil foi o 4º produtor, com 2.959.880 toneladas.

A Ásia concentrou cerca de 83% da área (ha) colhida; África 6%, Oceania 4%, América Central e Caribe 3% e América do Sul 3%. Em termos de rendimento, a América do Sul apresentou cerca de 10 t/ha, América Central e Caribe 5 t/ha, Ásia 5 t/ha, Oceania 4 t/ha e a África 3 t/ha. O Brasil foi responsável por cerca de 85% da área colhida e da produção na América do Sul, com um rendimento de 10,8 t/ha (FAO, 2004).

Segundo dados do IBGE (2004), a produção brasileira de coco estimada para a safra de 2004 foi de aproximadamente 2 bilhões de frutos (Tabela 1). Isto representa um aumento de 100% no período de 10 anos (1995-2004) e de 50% nos últimos 5 anos (Tabela 2). Esse dado é ainda mais significativo se considerarmos que o aumento da área (ha) colhida foi de apenas 13% de 1995-2004.

A Região Nordeste é a principal produtora brasileira de coco (*Cocos nucifera* L.), com mais de 1,4 bilhões de frutos. As Regiões Norte e Sudeste produzem cerca de 260 milhões de frutos cada. O maior produtor Nacional é o Estado da Bahia com mais de 680 milhões de frutos, seguidos do Pará, Ceará, e Espírito Santo, com 240, 228 e 165 milhões de frutos, respectivamente (Tabela 1). Entretanto, em termos de produtividade, destaca-se o Espírito Santo, com 14 mil frutos/ha (Tabela 2).

Da produção brasileira de coco (*Cocos nucifera* L.), 80% é comercializada na forma seca e 20% destina-se ao consumo *in natura* - água de coco verde (*Cocos nucifera* L.) (BILSKA, LEITE & SAVITCI, 1995). Considerando esse percentual, a

quantidade de coco verde (*Cocos nucifera* L.) disponível para o consumo em 2004 foi de cerca de 400 milhões de frutos.

TABELA 1 - Produção brasileira de coco (*Cocos nucifera* L.), no período de 2000-2004, por região geográfica e principais Estados produtores (mil frutos).

País, Região e Estado	Ano				
	2000	2001	2002	2003	2004 ⁽¹⁾
Brasil	1.301.411	1.420.547	1.928.236	1.900.571	1.954.369
Norte	162.175	211.095	248.436	227.454	240.664
Nordeste	932.960	960.569	1.398.951	1.449.627	1.441.467
Sudeste	186.239	225.332	251.885	223.490	272.238
Sul	-	61	172	445	-
Centro-Oeste	20.037	23.490	28.792	43.337	-
Pará	154.957	197.383	220.361	227.454	240.664
Bahia	402.937	424.444	731.208	705.311	680.427
Ceará	193.729	203.769	202.366	217.607	228.204
Rio Grande do Norte	87.941	88.303	90.609	91.829	80.881
Sergipe	91.985	90.413	98.298	119.165	122.547
Espírito Santo	132.487	152.790	155.317	135.937	165.705

- dados não informados.

⁽¹⁾ estimativa em dezembro de 2004.

Fonte: IBGE (2004).

TABELA 2 - Área (hectare) colhida de coco (*Cocos nucifera* L.) e rendimento médio (frutos por hectare), no período de 2000-2004, por região geográfica e principais Estados produtores.

País, Região e Estado	Ano									
	2000		2001		2002		2003		2004 ⁽¹⁾	
	Ha	frutos/ha	ha	frutos/ha	ha	frutos/ha	ha	frutos/ha	ha	frutos/ha
Brasil	264.311	4.923	273.338	5.197	276.598	6.971	290.653	6.539	273.810	7.138
Norte	17.820	9.100	21.670	9.741	23.706	10.479	22.292	10.421	23.660	10.172
Nordeste	230.470	4.048	232.874	4.124	232.241	6.023	251.547	6.153	231.277	6.233
Sudeste	14.134	13.176	16.509	13.649	17.807	14.145	16.814	13.292	18.873	14.425
Sul	-	-	12	5.083	38	4.526	48	9.270	-	-
Centro-Oeste	1.887	10.618	2.273	10.334	2.806	10.260	3.559	12.176	-	-
Pará	16.836	9.203	20.354	9.697	21.785	10.115	22.292	10.203	23.660	10.172
Bahia	76.775	5.248	80.342	5.282	75.800	9.646	96.246	7.328	76.975	8.840
Ceará	37.316	5.191	38.160	5.339	38.799	5.215	39.465	5.514	40.063	5.696
Rio Grande do Norte	33.850	2.597	32.849	2.688	33.207	2.728	33.475	2.743	30.266	2.672
Sergipe	45.720	2.011	45.304	1.995	42.254	2.326	39.994	2.980	39.876	3.073
Espírito Santo	8.895	14.894	10.037	15.222	10.208	15.215	10.485	12.965	11.596	14.290

- dados não informados.

⁽¹⁾ estimativa em dezembro 2004.

Fonte: IBGE (2004).

2.2 COMPOSIÇÃO DA ÁGUA DE COCO (*Cocos nucifera* L.)

A água de coco contém a maioria dos nutrientes necessários para o crescimento microbiano, embora a adição de nitrogênio pareça ser essencial para o seu crescimento (SMITH & BULL, 1976). A composição da água varia em função da variedade do coco, do ambiente no qual ele cresce e do estágio de maturação (GRIMWOOD, 1975).

Os principais componentes da água de coco são glicose, frutose, sacarose e sorbitol, podendo atingir uma concentração total de até 8 % em p/v (SMITH & BULL, 1976). Dentre outros componentes encontram-se: minerais, aminoácidos e algumas vitaminas (PANDALAI, 1958).

O coco disponibilizado para consumo (variedade anã, Sergipe, Brasil) encontra-se, geralmente, entre o 5º e 7º mês de maturação do fruto; até o 4º mês o fruto apresenta tamanho extremamente reduzido e após o 8º mês seu aspecto exterior começa a apresentar sinais de deterioração. Resultados de pesquisa mostram que do 4º ao 12º mês de maturação, o volume de água foi maior entre o 5º e 7º mês (458, 531 e 456 mL respectivamente), seguido de um declínio constante e acentuado até 134 mL no 12º mês (FAGUNDES NETO *et al.*, 1989).

Volumes de água de 95 a 330 mL foram encontrados no 6º mês de maturação, em 8 variedades de coco na Índia. O volume maior correspondeu a variedade híbrida - gigante x anão verde (LOUIS, 1977)

SREBERNICH (1998) estudando cocos da variedade gigante (Ceará, Brasil), das safras de 1993, 94 e 95, encontrou volumes maiores de água (421,7 a 484,8 mL) no 7º mês de maturação do fruto. As médias dos volumes no 6º, 7º, 8º, 9º e 10º mês foram de 387, 451, 368, 332 e 273 mL, respectivamente.

O pH da água varia de acordo com o grau de maturação. FAGUNDES NETO *et al.* (1989) determinaram valores crescentes de pH de 4,25; 4,99; 5,36 e 5,54, respectivamente, em frutos entre o 5º e 8º mês; no 9º mês declinou para pH 5,31 e voltou a aumentar para pH 5,58 e 5,96 no 10º e 11º mês; no 12º mês o pH foi de 5,53.

SREBERNICH (1998) observou uma tendência de elevação progressiva do pH da água a partir do 6º até o 8º mês de idade, seguida de queda também progressiva até o 10º mês. Essa tendência foi observada em cocos das variedades gigante e híbrida PB-121 (Ceará, Brasil) de três safras diferentes. Do 6º ao 10º mês, as médias dos valores de pH foram 5,10; 5,25; 5,40; 5,20 e 5,08 para a variedade gigante e 5,12; 5,38; 5,48; 5,41 e 5,14 para a variedade híbrida PB-121.

Em cocos-gigantes (Ceará, Brasil) a concentração de glicose na água (g/100 mL) diminuiu com o aumento da idade do fruto; com média de 2,54 % no 6º mês, para 2,43 %, 2,17 %, 1,86 % e 0,94 % do 7º ao 10º mês. Comportamento semelhante foi observado para a variedade híbrida PB-121, embora os teores de glicose tenham sido menores, com médias de 1,96 %; 1,79 %; 1,71 %; 1,31 % e 1,20 % (SREBERNICH, 1998).

A concentração de glicose na água de coco da variedade híbrida anã x gigante (Nova Guiné) aumentou de 1,39 % para 2,4 % entre o 4º e 7º mês de maturação do fruto e diminuiu para 1,97 % e 1,69 % no 10º e 11º meses. O teor de sorbitol, determinado a partir do 6º mês apresentou valores de 0,62 % a 0,15 %. A concentração de açúcares totais até o 9º mês variou de 3,24 % até 5,09 %, e decresceu até 2,26 % no 11º mês (PUE *et al.*, 1992).

MACIEL, OLIVEIRA & SILVA (1992) encontraram teores de 2,1 % de açúcares totais e 1,9 % de açúcares redutores em água de coco verde da variedade anã (Pernambuco, Brasil) no 7º mês de maturação.

Em lotes de coco de Trinidad, classificados em 3 estágios de maturação de acordo com a cor - verde, amarela e marrom (maduro), foram encontrados concentrações de glicose de 20,97 g/L; 23,04 g/L e 21,87 g/L de água, respectivamente (ADAMS & BRATT, 1992).

Teores de glicose mais elevados foram encontrados na água de coco da variedade anã (Sergipe, Brasil) dos 5 aos 8 meses de idade, 2,6 %, 3,7 %, 4,0 % e 3,4 % nessa ordem (FAGUNDES NETO *et al.*, 1989).

Os teores de frutose na água também diminuíram gradativamente com o aumento da idade do fruto. A variedade gigante apresentou concentrações mais elevadas (médias de 2,47 % a 0,9 %) do que a variedade híbrida PB-121 (médias de 1,53 % a 0,52 %), do 6º ao 10º mês. Enquanto os teores de sacarose aumentaram com a idade do fruto, a variedade híbrida PB-121 apresentou valores mais elevados (médias de 0,4 % a 1,8 %) em relação à variedade gigante (médias 0,14 % a 0,76 %) do 6º ao 10º mês (SREBERNICH, 1998).

Segundo MATHEW (1991) e SHIVASHANKAR (1991), a concentração de proteína na água de coco aumenta de 0,13% no coco verde para 0,29% no maduro; enquanto que KUBERSKI *et al.* (1979) encontraram valores de 0,4% a 1,1% na água de coco das variedades anã e gigante (Ilhas Gilbert) com estágio de maturação entre 5 e 10 meses.

Dos aminoácidos livres presentes na água de coco verde, aproximadamente 70% são formados por glutamina, arginina, asparagina, alanina e ácido aspártico; enquanto que na água do coco maduro 75% dos aminoácidos livres são constituídos de ácido glutâmico e ácido γ -aminobutírico (SHIVASHANKAR, 1991).

A concentração de lipídios totais (g/100 mL) encontrada na água de coco anão verde (Sergipe, Brasil) apresentou grande variação, sendo maior entre o 5º e 7º mês de maturação do fruto, com valores de 0,27%, 0,16%, 0,20%, respectivamente. Entre o 8º e 9º mês diminuiu de 0,15% para 0,05%, voltando a aumentar para valores de 0,12%, 0,11% e 0,13% do 10º ao 12º meses (FAGUNDES NETO *et al.*, 1989).

No teor de potássio da água de coco também ocorre variação durante o estágio de maturação, principalmente em função da disponibilidade de potássio no solo (KUBERSKI *et al.*, 1979).

Em cocos da variedade híbrida (Nova Guiné), os teores de potássio aumentaram de 2,13 g/L no 4º mês para 3,56 g/L no 11º mês (PUE *et al.*, 1992). Esse aumento progressivo com a idade do fruto também foi observado por SREBERNICH (1998), que para uma mesma safra obteve concentrações de 2,4 a

3,0 g/L e 2,3 a 2,7 g/L, respectivamente, para as variedades gigante e híbrida PB-121, entre o 6º e o 10º mês.

Dados divergentes foram obtidos por FAGUNDES NETO *et al.* (1989) em cocos da variedade anã plantados na área litorânea de Sergipe (Brasil); os teores de potássio na água diminuíram de 2,61 g/L no 6º mês para 2,11 g/L no 11º mês, caindo ainda mais para 1,66 g/L no 12º mês. Enquanto MACIEL, OLIVEIRA & SILVA (1992) encontraram para mesma variedade anã (Pernambuco, Brasil) um teor de apenas 0,02 g/L no 7º mês de maturação.

O teor de sódio verificado na água do coco anão (Sergipe, Brasil) entre o 6º e 9º mês foi de cerca de 30 mg/L, 114 mg/L, 259 mg/L e 339 mg/L, nessa ordem; caindo para 299 mg/L no 12º mês (FAGUNDES NETO *et al.*, 1989). MACIEL, OLIVEIRA & SILVA (1992) encontraram apenas 38,8 mg/L no 7º mês de maturação para a mesma variedade (Pernambuco, Brasil). Valores mais elevados foram relatados por JAYALEKSHMY *et al.* (1986) em coco da variedade gigante (Costa Oeste da Índia), 210 mg/L no 6º mês até 520 mg/L no 11º mês. SREBERNICH (1998) observaram aumento do teor com o aumento da idade do fruto e variações em função da safra e da variedade. Do 6º ao 10º mês e safras de 1993, 94 e 95, a variedade híbrida PB-121 apresentou: 84 a 241 mg/L, 23 a 103 mg/L e 17 a 55 mg/mL e a gigante: 30-114 mg/mL, 11-35 mg/mL e 36 a 171 mg/mL.

A concentração de cálcio na água de coco da variedade anã, no 7º mês, foi de 596 mg/L (MACIEL, OLIVEIRA & SILVA, 1992). Enquanto FAGUNDES NETO *et al.* (1989) obtiveram para a mesma variedade e estágio de maturação, apenas 127,8 mg/L. Os teores relatados por SREBERNICH (1998) diminuíram com o aumento da idade (6º ao 10º mês), principalmente na variedade gigante, com uma redução de cerca de 38% (246 a 152 mg/mL), 32% (266 a 179 mg/mL) e 36% (247 a 158 mg/mL), respectivamente, para as safras de 1993, 94 e 95; no caso da variedade híbrida a redução foi de cerca de 18% (272 a 225 mg/mL), 7% (267 a 247 mg/mL) e 20% (171 a 136 mg/mL).

Os teores de magnésio encontrados na água de coco da variedade anã (Sergipe, Brasil), entre o 6º e 10º mês, foram de cerca de 37, 47, 45, 48 e 57 mg/mL

(FAGUNDES NETO *et al.*, 1989). Enquanto SREBERNICH (1998) obteve teores decrescentes com o aumento da idade do fruto (6 a 10 meses) de 129 a 79 mg/mL, 97 a 41 mg/mL e 134 a 73 mg/mL para a variedade gigante; a variedade híbrida apresentou concentrações de 143 a 97 mg/mL, 89 a 74 mg/mL e 102 a 74 mg/mL, respectivamente, nas safras de 1993, 94 e 95.

Outros elementos, como manganês, zinco, ferro e cobre, ocorrem em pequenas concentrações na água de coco. Com exceção do cobre, todos apresentaram aumento progressivo do 6º ao 10º mês de maturação do fruto. No 7º mês de idade, em três safras consecutivas das variedades gigante e híbrido, foram encontrados os respectivos teores de manganês: 172, 201 e 110 µg/100 mL e 272, 454 e 170 µg/100 mL; zinco: 74, 72 e 47 µg/100 mL e 61, 60 e 53 µg/100 mL; ferro: 22, 33 e 27 µg/100 mL e 16, 32 e 20 µg/100 mL e cobre: 6, 6 e 3 µg/100mL e 10, 6 e 3 µg/100 mL (SREBERNICH, 1998).

2.3 MEIOS DE CULTURA

Os microrganismos requerem alguns nutrientes básicos para seu desenvolvimento, que variam de acordo com o organismo, podendo ser divididos em duas classes: macronutrientes e micronutrientes. Os primeiros são necessários em quantidades maiores por serem os principais constituintes dos compostos orgânicos celulares. São formados por carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio e enxofre e totalizam cerca de 90 % da composição celular. Os demais 10 % são constituídos por micronutrientes, como potássio, cálcio, zinco, ferro, manganês entre outros (BARBOSA & TORRES, 1998).

Alguns microrganismos necessitam de fatores de crescimento, dentre eles as vitaminas adquirem importância por participarem de diversas coenzimas envolvidas em várias reações metabólicas. As bactérias Gram-positivas são mais exigentes em suas necessidades vitamínicas do que as Gram-negativas, as quais podem sintetizar todos os seus fatores de crescimento. Os minerais, embora em quantidades mínimas, são indispensáveis para a multiplicação de microrganismos por seu envolvimento em muitas reações enzimáticas. Entre eles destacam-se o sódio, o

potássio, o cálcio e o magnésio. O pH adverso pode afetar, principalmente, a respiração dos microrganismos por ação em suas enzimas e no transporte de nutrientes para a célula microbiana. O prolongamento da fase lag no crescimento microbiano pode ser provocado também por pH desfavorável (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As necessidades nutricionais das células microbianas são supridas em laboratório através de uma variedade de meios de cultura, sendo empregado duas categorias principais: os meios quimicamente definidos (sintéticos) e os meios artificiais. Os primeiros são de composição química definida, formulados a partir de substâncias químicas puras orgânicas e/ou inorgânicas; enquanto os meios artificiais, cuja exata composição química não é conhecida, são compostos por um número limitado de substâncias complexas, extratos de plantas ou de animais, tais como peptona, extratos de carne e de levedura (CAPPUCCINO & SHERMAN, 1998).

Peptona é obtida a partir da hidrólise de matéria protéica, como carne, caseína e gelatina. Constitui a principal fonte de nitrogênio orgânico, podendo conter algumas vitaminas e, às vezes carboidratos, dependendo do tipo de matéria-prima. Extrato de carne é o extrato aquoso de tecido muscular, concentrado sob a forma de pasta; contém carboidratos, compostos de nitrogênio orgânico, vitaminas hidrossolúveis e sais. Extrato de levedura é o extrato aquoso de leveduras, comercializado sob a forma de pó; é uma fonte rica em vitaminas B e contém ainda compostos orgânicos de nitrogênio e carbono (PELCZAR, REID & CHAN, 1980).

Os meios de cultura são classificados de acordo com sua aplicação ou função em: meios enriquecidos, meios seletivos, meios diferenciais, meios de dosagem, meios para contagem de microrganismos, meios para identificação de microrganismos e meios de estocagem ou manutenção. São diferenciados ainda de acordo com seu estado físico, em meios sólidos, meios semi-sólidos e meios líquidos (PELCZAR, REID & CHAN, 1980).

2.4 *Escherichia coli*

A denominação do gênero foi em homenagem a Theodor von Escherich, que em 1885, descreveu o organismo isolado de fezes de crianças, inicialmente denominado como *Bacterium coli commune* e também por *Bacillus coli comunis* (BELL & KYRIAKIDES, 1998)

É a espécie predominante entre os microrganismos anaeróbios facultativos da microbiota intestinal de animais de sangue quente. A presença de *E. coli* em alimentos indica contaminação de origem fecal, caracterizando condições higiênicas insatisfatórias (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Escherichia coli pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos de 1,1 – 1,5 μm x 2,0 – 6,0 μm , ocorrem isolados ou aos pares, não esporogênicos, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar glicose e outros carboidratos com a produção de piruvato, posteriormente convertido em ácidos láctico, acético e fórmico. Parte do ácido fórmico é transformado em CO_2 e H_2 . Algumas cepas são anaerogênicas. São oxidase negativa. Quando móveis, possuem flagelos peritríquios. A lactose é fermentada pela maioria das cepas (ØRSKOV, 1984). Algumas cepas causadoras de diarreia, incluindo muitas da categoria EIEC (*E. coli* enteroinvasora) são tipicamente lactose negativa e apenas cerca de 90% das cepas de *E. coli* são lactose positiva (NATARO & KAPER, 1998).

Tradicionalmente, a identificação de *E. coli* é baseada nos resultados de uma bateria de testes denominado IMViC onde + + – – (são características do biotipo I) ou – + – – (características do biotipo II). Neste esquema “I” refere-se a capacidade do microrganismo em produzir indol a partir do metabolismo do triptofano; “M” indica a habilidade do organismo em fermentar glicose com alta produção de ácido, detectado no meio pelo indicador de pH vermelho de metila; “Vi” detecta a presença de produtos neutros, 2,3 butanodiol e/ou acetoína, a partir do metabolismo da glicose, conhecida como reação de Vogues-Proskauer; enquanto “C” representa a habilidade da bactéria para utilizar citrato como única fonte de carbono. Entretanto, este padrão é inadequado para identificação da espécie, podendo ser encontrado

nas cinco espécies do gênero e até em outras enterobactérias (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

A melhor prova individual para diferenciar *E. coli* de outras enterobactérias é a prova do indol, positiva em 99% das cepas (NATARO & KAPER, 1998). Mas segundo KORNACKI & JOHNSON (2001) há uma incidência relativamente alta de *E. coli* biotipo II em algumas amostras, o que pode ser parcialmente explicado devido a muitas culturas requererem 48 horas para produzir quantidade detectável de indol.

As exigências nutricionais de *E. coli* são relativamente simples, se comparadas a outros microrganismos heterotróficos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi* e *Proteus vulgaris*; necessitam de sais inorgânicos, carbono orgânico e nitrogênio inorgânico. Segundo PELCZAR, REID & CHAN (1980) um meio que permita o crescimento de *E. coli* deveria ter a seguinte composição: 1,0 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 5,0 g de glicose, 5,0 g de NaCl, 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g de K_2HPO_4 para 1.000 mL de água.

O sulfato de amônia é a fonte de nitrogênio preferida por *E. coli* (BETTELHEIM, 2000). A principal fonte de carbono e energia é a glicose. Um meio sintético para cultura de *E. coli* tem a seguinte composição: K_2HPO_4 (7,0 g), KH_2PO_4 (2,0 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), glicose (10,0 g) e água destilada (1 L) (BARBOSA & TORRES, 1998).

Segundo FARMER III (1999) *Escherichia coli* cresce em meios com peptona e extrato de carne sem a adição de cloreto de sódio ou outros suplementos.

São reconhecidas seis categorias de *Escherichia coli* responsáveis por infecções intestinais: EPEC (*E. coli* enteropatogênica); EIEC (*E. coli* enteroinvasora); ETEC (*E. coli* enterotoxigênica); EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica); EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* difusamente aderente) (CAMPOS & TRABULSI, 1999).

2.5 CARACTERÍSTICAS DE OSTRAS

Ostras são moluscos bivalves do gênero *Crassostrea*. São consumidas principalmente cruas e têm sido responsáveis por diversos casos de gastroenterite (DANIELS *et al.*, 2000).

Os moluscos alimentam-se por filtração, podendo assimilar todos os contaminantes bióticos e abióticos presentes na água (NUNES & PARSONS, 1998).

Uma ostra pode filtrar até 10 litros de água/hora, por isso sua capacidade de concentrar microrganismos é elevada (ICMSF, 1985). *Escherichia coli* pode manter-se viável quando ingerida por moluscos, enquanto que em água do mar exposta à luz solar pode manter-se viável mas não cultivável (VBNC), ocasionando uma disparidade entre as contagens na água e nos moluscos. Tem sido observado com certa frequência contagens altas de coliformes de origem fecal em moluscos, mesmo quando as contagens em água do mar são consideradas seguras para sua coleta (POMMEPUY *et al.*, 1996).

A microbiota de frutos do mar como ostras, mariscos e camarões, reflete a qualidade da água no local da captura, da água de lavagem e do transporte e manuseio (PELCZAR, REID & CHAN, 1981; JAY, 1992), sendo muito importante saber se a água é poluída por esgotos, casos em que os frutos do mar são potencialmente capazes de veicular diversos agentes patogênicos (PELCZAR, REID & CHAN, 1981).

A carga microbiana das ostras situa-se entre 10^4 e 10^6 UFC/g de carne, podendo atingir ou ultrapassar 10^7 UFC/g durante a deterioração de sua carne (ICMSF, 1985).

Dentre os microrganismos isolados de ostras deterioradas estão *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* e *Micrococcus* (JAY, 1992).

Os moluscos possuem alto teor de carboidratos, principalmente glicogênio, e menor teor de nitrogênio. Seu processo de deterioração é fermentativo, resultando

na diminuição do pH. Alguns pesquisadores propõem a seguinte escala de pH como base na determinação da qualidade microbiológica de ostras: pH 6,2 – 5,9 (boa); pH 5,8 – 5,5 (inadequada) e pH 5,2 ou menor (deteriorada) (LANDGRAF, 1996).

2.6 CINÉTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Em qualquer sistema biológico o crescimento pode ser definido como o aumento ordenado de todos os componentes químicos. Durante um período de crescimento balanceado, isto é, em um meio adequado e com as bactérias já adaptadas, um aumento na concentração de células é acompanhado por comparável aumento de todos os componentes celulares, mantendo sua composição química constante (STAINER *et al.*, 1995).

Reações cinéticas de primeira ordem podem ser usadas para descrever as alterações no número de células durante a fase exponencial de crescimento. Microbiologistas de alimentos geralmente usam tempo de duplicação (t_d) como uma constante cinética para descrever a velocidade de crescimento exponencial (MONTVILLE, 1997), relacionada à equação:

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (\text{Eq. 1}) \quad \text{onde } N = \text{número de colônias (UFC/mL)}$$

$$N_0 = \text{número inicial de colônias (UFC/mL)}$$

$$\mu = \text{velocidade específica de crescimento (h}^{-1}\text{)}$$

$$e = \text{base do logaritmo natural}$$

Transformando para logaritmo natural, a Equação 1 assume a seguinte forma:

$$\ln(N/N_0) = \mu t \quad (\text{Eq. 2})$$

e para condição onde t (h) é o tempo de duplicação (t_d), com $N = 2N_0$, fazendo as substituições teremos:

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad \therefore \quad t_d = 0,693 / \mu \quad (\text{Eq. 3})$$

A construção da curva de crescimento do logaritmo natural do número de células *versus* o tempo deve produzir uma linha reta, cuja inclinação será igual a μ (STANBURY, WHITAKER & HALL, 1995).

A velocidade específica de crescimento, μ , corresponde ao coeficiente angular (inclinação), da equação linear do logaritmo natural do número de colônias, $\ln[N]$ em função do período de crescimento $t(h)$, relacionado a fase exponencial do crescimento, determinado por regressão linear (RIBEIRO & HORII, 2004):

$$\ln [N] = \mu t + b \quad (\text{Eq. 4}) \quad \text{onde } \mu = \text{inclinação} \\ b = \text{intercepto}$$

A Equação 4 é do tipo clássico: $Y = a + bX$, onde “a” é o intercepto e “b” o coeficiente angular.

O coeficiente angular, também denominado coeficiente de regressão ou inclinação da linha ajustada pela regressão, expressa a variação em Y a cada variação unitária de X. E o percentual da variação total em Y que é explicada pela regressão ajustada é denominado coeficiente de determinação, r^2 , que é uma medida de precisão do ajuste da regressão linear (ZAR, 1996).

Escherichia coli tem uma velocidade de crescimento relativamente alta, com um tempo de duplicação de 20 – 21 min, para culturas em meio complexo e em temperatura ótima (STAINER *et al.*, 1995; INGRAHAM, MAALØE & NEIDHARDT, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Pescado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza e no Laboratório de Biotecnologia Alimentar, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis.

3.1 MICRORGANISMO

Foram utilizadas uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (ATCC - American Types Culture Collection) e outra de *Escherichia coli* isolada de ostras de mangue (*Crassostrea rhizophorae*), Fortaleza, CE, selecionada aleatoriamente e codificada como cepa CE-7A.

A cepa padrão foi utilizada em todos os experimentos, enquanto a cepa isolada de ostras foi empregada em apenas um caldo experimental para comparar seu crescimento ao da cepa padrão.

As culturas foram ativadas em caldo soja triptona (Tryptic Soy Broth, TSB, Difco) a 35 °C/24 h e, após caracterização, mantidas em tubos inclinados com ágar soja triptona (Tryptic Soy Agar, TSA, Difco) (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

3.2 PESQUISA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *E. coli* ISOLADAS DE OSTRAS

Escherichia coli foi isolada de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) de mangue comercializadas na cidade de Fortaleza. As amostras de ostras foram adquiridas no mercado local vivas e de valvas cerradas, acondicionadas em sacos plásticos fechados, colocados em caixas térmicas com gelo picado e transportadas até o laboratório para análise imediata.

Foram coletadas 10 amostras de ostras, cada amostra constando de 12 unidades, totalizando 120 animais analisados. As coletas foram realizadas semanalmente, entre os meses de maio e julho de 2002.

As ostras foram escovadas sob água potável corrente, principalmente nas fendas de junção da concha, drenadas sobre papel toalha e abertas assepticamente. A abertura das conchas foi feita introduzindo-se a ponta de uma faca estéril própria no sifão da concha. O músculo adutor foi cortado e o líquido intervalvar e a carne pesados em um triturador tarado e esterilizado. Cerca de 200 g de cada amostra foi homogeneizada por 2 min. com igual quantidade (peso) de água peptonada a 0,5 % esterilizada, obtendo uma diluição da amostra de 1:2. O mesmo diluente foi empregado para as diluições de 10^{-1} a 10^{-3} (COOK *et al.*, 2001).

Para pesquisa, isolamento e caracterização de *E. coli* foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP) de acordo com FENG, WEAGANT & GRANT (2002), que consistiu em: (1) inocular alíquotas de 2 mL das diluições 1:2, 1:10, 1:100 e 1:1000 em 5 tubos para cada diluição com caldo lauril sulfato triptose (LST, Difco) e tubos de Durham invertidos e a bateria incubada a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{-}48\text{ h} \pm 2\text{ h}$; (2) a partir dos tubos LST positivos (presença de gás) semear tubos com caldo EC (Difco) providos de tubos de Durham invertidos e incubar a $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$; (3) a partir dos tubos EC positivos (presença de gás) semear placas com ágar eosina azul de metileno Levine (EMB-L, Oxoid) e incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $18\text{-}24\text{ h}$; (4) transferir 2 colônias típicas (centro escuro com ou sem brilho metálico) de cada placa de EMB-L para tubos inclinados com ágar padrão (PCA, Oxoid) para a realização dos testes morfológicos e bioquímicos e, a seguir, incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $18\text{-}24\text{ h}$; (5) proceder a identificação pelos testes bioquímicos da série IMViC [produção de Indol, Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e utilização de Citrato] e confirmar a produção de gás em LST, para as colônias Gram-negativas em forma de bastonetes curtos. Considerar como *E. coli*, bacilos Gram-negativos não esporogênicos, fermentadores de lactose com produção de gás e padrão IMViC ++-- (biotipo 1) ou -+-- (biotipo 2).

As cepas foram mantidas em tubos inclinados com TSA e enviadas para o Laboratório de Microbiologia da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, para identificação de toxigenicidade.

Para ativação das cepas utilizou-se o caldo TSB com incubação em estufa (Fanem, Orion 502) a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}/24$ horas.

3.3 ÁGUA DE COCO VERDE (*Cocos nucifera* L.)

Foram utilizados cocos verdes da variedade gigante, com estágio de maturação do fruto entre o 6º e o 7º mês. Os cocos foram adquiridos no mercado local, Fortaleza, CE.

A idade do fruto foi selecionada considerando que o coco disponibilizado para o consumo geralmente encontra-se entre o 5º e 7º mês de maturação (FAGUNDES NETO *et al.*, 1989, SREBERNICH, 1998) e, em experimentos realizados com cocos da variedade gigante (Ceará, Brasil), volumes maiores de água e concentrações mais elevadas de glicose foram encontrados no 6º e 7º mês de maturação do fruto (SREBERNICH, 1998).

3.4 AVALIAÇÃO DA ÁGUA DE COCO VERDE (*Cocos nucifera* L.) PARA O CRESCIMENTO DE *Escherichia coli* ATCC 25922

Foram determinados nove tratamentos, com três repetições, para avaliar os seguintes parâmetros:

- concentração da água de coco: pura e diluída em partes iguais (1:1) com água destilada;
- pH do meio: sem correção e com correção antes ou após a esterilização, de acordo com o tratamento;
- processos de esterilização: filtração, em filtro de membrana Millipore® de $0,45\text{ }\mu\text{m}$, e autoclavação a $121\text{ °C}/10$ min;

3.4.1 Preparo dos caldos

Antes da coleta da água, os cocos (2 a 3) foram lavados com sabão sob água corrente. A abertura dos frutos foi feita com auxílio de um furador de inox próprio e a água vertida em béqueres de 1 Litro.

O volume de água de cada coco foi medido em proveta de 1 litro e o pH determinado com pHmetro (Micronal B-347).

Para preparação dos caldos utilizou-se uma amostra de 1 litro, formada por mistura eqüitativa das águas de coco coletadas. Esse procedimento foi adotado para assegurar a homogeneidade da amostra.

A amostra foi então filtrada, em papel de filtro Whatman nº1, para a retirada dos sólidos em suspensão e dividida em duas partes: uma denominada água de coco pura e a outra água de coco diluída em partes iguais (1:1) com água destilada.

Alíquotas de 50 mL das duas amostras foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 125 mL, protegidos com tampão de gaze/algodão. Foram utilizados frascos estéreis para os tratamentos submetidos à esterilização por filtração. A determinação dos tratamentos foi feita de acordo com a TABELA 3.

O pH dos caldos foi determinado antes e após a esterilização, em alíquotas de 3 mL. Quando determinado e/ou corrigido após a esterilização o procedimento foi feito sob condições assépticas.

Nos Caldos P1, P3, D1 e D3 (TABELA 3) não houve ajuste de pH, enquanto nos outros foi ajustado para pH 7,1 com solução de NaOH 1N esterilizada por filtração, sendo que no Caldo D5 a correção de pH ocorreu após a esterilização.

A aparência dos caldos foi observada para os aspectos: transparência e coloração, utilizando-se como referência soluções de água peptonada (0,1 %, 1,0 % e 2,0 %) esterilizadas a 121 °C/15 min.

TABELA 3 – Determinação dos tratamentos (caldos) utilizando água de coco verde (*Cocos nucifera* L.), variedade gigante (Ceará, Brasil), para o crescimento de *E. coli* ATCC 25922.

Tratamento	Concentração da água de coco	Correção pH do meio	Processo de Esterilização ⁽¹⁾
Caldo P1	⁽²⁾ Pura	-	Filtração
Caldo P2	Pura	⁽⁴⁾ 7,1	Filtração
Caldo P3	Pura	-	Autoclavação
Caldo P4	Pura	⁽⁴⁾ 7,1	Autoclavação
Caldo D1	⁽³⁾ Diluída	-	Filtração
Caldo D2	Diluída	⁽⁴⁾ 7,1	Filtração
Caldo D3	Diluída	-	Autoclavação
Caldo D4	Diluída	⁽⁴⁾ 7,1	Autoclavação
Caldo D5	Diluída	⁽⁵⁾ 7,1	Autoclavação

⁽¹⁾ Filtro de membrana Millipore® de 0,45 µm e autoclave a 121°C/10 min

⁽²⁾ Água de coco Pura (Caldo P)

⁽³⁾ Água de coco Diluída (Caldo D)

⁽⁴⁾ Antes da esterilização

⁽⁵⁾ Após a esterilização

3.4.2 Condições de cultivo

O experimento foi conduzido em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com 50 mL de meio, incubados em estufa a 35 °C ± 0,5 °C/24 horas e população inicial de 10⁵ UFC/mL.

Os inóculos foram provenientes de pré-culturas da cepa de *E. coli* ATCC 25922 em 20 mL de caldo TSB incubados a 35 °C ± 0,5 °C/14 horas.

As pré-culturas foram diluídas (1:10) em água peptonada a 0,1% estéril até uma população estimada de 10⁷ UFC/mL. Cada frasco Erlenmeyer foi inoculado com 1 mL da pré-cultura diluída (inóculo) para conter uma população inicial de 10⁵ - 10⁶ UFC/mL de meio. A população na pré-cultura foi previamente determinada em cultivo anterior relacionando-se a densidade ótica (600 nm) com o número de células viáveis.

3.4.3 Avaliação do crescimento

A avaliação do crescimento foi determinada por contagem em placas do número de células viáveis (UFC/mL).

De cada frasco Erlenmeyer (tratamento) foram coletadas, assepticamente, amostras de 1 mL imediatamente após a inoculação (tempo zero) e em 24 horas de incubação, para contagem do número de células viáveis em placas com PCA, por semeadura (1 mL) em profundidade e incubação em estufa a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ /24-48 horas. O diluente utilizado foi água peptonada a 0,1 % esterilizada.

A ausência de contaminação foi monitorada semeando-se as culturas em placas com EMB e isolamento de 2 a 4 colônias em placas com PCA. As colônias isoladas foram posteriormente caracterizadas segundo a metodologia descrita no item 3.2. Estes procedimentos foram adotados para o inóculo e para as culturas nos tempos 0 h e 24 h. A ausência de contaminação nos caldos estéreis foi monitorada por semeadura em placas com PCA imediatamente antes da inoculação.

3.5 ADIÇÃO DE NITROGÊNIO À ÁGUA DE COCO VERDE PARA O CRESCIMENTO DE *E. coli*

Os tratamentos foram delineados para avaliar a influência do enriquecimento da água de coco com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio para o crescimento da cepa ATCC 25922 e para calcular as velocidades específicas de crescimento. O enriquecimento dos caldos foi feito com peptona de carne (Oxoid), sulfato de amônia (Vetec) ou extrato de levedura (Oxoid). Como parâmetro de comparação foram utilizados dois meios comerciais, o Caldo Lactose (CL, OXOID) e o Caldo TSB.

Foi selecionado como base para o preparo dos caldos experimentais, o tratamento correspondente ao Caldo D5 (TABELA 1) do experimento anterior (item 3.4), que utilizou a água de coco diluída com correção de pH para 7,1, após a esterilização a $121\text{°C}/10\text{ min}$ e designado então como Caldo 1.

Foram determinados nove tratamentos utilizando a cepa ATCC 25922, com três repetições, correspondendo a sete caldos à base de água de coco (TABELA 4) e dois caldos controle (CL e TSB). Um décimo tratamento foi incluído para comparar o crescimento de ATCC 25922 com a cepa CE-7A, utilizando o Caldo 2 (TABELA 4). A seleção prévia desse caldo, enriquecido com 0,5 % de peptona, foi proposta em função dos baixos teores de nitrogênio encontrados na água de coco.

3.5.1 Preparo dos caldos experimentais

Foram elaborados sete caldos experimentais. As condições de preparo dos caldos foram semelhantes as do Caldo D5 (TABELA 1): coleta da água de coco (5 a 6 unidades), determinação de pH e volume, mistura eqüitativa para formar amostra de 2 litros, diluição em partes iguais (1:1) com água destilada e filtração para retirada dos sólidos em suspensão.

Alíquotas de 160 mL dessa amostra foram transferidas para frascos Erlenmeyeres de 500 mL contendo as respectivas fontes de nitrogênio, de acordo com os tratamentos determinados na TABELA 4.

TABELA 4 – Elaboração de caldos à base de água de coco verde, enriquecida com diferentes fontes de nitrogênio, para o crescimento de *E. coli* ATCC 25922.

Tratamento	Fonte de Nitrogênio (g/L)		
	Peptona	Sulfato de Amônia	Extrato de Levedura
Caldo 1	-	-	-
Caldo 2	5,0	-	-
Caldo 3	10,0	-	-
Caldo 4	-	1,0	-
Caldo 5	-	5,0	-
Caldo 6	-	-	5,0
Caldo 7	-	-	10,0

Após homogeneização dos caldos com a fonte de nitrogênio, o pH foi determinado e os caldos esterilizados em autoclave a 121°C/10 min. Os caldos foram mantidos a 4 °C e estocados por até 3 dias. Na hora determinada para o início

do experimento o pH foi aseticamente corrigido para $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$ com solução estéril de NaOH 1N.

Os caldos CL (g/L: 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona e 5,0 g de lactose) e TSB (em g/L: 17,0 g de triptona, 3 g de peptona de soja, 5,0 g de NaCl, 2,5 g de glicose e 2,5 g de K_2HPO_4) foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.5.2 Condições de cultivo

O experimento foi conduzido em frascos Erlenmeyers de 500 mL com 150 mL de caldo, em banho com agitação (Lab-Line, Orbit) de 200 rpm, temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}/24$ horas e população inicial de 10^5 - 10^6 UFC/mL.

Os inóculos foram provenientes de pré-culturas da cepa de *E. coli* ATCC 25922 ou da cepa CE-7A, de acordo com o tratamento, em 20 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion broth, Oxoid) incubados a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}/14$ horas e foram mantidos em tubos inclinados com PCA (Oxoid) para controle da pureza da cultura.

Cada frasco Erlenmeyer foi inoculado com X mL da pré-cultura (inóculo), sendo X (0,5 mL a 1 mL) calculado para fornecer uma densidade ótica a 600 nm de 0,005, equivalente uma população inicial de 10^5 - 10^6 UFC/mL de meio. Antes da inoculação os caldos foram colocados em estufa até atingir a temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

A população na pré-cultura e nos caldos experimentais foi estimada por leitura de densidade ótica a 600 nm.

3.5.3 Avaliação do crescimento

O crescimento de *E. coli* foi estimado por leitura da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro (FEMTO, 423) utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico a 600 nm, e determinado por contagem do número de células viáveis (UFC/mL) em placas com PCA incubadas a $35 \text{ }^\circ\text{C}/24$ -48 horas.

Para cada caldo de cultura foi previamente construída uma curva de referência de densidade ótica (DO) *versus* tempo (h) com suas respectivas contagens em placas (UFC/ml). Esses dados foram utilizados para estimar a população na pré-cultura (UFC/mL), calcular o volume do inóculo, estimar a população inicial e prever a faixa de diluição mais adequada para as contagens em placas durante o experimento.

De cada unidade experimental foram coletadas amostras de 3 mL imediatamente após a inoculação (tempo 0) e em intervalos de tempo de 1 hora (até 14 h) e em 24 horas de cultivo.

Uma alíquota (1 mL) da amostra foi utilizada nas diluições para contagem do número de células viáveis em placas com PCA, por semeadura (1 mL) em profundidade e incubação em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{ C}$ /24-48 horas. O diluente utilizado foi água peptonada a 0,1 % esterilizada.

A outra parte da amostra foi utilizada para a leitura de densidade ótica, tomando-se como branco o respectivo caldo estéril utilizado nos tratamentos.

Esses dados foram utilizados para verificar a correlação entre DO *versus* UFC/mL, calculada a partir das curvas de crescimento, para os pontos de dados sobre uma faixa linear. Foram utilizadas as médias geométricas dos valores de UFC/mL, de três repetições do experimento, transformadas para \log_{10} UFC/mL.

A ausência de contaminação foi monitorada semeando-se as culturas em placas com ágar EMB e isolamento de 2 a 4 colônias em placas com PCA. As colônias isoladas foram posteriormente caracterizadas segundo a metodologia descrita no item 3.2. Estes procedimentos foram adotados para o inóculo e para as culturas nos tempos 0 h e 24 h. Nos caldos estéreis a ausência de contaminação foi monitorada por semeadura em placas com PCA imediatamente antes da inoculação.

3.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *E. coli*

A cinética de crescimento de *E. coli* foi utilizada para verificar a eficiência dos meios de cultura experimentais em relação aos meios controles.

Foram calculadas as velocidades específicas de crescimento, μ (h^{-1}), e o tempo de duplicação, t_d (h), de *Escherichia coli*, a partir das curvas de crescimento do número de células viáveis (UFC/mL) versus tempo (h). Para permitir o ajuste ao modelo de regressão, os valores de UFC/mL foram linearizados por transformação para logaritmo natural (\ln UFC/mL).

A velocidade específica de crescimento (μ) correspondeu ao coeficiente angular (b) da equação linear do logaritmo natural de UFC/mL, em função do período de crescimento, t (h), relacionado à fase exponencial do crescimento, determinado por regressão linear.

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inteiramente casualizado com três repetições. A casualização para disposição dos tratamentos (caldos de cultura) na estufa (item 3.4) ou no banho com agitação (item 3.5), foi definida por sorteio. A unidade experimental foi um frasco Erlenmeyer de 125 mL no item 3.4 e de 500 mL no item 3.5.

Foram determinados nove tratamentos iniciais (item 3.4) para selecionar um como base para o experimento seguinte (item 3.5), onde foram determinados dez tratamentos, sendo nove com a cepa de *E. coli* ATCC 25922 e um com a cepa de *E. coli* CE-7A.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.8.1 Influência dos suplementos nitrogenados no crescimento de *E. coli* ATCC 25922

Foi utilizada a Análise de Variância bifatorial ($\alpha = 0,05$), considerando-se como unidade o valor de UFC/mL transformado por logaritmo natural (\ln UFC/mL),

tendo fatores causais a concentração e a fonte de nitrogênio, para as seguintes hipóteses:

H₀: os suplementos nitrogenados não alteram diferentemente o crescimento de *E. coli*.

H_a: os suplementos nitrogenados alteram diferentemente o crescimento de *E. coli*.

H₀: as duas concentrações não alteram diferentemente o crescimento de *E. coli*.

H_a: as duas concentrações alteram diferentemente o crescimento de *E. coli*.

H₀: não existe interação entre os efeitos do suplemento nitrogenado e sua concentração.

H_a: existe interação entre os efeitos do suplemento nitrogenado e sua concentração.

Em caso de rejeição da hipótese de nulidade será utilizado o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$) para determinar quais médias de tratamentos diferem entre si (MONTGOMERY, 1997).

3.8.2 Influência dos tratamentos (concentração e fonte de nitrogênio) em relação à água de coco sem suplemento, no crescimento de *E. coli* ATCC 25922

Caso comprovado que os suplementos de nitrogênio e suas concentrações não influenciam o crescimento de *E. coli* ATCC 25922, os respectivos valores de ln UFC/mL serão submetidos ao teste *t* ($\alpha = 0,05$), para as seguintes hipóteses:

H₀: a água de coco enriquecida com suplementos nitrogenados não altera o crescimento de *E. coli*.

H_a: a água de coco enriquecida com suplementos nitrogenados altera o crescimento de *E. coli*.

3.8.3 Influência dos meios de cultura (água de coco, CL e TSB) no crescimento de *E. coli* ATCC 25922

Foi utilizada a Análise de Variância unifatorial ($\alpha = 0,05$), considerando-se como unidade os valores de ln UFC/mL, tendo como blocos casualizados os meios de cultura, para as seguintes hipóteses:

H_0 : os meios de cultura não alteram diferentemente o crescimento de *E. coli*.

H_a : os meios de cultura alteram diferentemente o crescimento de *E. coli*.

3.8.4 Influência dos meios de cultura sobre os coeficientes de regressão (**b**) da cultura de *E. coli*

Foi utilizada a análise de regressão linear simples para os dados obtidos das culturas em sete caldos à base de água de coco e nos caldos CL e TSB.

Os valores de ln UFC/mL referentes à fase de crescimento exponencial, foram utilizados para o ajustamento dos dados a uma equação do tipo $\hat{Y} = a + bX$, pela qual se estima a velocidade específica de crescimento (μ), onde: “ \hat{Y} ” é a variável resposta (ln UFC/mL) estimada, “a” é o intercepto da reta ou o coeficiente linear, “b” é a inclinação da reta ou o coeficiente angular (b) e “X” o tempo (h).

Os intervalos de confiança (95 %) para os coeficientes de regressão foram calculados a partir de (ZAR, 1996):

$$b \pm t_{\alpha,(n-2)} S_b \quad (\text{Eq. 5})$$

3.8.4.1 Comparação entre os coeficientes (**b**) de regressão de nove populações de *Escherichia coli* ATCC 25922

A análise da influência dos diversos tratamentos (**k**) sobre o crescimento de *E. coli* foi feito através do teste para comparação dos coeficientes angulares (**b**) das respectivas curvas de crescimento, utilizando um procedimento semelhante ao da Análise de Variância ($\alpha = 0,05$) para testar a homogeneidade (igualdade) dos coeficientes de regressão (ZAR, 1996).

A hipótese de nulidade, H_0 , foi avaliada sob a premissa de que os valores do desvio padrão da regressão linear são iguais para os k tratamentos, ou seja, $(s^2_{y.x})_1 = (s^2_{y.x})_2 = (s^2_{y.x})_3 = \dots = (s^2_{y.x})_k$. Em se tratando de k equações de regressão, os k valores da soma dos quadrados do resíduo (SQ_R) e do número de graus de liberdade do resíduo (GL_R) foram adicionados para resultar na soma dos quadrados do resíduo ponderado (SQ_p) e no número de graus de liberdade do resíduo ponderado (GL_p). A soma dos quadrados do resíduo comum (SQ_c) foi obtida a partir da soma dos valores do Σx^2 , Σxy e Σy^2 de cada regressão.

A variável padronizada (F) foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$F = \frac{(SQ_c - SQ_p) / k - 1}{SQ_p / GL_p} \quad (\text{Eq. 6})$$

As hipóteses de nulidade (H_0) e alternativa (H_a) têm o seguinte enunciado:

$$H_0: b_1 = b_2 = b_3 = \dots = b_k$$

H_a : pelo menos uma das k equações de regressão não se origina de amostras populacionais com o mesmo coeficiente angular (\mathbf{b}).

Em caso de aceitação da hipótese alternativa, será empregado o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) para testar a diferença entre cada par de valores \mathbf{b} , para as hipóteses:

$$H_0: b_A = b_B$$

$H_a: b_A \neq b_B$, onde A e B denotam qualquer duas k linhas de regressão ($k(k-1)/2$).

O teste estatístico será significativo se q for maior que o valor crítico de $q_{(\alpha, \nu, k)}$, com α nível de significância (0,05), ν GL do resíduo ponderado e k tratamentos.

$$q = \frac{b_B - b_A}{SE} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$SE = \sqrt{\frac{(s^2_{y.x})_p}{2} \left[\frac{1}{(\Sigma x^2)_A} + \frac{1}{(\Sigma x^2)_B} \right]} \quad (\text{Eq. 8})$$

Para aplicação do teste os valores de **b** são ordenados, do menor para o maior, comparando-se primeiro o maior valor contra o menor, o maior contra o segundo menor, e assim por diante. Se nenhuma diferença for encontrada entre dois coeficientes **b**, a conclusão é que não existe diferença entre nenhum dos coeficientes de regressão incluídos nessa ordem de valores e tais diferenças não são testadas (ZAR, 1996).

3.8.4.2 Comparação entre os coeficientes de regressão (**b**) da população de duas cepas de *Escherichia coli*

Foram analisados os dados das culturas de *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* CE-7A, em Caldo 2.

O procedimento é semelhante ao descrito no item 3.7.4.1, mas o teste utilizado para comparação entre dois coeficientes é o teste **t** ($\alpha = 0,05$), calculado a partir de (ZAR, 1996):

$$t = \frac{b_1 - b_2}{s_{b_1 - b_2}} \quad (\text{Eq. 9})$$

$$s_{b_1 - b_2} = \sqrt{\frac{(s^2_{y.x})_1}{(\sum x^2)_1} + \frac{(s^2_{y.x})_2}{(\sum x^2)_2}} \quad (\text{Eq. 10})$$

As hipóteses de nulidade (H_0) e alternativa (H_a) têm o seguinte enunciado:

$$H_0: b_1 = b_2$$

$$H_a: b_1 \neq b_2, \text{ onde 1 e 2 denotam duas linhas de regressão.}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e as cepas de *E. coli* isoladas de ostras apresentaram características típicas da espécie: bacilos Gram-negativos, não-esporulados, oxidase negativa, fermentação de lactose com produção de gás em caldo LST dentro de 48 h a 35 °C e padrão IMViC + + – – (biotipo I).

Das 10 amostras de ostras foram isoladas 48 cepas de *E. coli* e apenas a cepa CE-7A foi utilizada para cultivo no Caldo 2. Todas as cepas apresentaram negatividade para EIEC, EPEC e O157:H7. Moluscos de águas contaminadas concentram microrganismos contaminantes, entre eles os patógenos entéricos, e em ostras e outros moluscos coletados em estuários que recebem dejetos é freqüente a presença de coliformes que não fazem parte de sua microbiota normal (ICMSF, 1985). E sendo *E. coli* considerado o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos (MS, 2004), a investigação de potenciais patógenos pode ser útil para monitorar o produto e a qualidade do ambiente aquático (ROBERTS, HOOPER & GREENWOOD, 1995).

Os cocos utilizados no experimento apresentaram grande variação no volume de água de 374 mL a 601 mL, com média de 485 mL. Os valores de pH variaram de 4,8 - 5,4, com média de pH 4,9 (TABELA 5).

TABELA 5 – Resultado das determinações de volume (mL) e pH da água de coco verde utilizada nos experimentos.

Volume	pH	Volume	pH	Volume	PH
488	4,8	490	4,9	374	4,9
448	4,9	581	5,0	561	4,8
501	4,8	475	5,0	502	4,9
420	4,9	502	4,8	513	5,0
425	4,8	510	4,8	528	4,9
505	4,9	377	4,9	601	4,8
506	5,0	500	4,9	475	5,4
445	5,2	387	5,2	515	4,8

Esses valores estão próximos aos encontrados por SREBERNICH (1998), volume de 450,9 mL em frutos com 7 meses e pH 5,10 e 5,25 no 6º e 7º mês.

Os resultados do experimento para avaliar a influência da diluição, pH e processos de esterilização da água de coco para o crescimento de *E. coli* são mostrados na TABELA 6.

TABELA 6 – População* inicial e final de *E. coli* ATCC 25922 a 35 °C e valores de pH dos caldos.

Caldo	log ₁₀ UFC/mL ⁽¹⁾						Aumento log ₁₀ ⁽²⁾	pH _i ⁽³⁾	pH _f ⁽⁴⁾
	Pop 0h	Pop 24h	Pop 0h	Pop 24h	Pop 0h	Pop 24h			
P1	5,34	8,49	5,18	8,34	5,40	8,56	3,16	4,8	4,8
P2	5,34	8,54	5,18	8,52	5,40	8,73	3,29	7,1	7,1
P3	5,34	5,64	5,18	5,28	5,40	5,51	0,17	4,8	4,8
P4	5,34	5,32	5,18	5,56	5,40	5,62	0,19	7,1	6,0
D1	5,38	8,41	5,28	8,51	5,57	8,63	3,11	4,8	4,8
D2	5,38	8,48	5,28	8,54	5,57	8,69	3,16	7,1	7,1
D3	5,38	8,26	5,28	8,08	5,57	8,28	2,80	4,8	4,8
D4	5,38	7,46	5,28	8,32	5,57	7,62	2,39	7,1	6,0
D5	5,38	8,34	5,28	8,28	5,57	8,40	2,93	4,8	7,1

* Média de três repetições

⁽¹⁾ Pop 0h e Pop 24h é a população em 0 hora (inicial) e após 24 horas (final) a 35 °C

⁽²⁾ Diferença entre Pop 24h e Pop 0h

⁽³⁾ pH_i é o pH dos caldos antes da esterilização

⁽⁴⁾ pH_f é o pH dos caldos após a esterilização

Com base nesses resultados podemos agrupar os caldos em função de sua eficiência em 3 grupos: (1) P1, P2, D1, D2, D3 e D5; (2) D4 e (3) P3 e P4.

O maior aumento da população de *E. coli* após 24 h a 35 °C foi observado nos caldos P1, P2, D1 e D2, mais de 3 ciclos de log (3,11 a 3,29 log₁₀ UFC/mL); seguidos dos caldos D3 e D5, respectivamente, com 2,80 e 2,93 log₁₀ UFC/mL e do caldo D4 com 2,39 log₁₀ UFC/mL. Nos caldos P3 e P4 a população se manteve no mesmo ciclo logarítmico inicial (TABELA 6). Esses resultados estão relacionados à

aparência e coloração dos caldos, uma vez que ambos foram influenciados pelos processos de esterilização, diluição e ajuste do pH da água de coco.

No grupo 1 todos os caldos apresentaram aparência translúcida, diferindo apenas na coloração, sendo incolor nos caldos esterilizados por filtração (P1, P2, D1 e D2), e com coloração semelhante a da água peptonada a 0,1 % nos caldos esterilizados a 121 °C (D3 e D5).

O caldo D4 (grupo 2) exibiu aparência translúcida, mas com coloração mais acentuada, similar a da água peptonada a 1,0 %. A aparência do caldo P3 (grupo 3) foi similar a do caldo D4, enquanto o caldo P4 (grupo 3) apresentou turvação e uma coloração mais forte - da água peptonada a 2,0 %. A coloração dos caldos foi consequência da concentração da água de coco (D4 versus P4), do ajuste do pH dos caldos antes da esterilização (P3 versus P4) e ainda da concentração da água de coco e do ajuste do pH antes da esterilização (P3 versus D4). Devemos ressaltar uma queda do pH (de pH 7,1 para 6,0) após a esterilização por autoclavação em todos os caldos que tiveram o pH corrigido antes desse processo, independentemente da concentração da água de coco; isso é evidenciado se compararmos o caldo P4 com o D4. No caldo D5 onde o ajuste do pH ocorreu após a esterilização, a coloração foi menos acentuada do que no D4.

De acordo com BOBBIO & BOBBIO (1995), os carboidratos estão envolvidos em duas transformações químicas importantes pela sua frequência e seus efeitos, a reação de Maillard na presença de açúcares redutores e aminoácidos, e a caramelização na presença de açúcares redutores e não redutores, sem necessidade de aminoácidos, ambas associadas à temperatura. Considerando que a água de coco é pobre em nitrogênio, podemos descartar a reação de Maillard e atribuir o escurecimento a caramelização. O caldo D5 que apresentou coloração menos acentuada e foi mais eficiente para o aumento da população difere do tratamento do caldo D4 apenas pela adição do NaOH utilizado no ajuste do pH após a esterilização. Isso pode ser atribuído ao fato de que a reação de caramelização é essencialmente iônica, podendo ser catalizada por ácidos ou bases (ARAÚJO, 1995).

SMITH & BULL (1976) utilizando água de coco para produção de biomassa de levedura observaram que a autoclavação a 121 °C causou escurecimento e leve produção de precipitado, com uma perda de 2,2 % (p/v) do teor total de carboidratos.

A água de coco pura (sem diluição) só se mostrou eficiente para o aumento da população de *E. coli* quando utilizou a esterilização por filtração (caldos P1 e P2); os caldos P3 e P4, esterilizados a 121 °C/10 min, não mostraram aumento da população após 24 h, resultado atribuído à reação de caramelização já discutida.

Os caldos que utilizaram a água de coco diluída, independente do processo de esterilização, foram eficientes para o crescimento de *E. coli* após 24 h. Isso pode ser atribuído a concentração de carboidratos presentes na água de coco. O tempo de esterilização usual de 15 min foi previamente testado (dados não mostrados), mas os caldos apresentaram turvação e coloração mais forte de amarelo a âmbar, dependendo da concentração da água de coco utilizada, o que reforça a hipótese da reação de caramelização.

As concentrações de glicose e frutose na água de coco diminuem com o aumento da idade do fruto, ocorrendo o inverso com a sacarose (JAYALEKSHMY *et al.*, 1986; FAGUNDES NETO *et al.*, 1989, SREBERNICH, 1998). Em cocos da variedade gigante de 3 safras diferentes, foram relatados teores mais elevados de glicose (g/100 mL), 2,33 a 2,93 % e frutose, 2,09 a 3,07 % e menores de sacarose, 0,14 a 0,15 % na água de coco no 6º mês de maturação. No 7º mês houve uma diminuição de glicose - 2,20 a 2,87 %, e frutose - 1,98 a 2,80 % e aumento de sacarose - 0,18 a 0,39 %; comportamento semelhante também no 8º mês - 2,02 a 2,34 %, 1,83 a 2,41 % e 0,28 a 0,58 % respectivamente para glicose, frutose e sacarose (SREBERNICH, 1998). A relação média glicose:frutose:sacarose calculada por idade do fruto é aproximadamente 49:48:3, 48:46:6 e 47:44:9 do 6º ao 8º mês.

Três amostras de água de coco foram analisadas e apresentaram concentrações de açúcares não redutores em sacarose (g/100 mL) de 0,13; 0,27 e 0,44 % e açúcares redutores em glicose de 4,82; 4,53 e 4,27, respectivamente, por amostra. A relação média de açúcares redutores:não redutores, 94:6, foi igual à calculada para os dados de SREBERNICH (1998) no 7º mês de maturação do fruto.

Os teores médios de açúcares redutores, 4,54 g/100 mL e não redutores, 0,28 g/100 mL foram semelhantes às médias relatadas por SREBERNICH (1998) no 7º mês de maturação do fruto, com glicose e frutose de 4,74 g/100 mL e sacarose de 0,27 g/100 mL. CAMPOS *et al.* (1996) encontraram concentrações ligeiramente mais altas de açúcares redutores (4,90 g/100 mL) e não redutores (0,40 g/100 mL) em amostras de coco verde comercializado em Belo Horizonte, MG. Enquanto MACIEL, OLIVEIRA & SILVA (1992) relatam teores menores de açúcares redutores (1,9 %) e açúcares totais (2,1 %) em frutos no 7º mês de maturação.

O caldo D5 foi selecionado como base para o enriquecimento com nitrogênio, considerando a viabilidade econômica e o resultado similar obtido no crescimento de *E. coli* em comparação com os outros caldos do grupo 1, P1, P2, D1 e D2, de custo mais elevado devido aos filtros de membranas utilizados no processo de esterilização.

Os dados da população de *E. coli* ATCC 25922 nos caldos à base de água de coco suplementada com nitrogênio, água de coco sem nitrogênio e nos caldos CL e TSB são mostrados na TABELA 7. Os valores de UFC/mL foram transformados para logaritmo natural (\ln UFC/mL) para permitir o ajuste dos dados ao modelo de regressão.

O resultado da Análise de Variância para verificar a influência dos suplementos nitrogenados sobre a população de *E. coli* ATCC 25922 está representado no ANEXO 1. Para a análise dos dados considerou-se a fase de crescimento exponencial mais longa nos caldos à base de água de coco e, portanto, foram utilizados apenas os dados dos intervalos de tempo de 0 h a 5 h.

Não houve diferença significativa entre as médias da população de *E. coli*, para os fatores fonte de nitrogênio ($P > 0,885$) e concentração de nitrogênio ($P > 0,783$), nos caldos à base de água de coco nas condições desse experimento. Portanto, as fontes e as concentrações de nitrogênio adicionadas à água de coco não influenciaram diferentemente o crescimento de *E. coli* ATCC 25922 a 37 °C/5 h.

TABELA 7 – População* de *E. coli* ATCC 25922 (ln UFC/mL) a 37 °C em caldos⁽¹⁾ à base de água de coco verde enriquecida com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio e em Caldo 1, CL e TSB.

Tempo(h)	Caldo 1	Caldo 2	Caldo 3	Caldo 4	Caldo 5	Caldo 6	Caldo 7	CL	TSB
0	14,8238	15,4688	15,1372	15,3603	15,5061	14,9328	14,8140	13,5581	15,1782
1	15,4585	16,0086	16,3228	15,8636	15,6601	15,9678	15,6596	14,0722	15,7004
2	16,4536	17,2733	18,5843	17,1586	17,0656	17,8164	17,7775	15,3310	17,3239
3	17,7208	19,1088	20,2366	18,9351	19,4416	19,6314	20,1207	16,8294	19,0061
4	18,9669	20,3893	20,9837	20,0645	20,1863	20,6225	20,8982	18,0568	20,2606
5	19,5993	20,9999	21,1920	20,4659	20,3601	20,9546	21,1057	19,0043	21,1665
6	19,8276	21,1920	21,2110	20,5064	20,3504	21,0066	21,1287	19,6524	21,6731
7	19,8580	21,2082	21,1920	20,5029	20,3545	21,0314	21,0827	19,9720	21,9326

* Média de três repetições

⁽¹⁾ Caldo 1: é o caldo base (cb) de água de coco diluída (1:1) sem adição de nitrogênio

Caldo 2 : cb + peptona 5 g/L; Caldo 3: cb + peptona 10 g/L

Caldo 4: cb + sulfato de amônia 1 g/L; Caldo 5: cb + sulfato de amônia 5 g/L

Caldo 6: cb + extrato de levedura 5 g/L e Caldo 7: cb + extrato de levedura 10 g/L

A diferença observada entre a maior e a menor média da população de *E. coli* foi de 0,7681 ln UFC/mL, observada entre o Caldo 3 e o Caldo 4 (ANEXO 2); convertendo esse valor para um mais facilmente compreendido em microbiologia, a diferença seria de apenas 0,33 log₁₀ UFC/mL.

Igualmente não houve diferença significativa, pelo teste *t* ($P > 0,397$), entre as médias da população de *E. coli* em água de coco sem nitrogênio (Caldo 1) e em água de coco com nitrogênio (*pool* de médias dos seis caldos com nitrogênio, ANEXO 3 e 4) nos intervalos de tempo de 0 a 5 horas de cultivo. A diferença entre a maior e menor média da população foi de cerca 0,5 log₁₀ UFC/mL. Portanto, a água de coco diluída em partes iguais com água destilada, sem adição de qualquer outro nutriente mostrou-se um meio de cultura adequado para o crescimento de *E. coli* ATCC 25922. Esse resultado pode ser atribuído a composição da água de coco, principalmente a presença de glicose em quantidade suficiente para promover o crescimento do microrganismo.

Quando o *pool* de médias do crescimento de *E. coli* ATCC 25922 nos sete caldos de água de coco foi comparado com o crescimento nos caldos comerciais CL e TSB (ANEXO 5), os resultados da Análise de Variância (ANEXO 6) não mostraram diferença significativa ($P > 0,321$) entre as médias da população.

Os dados obtidos de UFC/mL em função do tempo e as respectivas curvas de crescimento da cepa de *E. coli* ATCC 25922 em caldos água de coco, CL e TSB e da cepa de *E. coli* CE-7A em Caldo 2, estão apresentadas nos ANEXOS 8 a 17. Podemos observar que alguns pontos de dados (em UFC/mL) fogem do perfil da curva, esses pontos foram ajustados (alinhados) ao segmento da curva e os resultados estão representados nos ANEXOS 18 a 27, onde também são mostrados os dados de DO das culturas.

A DO determinada durante os experimentos foi utilizada para estimar a população de *E. coli*, sendo essa informação importante para calcular a faixa de diluição utilizada nas contagens e otimizar tempo e material de análise.

Foi verificada uma alta correlação entre DO e \log_{10} UFC/mL. Esses resultados e a faixa de equivalência (DO e UFC/mL) são mostrados na TABELA 8.

Os valores dos coeficientes de correlação, de 0,9748 a 0,9986, foram extremamente elevados, próximos à associação perfeita (-1 a +1), demonstrando uma relação linear entre DO e população de *E. coli* (UFC/mL) para a faixa dos valores analisados. Essa relação foi diretamente proporcional, entre $1,4 \times 10^7$ e $1,6 \times 10^9$ UFC/mL, em intervalos diferentes de acordo com o meio de cultura utilizado (TABELA 8). Dados semelhantes aos encontrados por DOMÍNGUEZ, ROSA & BOROBIO (2001) que estabeleceram que a DO de *E. coli* ATCC 25922, em caldo Mueller-Hinton a 37 °C e 50 rpm, é diretamente proporcional à contagem de células viáveis em ágar entre 4×10^6 e 3×10^8 UFC/mL.

TABELA 8 – Coeficientes de Correlação, r , entre DO e \log_{10} UFC/mL e seus intervalos de equivalência, determinados em caldos de cultura com *E. coli*, a 37 °C.

Caldo – cepa	Coeficiente de Correlação ⁽¹⁾	Intervalo de Equivalência ⁽²⁾
Caldo 1 - <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,9985	$1,4 \times 10^7$ a $4,2 \times 10^8$ UFC/mL
Caldo 2 - <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,9831	$3,2 \times 10^7$ a $1,6 \times 10^9$ UFC/mL
Caldo 3 - <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,9878	$1,2 \times 10^8$ a $1,6 \times 10^9$ UFC/mL
Caldo 4 - <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,9848	$2,8 \times 10^7$ a $7,7 \times 10^8$ UFC/mL
Caldo 5 - <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,9813	$2,6 \times 10^7$ a $5,8 \times 10^8$ UFC/mL
Caldo 6 - <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,9832	$5,5 \times 10^7$ a $1,3 \times 10^9$ UFC/mL
Caldo 7 - <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,9748	$5,3 \times 10^7$ a $1,2 \times 10^9$ UFC/mL
Caldo CL - <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,9847	$6,9 \times 10^7$ a $4,7 \times 10^8$ UFC/mL
Caldo TSB - <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,9900	$3,3 \times 10^7$ a $1,6 \times 10^9$ UFC/mL
Caldo 2 - <i>E. coli</i> CE-7A	0,9862	$8,2 \times 10^7$ a $8,0 \times 10^8$ UFC/mL

⁽¹⁾ Correlação de DO (Y) versus \log_{10} UFC/mL (X)

⁽²⁾ Intervalo onde a DO foi diretamente proporcional à contagem de células viáveis em ágar

As curvas de crescimento das duas cepas de *E. coli* nos caldos testados estão representadas nas FIGURAS 1 a 10, com as equações de regressão estimadas e os coeficientes de determinação, r^2 . O número de células viáveis (UFC/mL) linearizado por transformação logarítmica (\ln UFC/mL) permitiu o ajuste dos dados ao modelo de regressão linear simples. Os resultados das análises de regressão linear e das análises de variância são mostradas nos Anexos de 29 a 38.

O padrão de crescimento foi exponencial, mas a duração da fase não foi uniforme, variou de 3 a 5 horas nos caldos água de coco e foi maior, 6 horas, nos caldos CL e TSB. No trabalho de CORNU, DELIGNETTE-MULLER & FLANDROIS (1999) verificamos fase exponencial com duração de cerca de 5 a 7 horas, em cultivos de *E. coli* em meio sintético mínimo, contendo glicose (0,11 g/L) como fonte de carbono. Dado semelhante ao do Caldo TSB foi observado no trabalho de HASSAN & FRIDOVICH (1977) em cultivos de *E. coli* utilizando TSB suplementado com 0,5 % de extrato de levedura, a 37 °C e 200 rpm.

A duração da fase exponencial não influenciou os valores de velocidade específica de crescimento (μ) das culturas, e está provavelmente relacionada à composição dos meios e a população inicial das culturas.

No Caldo 1 (FIGURA 1) a cultura se manteve em fase exponencial durante 5 horas, intervalo de tempo (0 h a 5 h) utilizado para estimar a equação de regressão linear. Considerando os baixos teores de proteína, menor que 0,1 g % (JAYALEKSHMY *et al.*, 1986; CAMPO *et al.*, 1996; SREBERNICH, 1998) e a concentração de açúcares redutores na água de coco *in natura* (média de 4,54 g % em 3 amostras analisadas), então a disponibilidade de nutrientes no meio era basicamente, carboidratos, cerca de 2,3 g % de glicose e frutose como fonte de carbono e energia.

O coeficiente de regressão de 1,0191 ln UFC/mL por hora, expressa a alteração na população de *E. coli* por variação de tempo e corresponde à velocidade específica de crescimento da cultura, μ , relacionada ao tempo de duplicação através da Eq. 3: $t_d = \ln 2/\mu$ (STAINER *et al.*, 1995; DALGAARD *et al.*, 1994).

No Caldo 1 o tempo de duplicação foi de 0,68 h ou 40,8 min. Resultados semelhantes foram relatados por HASSAN & FRIDOVICH (1977) com tempos de duplicação de 32 min (TSB + 0,5 % de extrato de levedura), 39 min (CN + 0,5 % glicose), 42 min (tripticase peptona + 0,5 % de peptona) e 46 min (meio mínimo + 1,0 % de glicose) em cultivos a 37 °C e 200 rpm.

O valor de r^2 de 0,9889 no Caldo 1 significa que o ajuste da regressão explica 98,89 % da variação total de Y, deixando apenas 1,11 % para a variação residual (erro), o que é considerado um bom ajuste. Todas as equações de regressão estimadas, inclusive aquela com menor valor de r^2 , 0,9605 no Caldo 2 com a cepa de *E. coli* CE-7A, explicam quase 100% da variabilidade do conjunto de dados.

O ajuste ao modelo de regressão pode ainda ser avaliado pela soma dos quadrados dos resíduos; um bom ajuste é obtido quando a soma dos quadrados é menor que 1 (DUFFY, WHITING & SHERIDAN, 1999). Em todas as regressões esse valor foi menor que 1 (ANEXO 39).

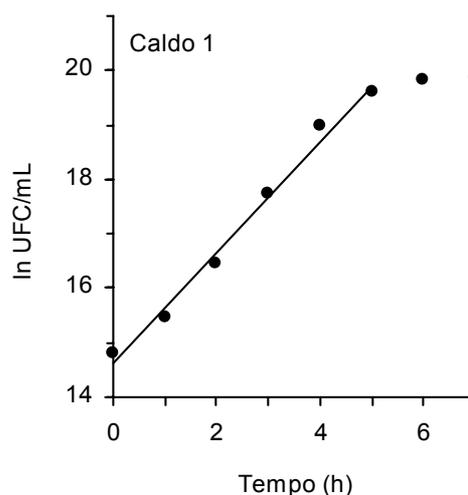


FIGURA 1 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 1, à base de água de coco verde; ● ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,6226 + 1,0191X$, $r^2 = 0,9889$.

A duração da fase exponencial da cultura de *E. coli* ATCC 25922 no Caldo 2 (FIGURA 2) foi de 0 a 5 horas, com uma velocidade específica de crescimento de $1,2181 \text{ h}^{-1}$, correspondendo ao tempo de duplicação de 34,1 min. Esse crescimento mais rápido em relação ao Caldo 1, embora estatisticamente não significativo ($P > 0,05$), pode ser atribuído à adição de 0,5 % de peptona no meio.

No Caldo 3 a fase exponencial da cultura teve uma duração de 4 horas, com uma velocidade específica de crescimento de $1,5607 \text{ h}^{-1}$ e tempo de duplicação de 26,6 min (FIGURA 3). Esse tempo de geração é muito próximo do tempo de 20 min para culturas de *E. coli* em condições ótimas de crescimento (INGRAHAM, MAALØE & NEIDHARDT, 1997).

O crescimento mais rápido no Caldo 3, porém, não significativo ($P > 0,05$) em relação ao Caldo 2, novamente pode ser atribuído à adição de peptona, e em concentração maior (1,0 %) do que no Caldo 2 (0,5 %). O efeito da peptona sobre a velocidade de crescimento da cultura no Caldo 3 fica mais evidente se comparado ao Caldo 1, estatisticamente diferente ($P < 0,05$).

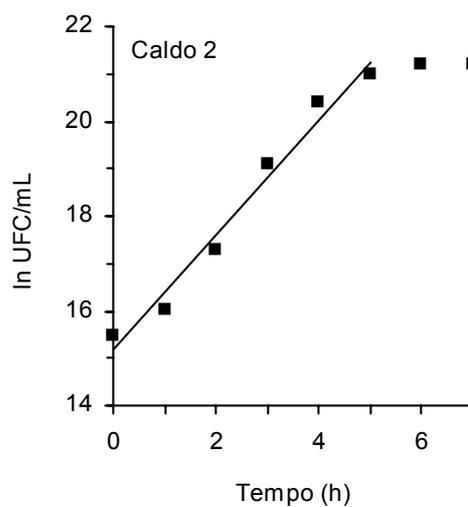


FIGURA 2 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 2, à base de água de coco verde enriquecida com 0,5 % de peptona; ■ ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 15,1629 + 1,2181X$, $r^2 = 0,9769$.

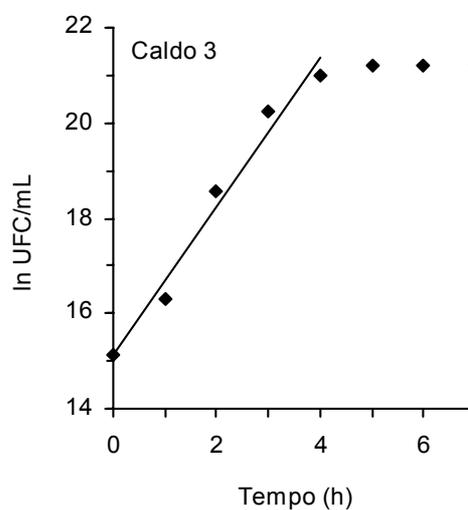


FIGURA 3 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 3, à base de água de coco verde enriquecida com 1,0 % de peptona; ◆ ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 15,1316 + 1,5607X$, $r^2 = 0,9768$.

No Caldo 4, o tempo de duplicação de *E. coli* foi de 33,3 min durante a fase exponencial da cultura de 0 a 4 horas (FIGURA 4). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as velocidades de crescimento em relação aos outros caldos testados. A fase exponencial foi mais curta, mas o tempo de duplicação foi semelhante, 32 min, ao de culturas em TSB + 0,5 % de extrato de levedura (HASSAN & FRIDOVICH, 1977).

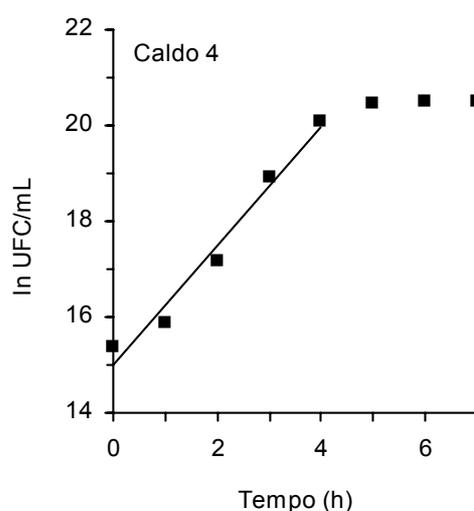


FIGURA 4 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 4, à base de água de coco verde enriquecida com 0,1 % de sulfato de amônia; ■ ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,9804 + 1,2480X$, $r^2 = 0,9731$.

No Caldo 5, a fase exponencial foi mais curta, apenas 3 horas, e ocorreu entre 1 e 4 horas de crescimento (FIGURA 5). Este foi o único meio onde foi observada uma fase de latência, de 1 hora, apesar do inóculo ter sido proveniente de uma cultura em fase exponencial em caldo BHI.

Segundo INGRAHAM, MAALØE & NEIDHARDT (1997), o comprimento da fase lag pode variar consideravelmente, podendo ser curta ou não existir se o inóculo é obtido de uma cultura na fase exponencial de crescimento ou, pode ser longa se o inóculo é obtido de um meio rico complexo e o microrganismo é colocado em um meio mínimo definido. Nesse caso, provavelmente, o microrganismo teria

que sintetizar muitas proteínas envolvidas na geração dos componentes celulares que estavam prontamente disponíveis no meio complexo.

A velocidade específica de crescimento de *E. coli* no Caldo 5 foi de $1,5995 \text{ h}^{-1}$, um tempo de duplicação de 26,0 min. O crescimento mais rápido ($P>0,05$) em relação ao Caldo 4 (33,3 min) pode indicar que a concentração de sulfato de amônia de 5 g/L é mais adequada do que 1 g/L adicionada ao caldo 4. A velocidade de crescimento foi maior ($P<0,05$) em relação ao Caldo 1.

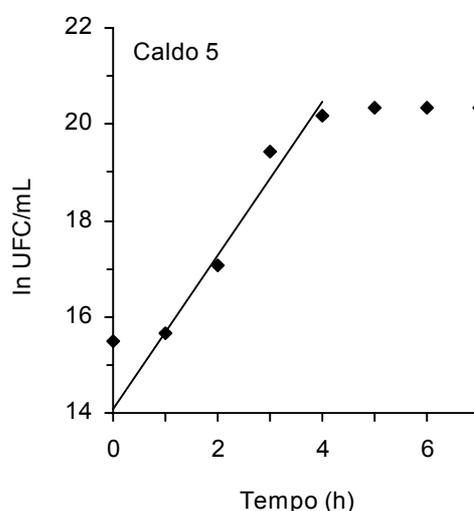


FIGURA 5 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 5, à base de água de coco verde enriquecida com 0,5 % de sulfato de amônia; ♦ ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,0998 + 1,5995X$, $r^2 = 0,9660$.

O menor tempo de duplicação da cultura de *E. coli* ATCC 25922 ocorreu no Caldo 7 (25,0 min) e foi semelhante ($P>0,05$) no Caldo 6, com um tempo de 27,6 min (TABELA 9). Os dois caldos diferem apenas na concentração de extrato de levedura adicionada ao meio. Tanto o Caldo 7 quanto o Caldo 6 foram mais eficientes ($P<0,05$) para o crescimento de *E. coli* do que o Caldo 1. As curvas de crescimento do Caldo 6 e Caldo 7 estão representadas nas FIGURAS 6 e 7, respectivamente.

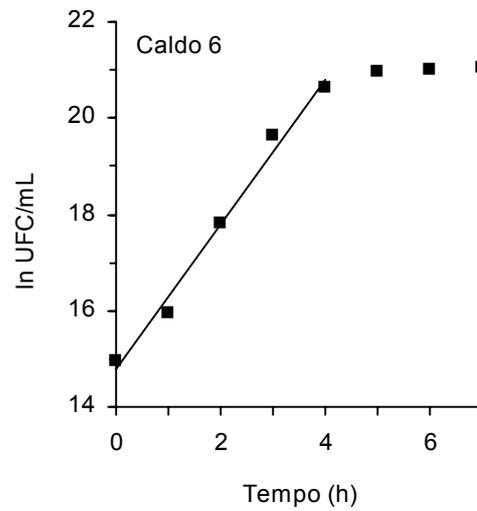


FIGURA 6 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 6, à base de água de coco verde enriquecida com 0,5 % de extrato de levedura; ■ ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,7856 + 1,5043X$, $r^2 = 0,9882$.

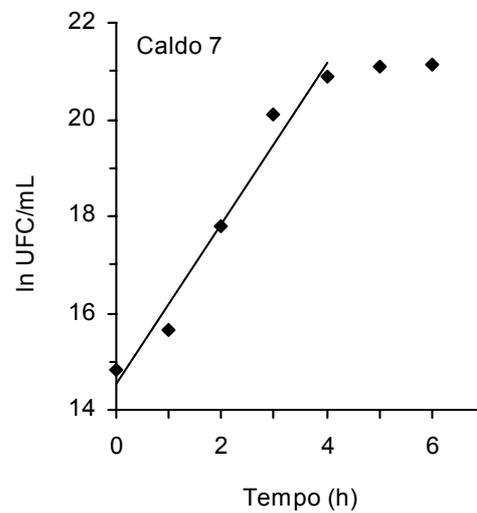


FIGURA 7 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo 7, à base de água de coco verde enriquecida com 1,0 % de extrato de levedura; ◆ ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,5281 + 1,6630X$, $r^2 = 0,9714$.

Nos Caldos CL e TSB a duração da fase exponencial de crescimento foi mais longa, 6 horas. As velocidades específicas de crescimento de $1,1026 \text{ h}^{-1}$ (CL) e $1,1912 \text{ h}^{-1}$ (TSB), foram semelhantes ($P>0,05$), com tempo de duplicação de 37,7 e 34,9 min, respectivamente (FIGURAS 8 e 9).

O crescimento no caldo CL foi mais lento ($P<0,05$) do que no Caldo 7, mas foi semelhante ($P>0,05$) aos outros caldos. Comparando com o Caldo 2, que tem a mesma concentração de peptona (0,5 %), a diferença se encontra na concentração e na fonte de carbono e energia, glicose e frutose no primeiro, e lactose (0,5 %) e extrato de carne (0,3 %) no caldo CL. Sabe-se que para a maioria das bactérias, incluindo *E. coli*, a glicose é a fonte de carbono e energia mais comum e mais rapidamente assimilada para o crescimento. A lactose, também utilizada por *E. coli*, provavelmente é menos preferida do que glicose por ser um dissacarídeo e requerer duas enzimas (β -galactosídeo permease e β -galactosidase) na conversão da molécula em glicose e galactose.

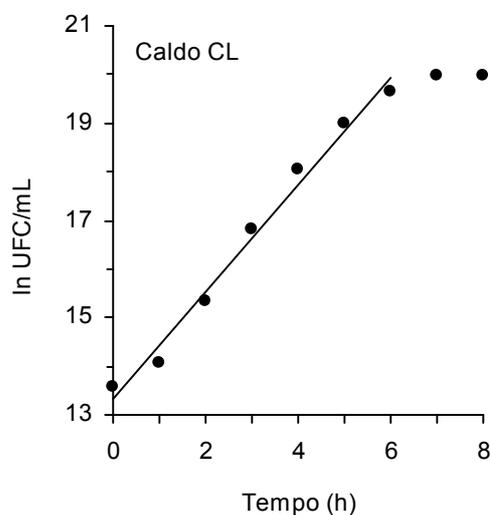


FIGURA 8 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo CL; ● ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 13,3356 + 1,1026X$, $r^2 = 0,9863$.

No Caldo TSB o tempo de duplicação de *E. coli* de 34,9 min foi semelhante a 29,4 e 34,2 min para culturas no mesmo caldo à temperatura de 35 °C e 40 °C, respectivamente (DOYLE & SCHOENI, 1984).

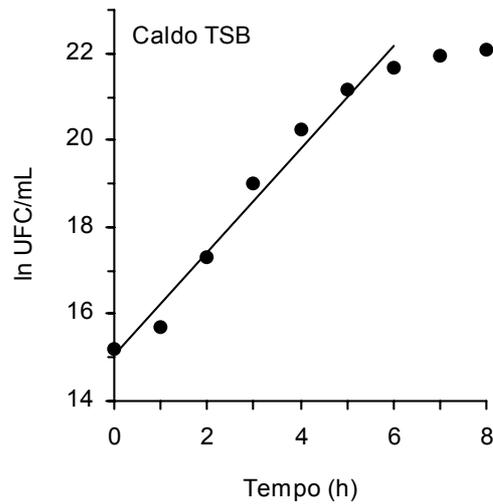


FIGURA 9 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Caldo TSB; ● ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 15,0419 + 1,1912X$, $r^2 = 0,9763$.

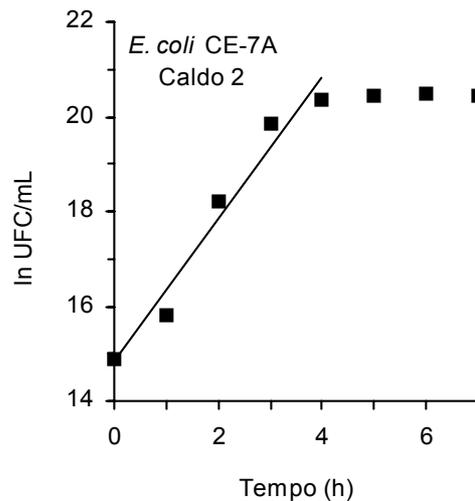


FIGURA 10 – Curva de crescimento de *Escherichia coli* CE-7A em Caldo 2; ■ ln UFC/mL, — regressão linear: $\hat{Y} = 14,8369 + 1,4929X$, $r^2 = 0,9605$.

A FIGURA 10 mostrou a curva de crescimento da cultura em Caldo 2 com a cepa de *E. coli* CE-7A, isolada de ostras. A cultura se manteve em fase exponencial durante 4 horas, com uma velocidade específica de crescimento de $1,4929 \text{ h}^{-1}$ (ANEXO 41) e tempo de duplicação de 27,9 min. Esse resultado não foi significativo ($P>0,05$) entre as duas cepas testadas no Caldo 2, apesar do tempo de duplicação maior da cepa padrão de 34,1 min.

A TABELA 9 resume os dados de velocidade específica de crescimento das culturas de *E. coli* ATCC 25922 com o resultado do teste de significância e tempo de duplicação e duração da fase exponencial em cada meio.

A maior velocidade específica de crescimento da cultura ocorreu no Caldo 7 ($1,6630 \text{ h}^{-1}$) e foi significativamente diferente ($P<0,05$) do Caldo 1, que apresentou a menor velocidade ($1,0191 \text{ h}^{-1}$). O menor tempo de duplicação ocorreu no Caldo 7, de 25,0 min; resultado semelhante a 21,0 e 23,0 min relatados por LI, NIX & SCHENTAG (1993) em culturas da mesma cepa, mas utilizando caldo Mueller-Hinton a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Segundo STAINER *et al.* (1995) e INGRAHAM, MAALØE & NEIDHARDT, (1997) a velocidade máxima em culturas de *Escherichia coli* em meio complexo e temperatura ótima é de 20 – 21 min.

DUFFY, WHITINH & SHERIDAN (1999) relatam velocidades de crescimento de $1,47 \text{ h}^{-1}$ (28,3 min) em culturas de *E. coli* O157:H7 em caldo BHI a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

No caldo TSB, que é um meio de cultura complexo, a cultura cresceu em velocidades (34,9 min) similares em relação aos caldos água de coco ($P>0,05$).

As diferenças em μ ocorreram, principalmente, em função do baixo desempenho do Caldo 1, que foi estatisticamente diferente ($P<0,05$) dos Caldos 7, 5, 3 e 6; e também do Caldo CL, que foi diferente ($P<0,05$) apenas do Caldo 7 (TABELA 9 e ANEXO 40).

TABELA 9 – Velocidade específica de crescimento, μ , tempo de duplicação, t_d , e duração da fase exponencial da cultura de *E. coli* ATCC 25922 em caldos água de coco, CL e TSB.

Caldo	μ (h^{-1})	t_d (min)	Duração da Fase log (h)
Caldo 7	1,6630 a	25,0	0 a 4
Caldo 5	1,5955 a b	26,1	1 a 4
Caldo 3	1,5607 a b	26,6	0 a 4
Caldo 6	1,5043 a b	27,6	0 a 4
Caldo 4	1,2480 a b c	33,3	0 a 4
Caldo 2	1,2181 a b c	34,1	0 a 5
Caldo TSB	1,1912 a b c	34,9	0 a 6
Caldo CL	1,1026 b c	37,7	0 a 6
Caldo 1	1,0191 c	40,8	0 a 5

Valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey (ANEXO 40).

O crescimento de *E. coli* ATCC 25922 em alguns caldos à base de água de coco enriquecida com nitrogênio pareceu ser mais rápido ou semelhante aos meios CL e TSB (FIGURAS 1 a 9). Para melhor avaliar a evolução do crescimento, foram estimadas as velocidades específicas instantâneas de crescimento das culturas e assim determinadas suas velocidades específicas máximas (μ_m).

A velocidade específica instantânea de crescimento foi estimada calculando μ por diferença finita: $\mu = \Delta \ln[x]/\Delta t$ (Eq. 4) (RIBEIRO & HORII, 2004) e os resultados estão apresentados na TABELA 10. As culturas apresentaram velocidades específicas máximas de crescimento, μ_m , entre 1 e 3 horas de cultivo, dependendo do meio.

O crescimento de *E. coli* nos caldos água de coco foi exponencial até uma rápida transição para a fase estacionária, caracterizada por uma brusca diminuição na velocidade instantânea de crescimento (TABELA 10). Perfil diferente foi observado nos caldos CL e TSB, onde a transição para fase estacionária foi gradual. Essas variações devem estar mais relacionadas à composição dos meios. Nos caldos água de coco a fonte de carbono e energia era, basicamente, carboidratos

(açúcares redutores) e extrato de levedura (Caldo 6 e 7), no caldo TSB, embora com apenas 0,25 % de glicose, estavam disponíveis peptonas de caseína (1,7 %) e soja (0,3 %), enquanto no caldo CL, lactose (0,5 %) e extrato de carne (0,3 %).

TABELA 10 – Velocidade instantânea de crescimento, μ (h^{-1}), de duas cepas de *E. coli* a 37 °C em caldos à base de água de coco, CL e TSB.

Tempo (h)	<i>E. coli</i> ATCC 25922									<i>E. coli</i> CE-7A
	Caldo 1	Caldo 2	Caldo 3	Caldo 4	Caldo 5	Caldo 6	Caldo 7	CL	TSB	Caldo 2
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0,6347	0,5398	1,1856	0,5033	0,1540	1,0350	0,8456	0,5141	0,5222	0,9340
2	0,9951	1,2647	2,2615	1,2950	1,4055	1,8486	2,1179	1,2588	1,6235	2,3960
3	1,2672	1,8355	1,6523	1,7765	2,3760	1,8150	2,3432	1,4984	1,6822	1,6276
4	1,2461	1,2805	0,7471	1,1294	0,7447	0,9911	0,7775	1,2274	1,2545	0,4949
5	0,6324	0,6106	0,2083	0,4014	0,1738	0,3321	0,2075	0,9475	0,9059	0,1081
6	0,2283	0,1921	0,0190	0,0405	-	0,0520	0,0230	0,6481	0,5066	0,0473
7	0,0304	0,0162	-	-	-	-	-	0,3196	0,2595	-
8	-	-	-	-	-	-	-	0,0094	0,1633	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1054	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0094	-

- Valores nulos ou negativos

Durante o crescimento houve variação em μ , que teoricamente é suposta ser constante de acordo com a hipótese da fase exponencial; tal variação também foi observada por CORNU, DELIGNETTE-MULLER & FLANDROIS (1999). Segundo DALGAARD *et al.* (1994), μ tipicamente declina quando a densidade da população aproxima-se da máxima.

A velocidade de crescimento de uma população microbiana pode desacelerar ou até mesmo parar antes da exaustão de nutrientes, um efeito atribuído a alterações no pH do meio e/ou a acumulação de metabólitos secundários (TRINCI & THURSTON, 1976).

Em cultivos de *E. coli* ocorre formação de ácidos orgânicos, principalmente acetato, que age como inibidor do crescimento celular (AXE & BAILEY, 1995). Isto ocorre em maior quantidade em meio de cultura complexo, onde a quantidade de nutrientes disponível sob a forma de aminoácidos e vitaminas presentes em extrato de levedura ou bacto-triptona, faz com que o microrganismo consuma estes compostos para biossíntese e a fonte de carbono (glicose) para obtenção de energia, utilizando as vias fermentativas como forma de regulação do fluxo de nutrientes presentes. Uma maior concentração de extrato de levedura pode acarretar em maior concentração de subprodutos, como o ácido acético, no meio de cultivo (SUAREZ; LIRIA & KILIKIAN, 1998). Correlações entre velocidades específicas de crescimento e de formação de ácido acético indicam que, em baixos valores de crescimento, a síntese praticamente não existe. Porém, isso é dependente da cepa e das condições do cultivo (KILIKIAN *et al.*, 2000).

As concentrações de extrato de levedura adicionadas à água de coco, 0,5 % e 1,0 % nos Caldo 6 e Caldo 7, respectivamente, mostraram-se adequadas, uma vez que no Caldo 7 ocorreu a mais alta velocidade específica de crescimento da cultura de *E. coli*, com valor semelhante também no Caldo 6 (TABELA 9).

As maiores velocidades específicas máximas de crescimento, μ_m , foram obtidas no Caldo 2 com *E. coli* CE-7A ($2,3960 \text{ h}^{-1}$, entre 1 e 2 h), e no Caldo 5 ($2,3760 \text{ h}^{-1}$), Caldo 7 ($2,3432 \text{ h}^{-1}$) e Caldo 3 ($2,2615 \text{ h}^{-1}$), com *E. coli* ATCC 25922, nessa ordem (TABELA 10).

No Caldo 1 ocorreu a menor μ_m , $1,2672 \text{ h}^{-1}$, determinada no intervalo de tempo entre 2 e 3 horas. Isso significa que a adição de nitrogênio à água de coco favoreceu a cultura de *E. coli*.

Após 24 horas de cultivo a densidade máxima da população de *E. coli* ATCC 25922 foi obtida em Caldo TSB ($4,6 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$), com resultados semelhantes também em Caldo 4, Caldo 6, Caldo 3, Caldo 2 e Caldo 7 ($1,0 - 1,4 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$) (ANEXOS 16, 11, 13, 10, 9 e 14, nessa ordem).

Em Caldo CL, Caldo 1 e Caldo 5 a população máxima foi de $2,1 - 6,5 \times 10^8$ UFC/mL (respectivamente, ANEXOS 15, 8 e 12) após 24 horas.

A população de *E. coli* CE-7A em Caldo 2 após 24 h foi de $6,5 \times 10^8$ UFC/mL (ANEXO 17).

5 CONCLUSÕES

- A água de coco verde pura só se mostrou eficiente para o crescimento de *E. coli* quando a esterilização foi por filtração.
- A água de coco verde diluída em partes iguais (1:1) com água destilada promoveu o crescimento de *E. coli* independente do processo de esterilização - filtração ou autoclavação a 121 °C/10 min.
- As fontes e as concentrações de nitrogênio - extrato de levedura (0,5 % e 1,0 %), sulfato de amônia (0,5 %) e peptona (1,0 %) - adicionadas à água de coco verde proporcionaram as maiores velocidades específicas de crescimento, μ (h^{-1}), das culturas de *E. coli* ATCC 25922.
- No Caldo 7, água de coco verde diluída e enriquecida com 1,0 % de extrato de levedura, a cultura de *E. coli* ATCC 25922 apresentou a maior velocidade específica de crescimento com tempo de duplicação de 25,0 min, mantendo a população em 10^9 UFC/mL até 24 horas.
- No Caldo 1, água de coco diluída sem adição de nutrientes, a cultura de *E. coli* ATCC 25922 apresentou o maior tempo de duplicação, 40,8 min, mantendo a população em 10^8 UFC/mL até 24 horas.
- Nos Caldos CL e TSB, o tempo de duplicação da cultura de *E. coli* ATCC 25922 foi de 37,7 e 34,9 min, respectivamente. Após 24 horas a população era de $2,1 \times 10^8$ e $4,6 \times 10^9$ UFC/mL, nessa ordem.
- Todos os caldos à base de água de coco diluída, independente da adição de nutrientes, se mostraram viáveis para o crescimento de *E. coli* ATCC 25922, nas condições desse experimento, com uma população após 24 horas entre 10^8 – 10^9 UFC/mL.

- A utilização do Caldo 2, água de coco diluída e enriquecida com 0,5 % de peptona, se mostrou viável para o crescimento da cepa de *E. coli* isolada de ostras. O tempo de duplicação da cultura foi de 27,9 min. Após 24 horas a população era de $6,5 \times 10^8$ UFC/mL.

- O emprego de água de coco para o cultivo de *Escherichia coli* é um processo viável, principalmente devido a sua eficiência, baixo custo e disponibilidade da matéria-prima, podendo ser empregado em laboratórios como um meio de cultivo bacteriano alternativo.

RECOMENDAÇÕES

Considerando os resultados favoráveis ao crescimento de *Escherichia coli* obtidos nos caldos à base de água de coco verde em relação aos caldos comerciais, caldo lactose e caldo soja triptona, recomendam-se:

- estudos voltados à cultura de outras bactérias;
- pesquisa de fatores de crescimento presentes na água de coco;
- estudos sobre a viabilização do meio de cultura, utilizando processos como liofilização ou ultrafiltração.

ANEXO

ANEXO 1 – Análise de Variância para os dados* população de *Escherichia coli* ATCC 25922, em ln UFC/mL, em seis intervalos de tempo de 0 h a 5 h, em seis caldos à base de água de coco suplementada com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio.

Causas de Variação	Soma de Quadrado	G.L.	Quadrado Médio	F	Valor-P ⁽¹⁾
Fonte de Nitrogênio ⁽²⁾	1,43541	2	0,71770	0,12258	0,88508
Concentração de Nitrogênio ⁽³⁾	0,45111	1	0,45111	0,07705	0,78325
Fonte*Concentração	0,43485	2	0,21742	0,03713	0,96359
Resíduo	175,65460	30	5,85515		
Total	177,97597	35			

* Dados da TABELA 7

⁽¹⁾ Valor-P ou nível descritivo é o nível de significância

⁽²⁾ Fonte: 1 = peptona, 2 = sulfato de amônia e 3 = extrato de levedura

⁽³⁾ Concentração: 1 = peptona 5 g/L, sulfato de amônia 1 g/L e extrato de levedura 5 g/L
2 = peptona 10 g/L, sulfato de amônia 5 g/L e extrato de levedura 10 g/L

Caldo X (Fonte_Concentração): Caldo 2 (1_1), Caldo 3 (1_2), Caldo 4 (2_1), Caldo 5 (2_2),
Caldo 6 (3_1) e Caldo 7 (3_2)

ANEXO 2 – Médias* e variâncias da população de *Escherichia coli* ATCC 25922, em seis caldos à base de água de coco suplementada com nitrogênio.

Fatores [FN_CN]	Médias (ln UFC/mL)	Variância
[1_2] = Caldo 3	18,7428	6,4267
[3_2] = Caldo 7	18,3960	7,4558
[3_1] = Caldo 6	18,3209	6,2444
[1_1] = Caldo 2	18,2081	5,3157
[2_2] = Caldo 5	18,0366	4,9976
[2_1] = Caldo 4	17,9747	4,6907

* Médias calculadas sobre seis intervalos de tempo, de 0 h a 5 h.

ANEXO 3 – População* de *Escherichia coli* ATCC 25922, em caldos à base de água de coco.

Tempo (h)	Médias (ln UFC/mL)	
	Caldo 1 ⁽¹⁾	Caldo CN ⁽²⁾
0	14,8238	15,2032
1	15,4585	15,9138
2	16,4536	17,6126
3	17,7208	19,5790
4	18,9669	20,5241
5	19,5993	20,8464

* Média de três repetições

⁽¹⁾ Caldo 1 - sem adição de nitrogênio

⁽²⁾ Caldo CN - *pool* de médias dos seis caldos suplementados com nitrogênio

ANEXO 4 – Resultado do teste **t** para os dados do Anexo 3.

Médias A1 vs A2	Média Amostra 1	Média Amostra 2	Valor-t	G.L.	Valor-P
Caldo 1 vs Caldo CN	17,1701	18,2799	0,88442	10	0,39724

ANEXO 5 – População* de *Escherichia coli* ATCC 25922, em caldos água de coco (AC), CL e TSB.

Tempo (h)	Médias (ln UFC/mL)		
	Caldo AC ⁽¹⁾	Caldo CL	Caldo TSB
0	15,1490	13,5581	15,1782
1	15,8487	14,0722	15,7004
2	17,4470	15,3310	17,3239
3	19,3136	16,8294	19,0061
4	20,3016	18,0568	20,2606
5	20,6682	19,0043	21,1665
6	-	19,6524	21,6731

* Média de três repetições

⁽¹⁾ Caldo AC - pool de médias dos sete caldos à base de água de coco

ANEXO 6 – Análise de Variância para os dados* população de *Escherichia coli* ATCC 25922, em ln UFC/mL, em caldos água de coco, CL e TSB.

Causas de Variação	Soma de Quadrado	G.L.	Quadrado Médio	F	Valor-P ⁽¹⁾
Meios de cultura ⁽²⁾	14,62798	2	7,31399	6,01913	0,32118
Resíduo	102,32522	17	6,01913		
Total	116,95320	19			

* Dados do ANEXO 5

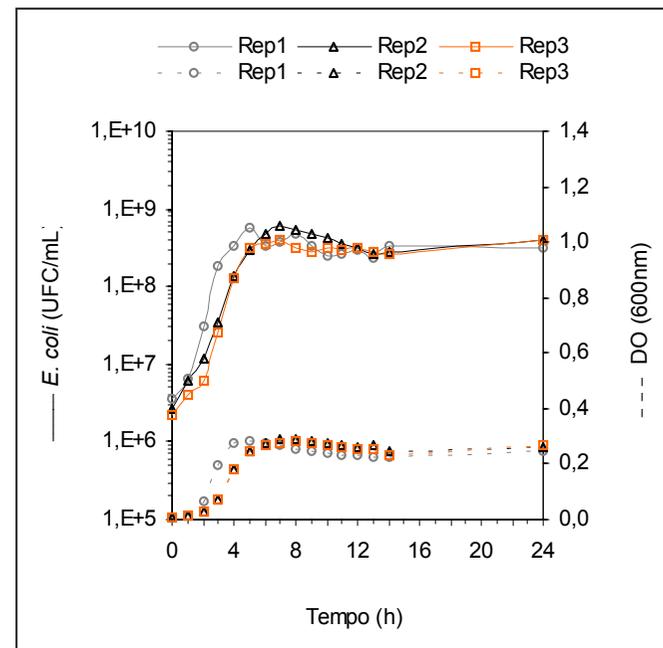
ANEXO 7 – Médias* e variâncias da população de *Escherichia coli* ATCC 25922 em caldos AC, CL e TSB.

Tratamentos	Médias (ln UFC/mL)	Variância
Caldo TSB	18,6155	6,7828
Caldo AC	18,1213	5,4232
Caldo CL	16,6435	5,7521

* Médias calculadas sobre os dados do ANEXO 5.

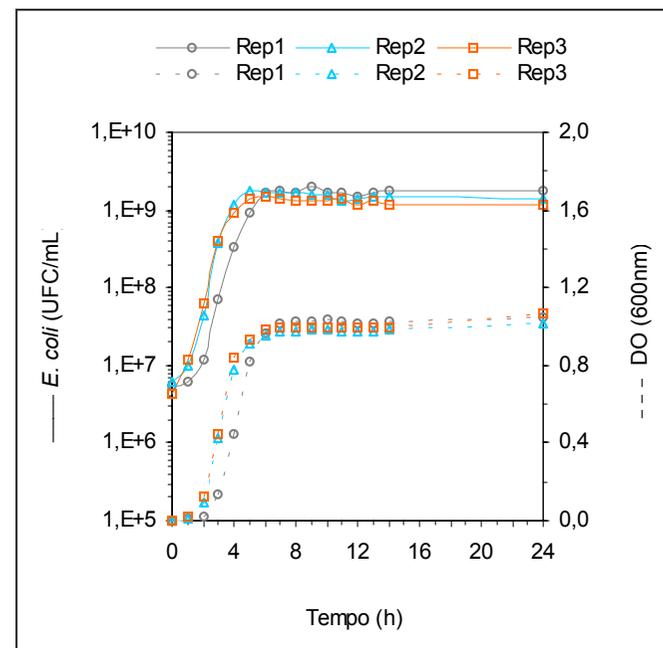
ANEXO 8 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 1.

Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	3,6E+6	2,6E+6	2,2E+6	2,7E+6	0,005	0,005	0,005	0,005
1	6,4E+6	6,0E+6	4,0E+6	5,4E+6	0,017	0,014	0,012	0,014
2	3,0E+7	1,2E+7	6,0E+6	1,3E+7	0,067	0,028	0,026	0,040
3	1,8E+8	3,5E+7	2,5E+7	5,4E+7	0,199	0,075	0,069	0,114
4	3,3E+8	1,4E+8	1,3E+8	1,8E+8	0,275	0,178	0,179	0,211
5	5,7E+8	3,0E+8	3,1E+8	3,8E+8	0,282	0,248	0,245	0,258
6	3,3E+8	4,8E+8	3,6E+8	3,8E+8	0,277	0,273	0,265	0,272
7	3,7E+8	6,0E+8	4,1E+8	4,5E+8	0,266	0,289	0,274	0,276
8	4,9E+8	5,3E+8	3,2E+8	4,4E+8	0,254	0,292	0,283	0,276
9	3,4E+8	4,8E+8	2,8E+8	3,6E+8	0,246	0,286	0,278	0,270
10	2,5E+8	4,2E+8	3,2E+8	3,2E+8	0,239	0,274	0,270	0,261
11	2,6E+8	3,5E+8	3,0E+8	3,0E+8	0,229	0,266	0,261	0,252
12	2,9E+8	3,1E+8	3,1E+8	3,0E+8	0,229	0,262	0,253	0,248
13	2,3E+8	2,6E+8	2,8E+8	2,6E+8	0,226	0,266	0,252	0,248
14	3,4E+8	2,8E+8	2,7E+8	3,0E+8	0,225	0,246	0,233	0,235
...
24	3,2E+8	4,1E+8	4,1E+8	3,8E+8	0,249	0,264	0,265	0,259



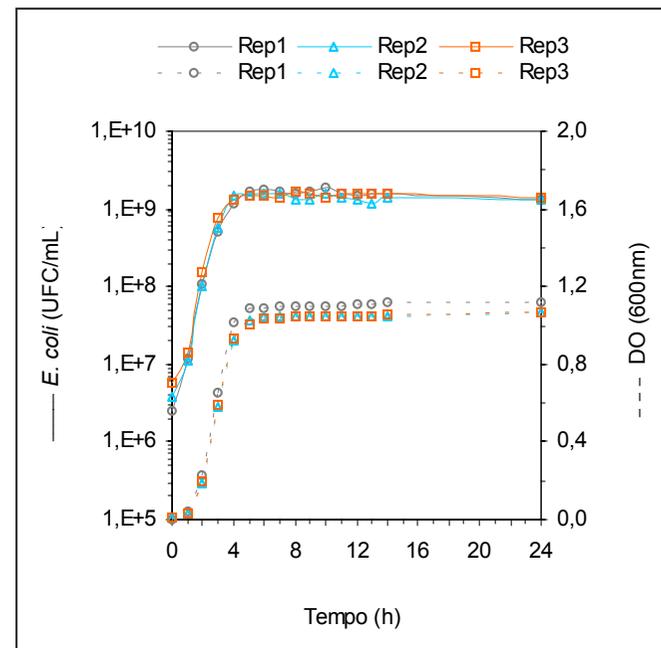
ANEXO 9 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 2.

Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	5,4E+6	6,0E+6	4,4E+6	5,2E+6	0,005	0,005	0,005	0,005
1	6,0E+6	1,0E+7	1,2E+7	9,0E+6	0,010	0,011	0,025	0,015
2	1,2E+7	4,3E+7	6,2E+7	3,2E+7	0,024	0,092	0,123	0,080
3	7,1E+7	3,7E+8	4,0E+8	2,2E+8	0,131	0,426	0,450	0,336
4	3,4E+8	1,2E+9	9,0E+8	7,2E+8	0,446	0,782	0,844	0,691
5	9,1E+8	1,8E+9	1,4E+9	1,3E+9	0,818	0,914	0,935	0,889
6	1,7E+9	1,7E+9	1,5E+9	1,6E+9	0,966	0,958	0,983	0,969
7	1,8E+9	1,7E+9	1,4E+9	1,6E+9	1,017	0,972	0,990	0,993
8	1,7E+9	1,7E+9	1,3E+9	1,6E+9	1,026	0,978	0,991	0,998
9	2,0E+9	1,6E+9	1,3E+9	1,6E+9	1,028	0,980	0,994	1,001
10	1,7E+9	1,6E+9	1,3E+9	1,5E+9	1,032	0,980	0,993	1,002
11	1,7E+9	1,3E+9	1,4E+9	1,5E+9	1,021	0,976	0,994	0,997
12	1,5E+9	1,4E+9	1,2E+9	1,4E+9	1,020	0,978	0,996	0,998
13	1,7E+9	1,5E+9	1,3E+9	1,5E+9	1,020	0,978	0,999	0,999
14	1,8E+9	1,5E+9	1,2E+9	1,5E+9	1,026	0,980	0,999	1,002
...
24	1,8E+9	1,4E+9	1,2E+9	1,4E+9	1,049	1,013	1,065	1,042



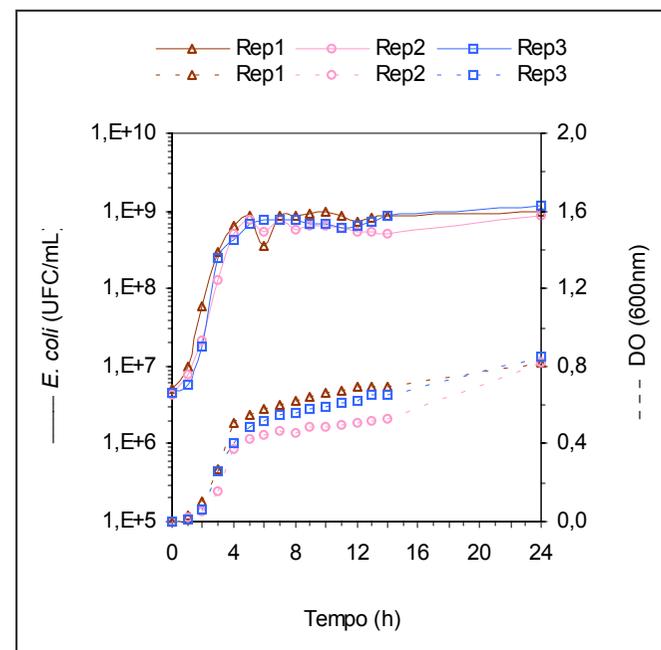
ANEXO 10 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 3.

Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	2,5E+6	3,7E+6	5,7E+6	3,7E+6	0,004	0,006	0,008	0,006
1	1,2E+7	1,1E+7	1,4E+7	1,2E+7	0,043	0,033	0,035	0,037
2	1,1E+8	9,9E+7	1,5E+8	1,2E+8	0,225	0,185	0,200	0,203
3	5,2E+8	5,8E+8	7,7E+8	6,1E+8	0,649	0,577	0,591	0,606
4	1,2E+9	1,5E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,017	0,925	0,931	0,958
5	1,7E+9	1,5E+9	1,5E+9	1,6E+9	1,086	1,026	1,006	1,039
6	1,8E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,6E+9	1,092	1,050	1,036	1,059
7	1,7E+9	1,6E+9	1,4E+9	1,6E+9	1,099	1,050	1,039	1,063
8	1,6E+9	1,3E+9	1,7E+9	1,5E+9	1,099	1,045	1,044	1,063
9	1,7E+9	1,3E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,099	1,045	1,042	1,062
10	1,9E+9	1,6E+9	1,4E+9	1,6E+9	1,102	1,045	1,042	1,063
11	1,6E+9	1,4E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,097	1,045	1,045	1,062
12	1,5E+9	1,3E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,110	1,044	1,048	1,067
13	1,6E+9	1,2E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,111	1,045	1,050	1,069
14	1,6E+9	1,4E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,115	1,047	1,053	1,072
...
24	1,3E+9	1,3E+9	1,4E+9	1,3E+9	1,119	1,065	1,068	1,084



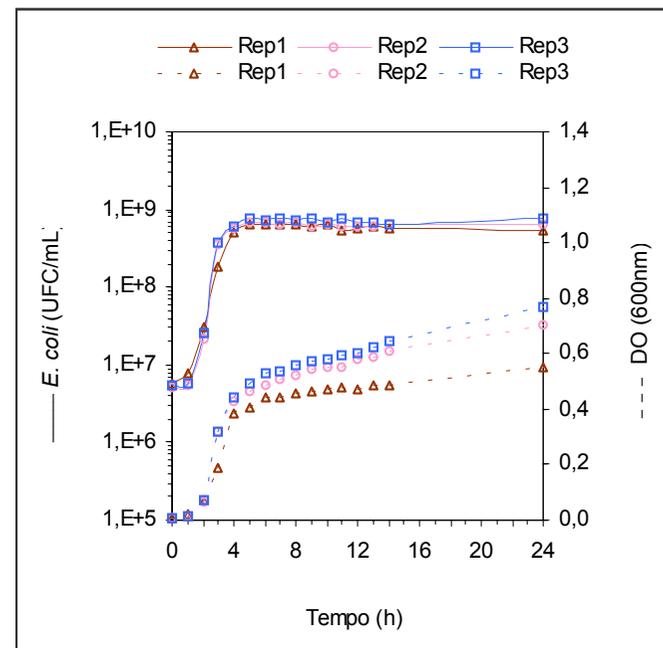
ANEXO 11 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 4.

Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	5,2E+6	4,4E+6	4,5E+6	4,7E+6	0,005	0,005	0,005	0,005
1	1,0E+7	7,9E+6	5,9E+6	7,8E+6	0,028	0,022	0,014	0,021
2	6,0E+7	2,1E+7	1,8E+7	2,8E+7	0,108	0,055	0,057	0,073
3	3,0E+8	1,3E+8	2,5E+8	2,1E+8	0,265	0,154	0,263	0,227
4	6,6E+8	5,0E+8	4,2E+8	5,2E+8	0,509	0,378	0,405	0,431
5	8,8E+8	7,6E+8	7,0E+8	7,8E+8	0,552	0,421	0,482	0,485
6	3,6E+8	5,4E+8	7,8E+8	5,3E+8	0,580	0,444	0,522	0,515
7	8,6E+8	7,5E+8	7,9E+8	8,0E+8	0,601	0,463	0,550	0,538
8	8,7E+8	5,8E+8	7,5E+8	7,2E+8	0,618	0,460	0,562	0,547
9	9,4E+8	6,3E+8	6,8E+8	7,4E+8	0,643	0,485	0,578	0,569
10	1,0E+9	6,3E+8	7,0E+8	7,6E+8	0,665	0,490	0,592	0,582
11	8,6E+8	5,9E+8	6,0E+8	6,7E+8	0,675	0,498	0,612	0,595
12	7,2E+8	5,5E+8	6,6E+8	6,4E+8	0,691	0,510	0,618	0,606
13	8,3E+8	5,4E+8	7,4E+8	6,9E+8	0,691	0,518	0,650	0,620
14	8,6E+8	5,1E+8	8,5E+8	7,2E+8	0,697	0,525	0,652	0,625
...
24	9,8E+8	8,7E+8	1,2E+9	1,0E+9	0,821	0,816	0,853	0,830



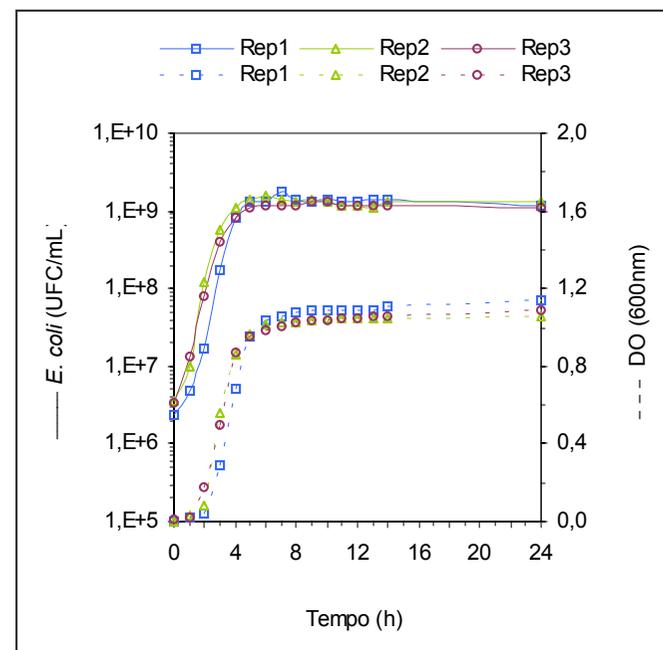
ANEXO 12 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 5.

Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	5,9E+6	5,1E+6	5,3E+6	5,4E+6	0,005	0,005	0,005	0,005
1	7,8E+6	5,5E+6	5,9E+6	6,3E+6	0,022	0,017	0,016	0,018
2	3,0E+7	2,2E+7	2,6E+7	2,6E+7	0,069	0,067	0,072	0,069
3	1,8E+8	3,6E+8	3,8E+8	2,9E+8	0,191	0,317	0,317	0,275
4	5,2E+8	5,8E+8	6,2E+8	5,7E+8	0,381	0,427	0,441	0,416
5	6,5E+8	6,9E+8	7,5E+8	7,0E+8	0,409	0,462	0,495	0,455
6	6,4E+8	6,8E+8	7,4E+8	6,9E+8	0,439	0,483	0,532	0,485
7	6,4E+8	6,4E+8	7,6E+8	6,8E+8	0,444	0,509	0,540	0,498
8	6,3E+8	6,7E+8	7,3E+8	6,8E+8	0,460	0,522	0,555	0,512
9	6,2E+8	6,2E+8	7,5E+8	6,6E+8	0,463	0,542	0,573	0,526
10	6,4E+8	6,4E+8	7,0E+8	6,6E+8	0,473	0,551	0,580	0,535
11	5,4E+8	6,1E+8	7,6E+8	6,3E+8	0,477	0,551	0,592	0,540
12	5,7E+8	6,0E+8	6,9E+8	6,2E+8	0,473	0,582	0,603	0,553
13	6,2E+8	6,0E+8	6,8E+8	6,3E+8	0,483	0,589	0,622	0,565
14	5,8E+8	6,3E+8	6,4E+8	6,2E+8	0,483	0,609	0,644	0,579
...
24	5,5E+8	6,3E+8	7,8E+8	6,5E+8	0,549	0,706	0,768	0,674



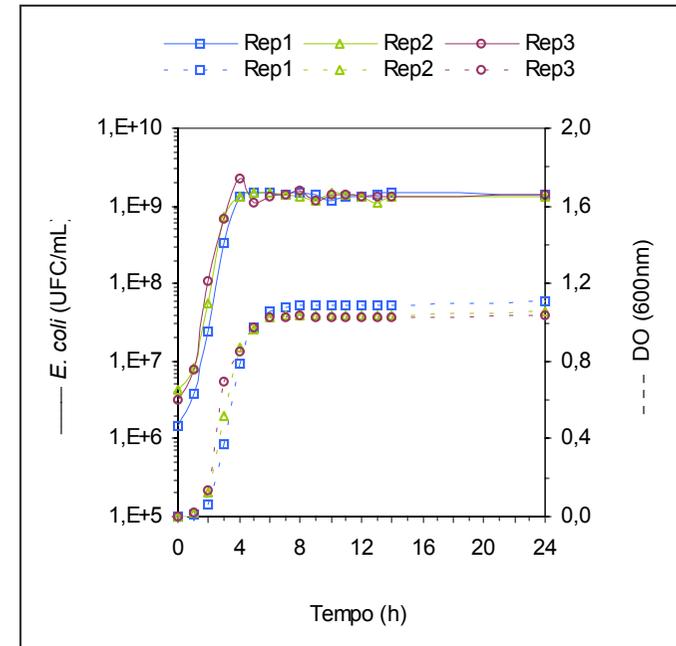
ANEXO 13 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 6.

Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	2,4E+6	3,5E+6	3,4E+6	3,1E+6	0,005	0,005	0,008	0,006
1	4,9E+6	1,0E+7	1,3E+7	8,6E+6	0,016	0,028	0,025	0,023
2	1,7E+7	1,2E+8	8,0E+7	5,5E+7	0,045	0,085	0,174	0,101
3	1,7E+8	5,7E+8	3,9E+8	3,4E+8	0,288	0,558	0,494	0,447
4	8,0E+8	1,1E+9	8,4E+8	9,0E+8	0,682	0,862	0,873	0,806
5	1,3E+9	1,4E+9	1,1E+9	1,3E+9	0,955	0,962	0,953	0,957
6	1,3E+9	1,6E+9	1,2E+9	1,4E+9	1,035	1,012	0,981	1,009
7	1,8E+9	1,4E+9	1,2E+9	1,4E+9	1,055	1,030	1,009	1,031
8	1,4E+9	1,3E+9	1,2E+9	1,3E+9	1,080	1,030	1,021	1,044
9	1,3E+9	1,4E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,087	1,037	1,035	1,053
10	1,4E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,089	1,042	1,038	1,056
11	1,3E+9	1,2E+9	1,2E+9	1,2E+9	1,090	1,043	1,048	1,060
12	1,3E+9	1,2E+9	1,2E+9	1,2E+9	1,092	1,046	1,051	1,063
13	1,4E+9	1,1E+9	1,2E+9	1,2E+9	1,092	1,047	1,053	1,064
14	1,4E+9	1,3E+9	1,2E+9	1,3E+9	1,107	1,047	1,057	1,070
...
24	1,2E+9	1,3E+9	1,1E+9	1,2E+9	1,144	1,062	1,089	1,098



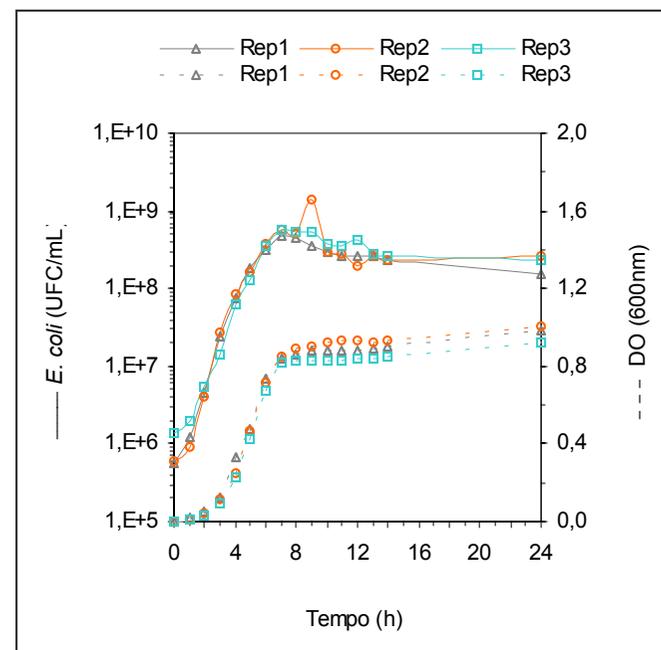
ANEXO 14 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 7.

Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	1,5E+6	4,3E+6	3,1E+6	2,7E+6	0,005	0,005	0,005	0,005
1	3,9E+6	8,1E+6	8,0E+6	6,3E+6	0,010	0,018	0,024	0,017
2	2,4E+7	5,5E+7	1,1E+8	5,3E+7	0,062	0,122	0,132	0,105
3	3,3E+8	7,1E+8	7,0E+8	5,5E+8	0,374	0,514	0,691	0,526
4	1,3E+9	1,3E+9	2,2E+9	1,5E+9	0,792	0,872	0,851	0,838
5	1,5E+9	1,5E+9	1,1E+9	1,4E+9	0,974	0,960	0,971	0,968
6	1,5E+9	1,5E+9	1,3E+9	1,4E+9	1,055	1,021	1,028	1,035
7	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,079	1,036	1,030	1,048
8	1,5E+9	1,3E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,084	1,038	1,032	1,051
9	1,4E+9	1,2E+9	1,2E+9	1,3E+9	1,086	1,038	1,031	1,052
10	1,2E+9	1,5E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,084	1,035	1,029	1,049
11	1,3E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,084	1,038	1,026	1,049
12	1,3E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,083	1,038	1,027	1,049
13	1,4E+9	1,1E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,084	1,038	1,028	1,050
14	1,5E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,4E+9	1,084	1,034	1,028	1,049
...
24	1,4E+9	1,3E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,109	1,054	1,040	1,068



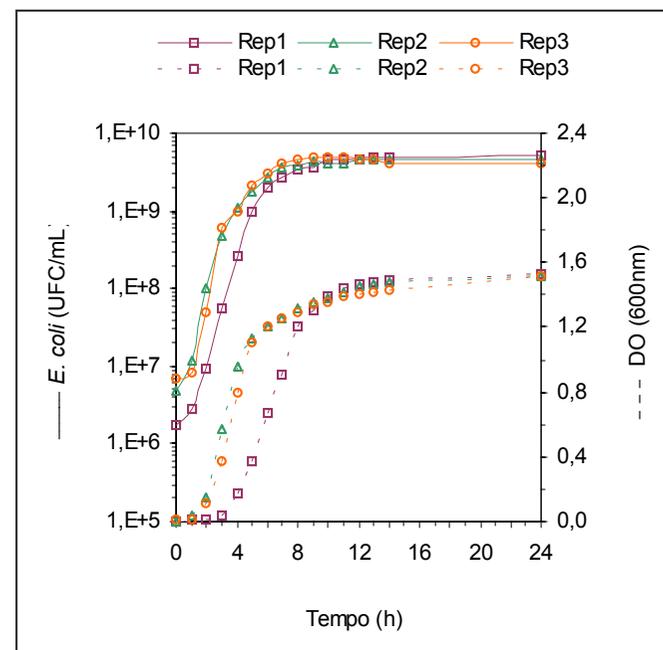
ANEXO 15 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo CL.

Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	5,5E+5	6,0E+5	1,4E+6	7,7E+5	0,005	0,005	0,005	0,005
1	1,2E+6	9,0E+5	2,0E+6	1,3E+6	0,017	0,014	0,011	0,014
2	4,6E+6	4,1E+6	5,4E+6	4,7E+6	0,055	0,039	0,033	0,042
3	2,4E+7	2,7E+7	1,4E+7	2,1E+7	0,120	0,116	0,090	0,109
4	7,4E+7	8,4E+7	6,2E+7	7,3E+7	0,336	0,250	0,228	0,271
5	1,8E+8	1,6E+8	1,3E+8	1,6E+8	0,477	0,464	0,428	0,456
6	3,2E+8	3,7E+8	3,6E+8	3,5E+8	0,735	0,713	0,673	0,707
7	4,8E+8	5,7E+8	5,7E+8	5,4E+8	0,836	0,854	0,820	0,837
8	4,4E+8	5,0E+8	5,4E+8	4,9E+8	0,863	0,895	0,825	0,861
9	3,6E+8	1,4E+9	5,3E+8	6,4E+8	0,879	0,900	0,830	0,870
10	3,0E+8	3,0E+8	3,8E+8	3,2E+8	0,886	0,924	0,830	0,880
11	2,6E+8	2,8E+8	3,5E+8	2,9E+8	0,886	0,930	0,830	0,882
12	2,6E+8	2,0E+8	4,3E+8	2,8E+8	0,886	0,930	0,840	0,885
13	2,6E+8	2,6E+8	2,8E+8	2,7E+8	0,890	0,925	0,842	0,886
14	2,4E+8	2,4E+8	2,7E+8	2,5E+8	0,900	0,933	0,852	0,895
...
24	1,5E+8	2,6E+8	2,3E+8	2,1E+8	0,980	1,009	0,927	0,972



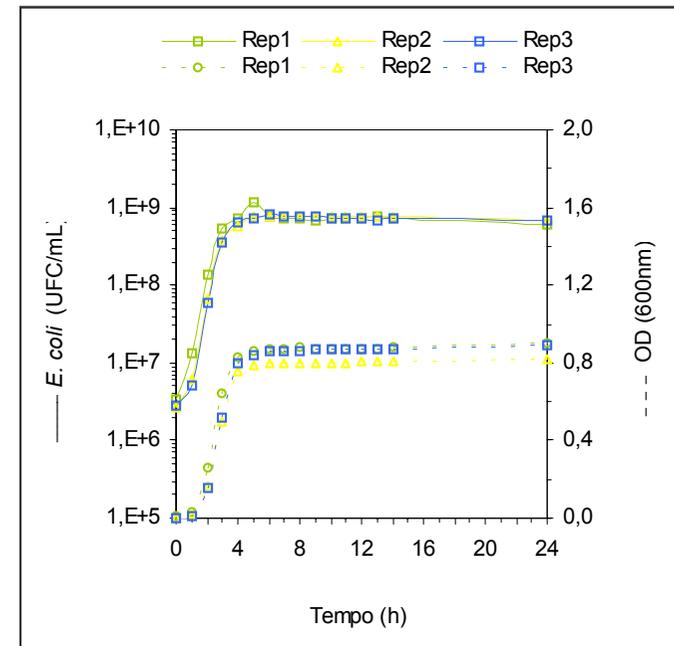
ANEXO 16 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo TSB.

Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	1,8E+6	4,8E+6	6,9E+6	3,9E+6	0,005	0,006	0,007	0,006
1	2,8E+6	1,2E+7	8,5E+6	6,6E+6	0,009	0,034	0,018	0,020
2	9,5E+6	1,0E+8	4,9E+7	3,6E+7	0,014	0,153	0,110	0,092
3	5,5E+7	4,9E+8	6,1E+8	2,5E+8	0,035	0,571	0,378	0,328
4	2,6E+8	1,1E+9	9,6E+8	6,5E+8	0,175	0,954	0,792	0,640
5	1,0E+9	1,8E+9	2,1E+9	1,6E+9	0,376	1,128	1,108	0,871
6	2,0E+9	2,7E+9	3,1E+9	2,6E+9	0,671	1,205	1,202	1,026
7	2,7E+9	3,6E+9	4,1E+9	3,4E+9	0,909	1,251	1,257	1,139
8	3,5E+9	3,9E+9	4,5E+9	3,9E+9	1,205	1,320	1,299	1,275
9	3,7E+9	4,3E+9	4,9E+9	4,3E+9	1,308	1,351	1,337	1,332
10	4,5E+9	4,2E+9	4,8E+9	4,5E+9	1,394	1,377	1,359	1,377
11	4,7E+9	4,2E+9	5,0E+9	4,6E+9	1,440	1,421	1,390	1,417
12	4,5E+9	4,5E+9	4,5E+9	4,5E+9	1,465	1,450	1,400	1,438
13	4,9E+9	4,6E+9	4,6E+9	4,7E+9	1,479	1,462	1,420	1,454
14	4,9E+9	4,6E+9	4,0E+9	4,5E+9	1,489	1,475	1,428	1,464
...
24	5,3E+9	4,5E+9	4,1E+9	4,6E+9	1,527	1,523	1,518	1,523



ANEXO 17 – Dados brutos do crescimento de *Escherichia coli* CE-7A a 37 °C em Caldo 2.

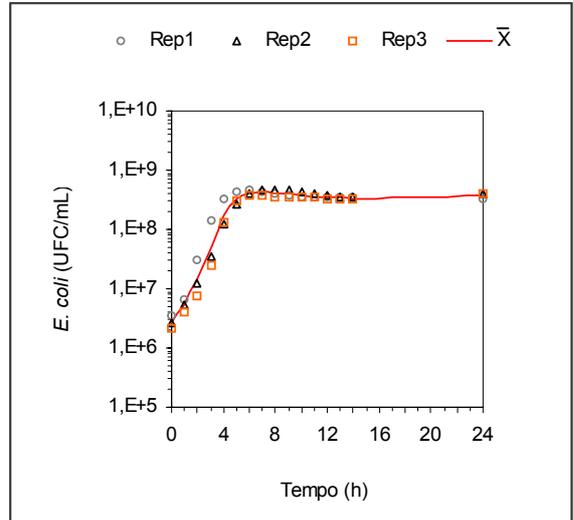
Tempo	UFC/mL				DO a 600 nm			
	Rep1	Rep2	Rep3	Média Geométrica	Rep1	Rep2	Rep3	Média
0	3,3E+6	2,7E+6	2,8E+6	2,9E+6	0,006	0,005	0,005	0,005
1	1,3E+7	6,2E+6	5,1E+6	7,4E+6	0,034	0,019	0,012	0,022
2	1,4E+8	6,7E+7	5,8E+7	8,2E+7	0,257	0,168	0,151	0,192
3	5,4E+8	3,8E+8	3,5E+8	4,2E+8	0,639	0,497	0,520	0,552
4	7,4E+8	5,6E+8	6,3E+8	6,4E+8	0,829	0,752	0,793	0,791
5	1,2E+9	7,8E+8	7,3E+8	8,8E+8	0,857	0,785	0,843	0,828
6	7,8E+8	7,9E+8	8,2E+8	8,0E+8	0,869	0,795	0,859	0,841
7	7,4E+8	7,8E+8	7,9E+8	7,7E+8	0,875	0,797	0,862	0,845
8	7,2E+8	7,8E+8	7,8E+8	7,6E+8	0,876	0,799	0,865	0,847
9	7,0E+8	7,6E+8	7,6E+8	7,4E+8	0,872	0,800	0,866	0,846
10	7,2E+8	7,6E+8	7,3E+8	7,4E+8	0,875	0,799	0,866	0,847
11	7,3E+8	7,8E+8	7,2E+8	7,4E+8	0,872	0,800	0,870	0,847
12	7,3E+8	7,6E+8	7,2E+8	7,4E+8	0,869	0,804	0,871	0,848
13	7,6E+8	7,8E+8	7,0E+8	7,5E+8	0,867	0,804	0,868	0,846
14	7,4E+8	7,9E+8	7,1E+8	7,5E+8	0,881	0,807	0,870	0,853
...
24	5,9E+8	6,9E+8	6,7E+8	6,5E+8	0,905	0,819	0,887	0,870



ANEXO 18 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 1 e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL)*.

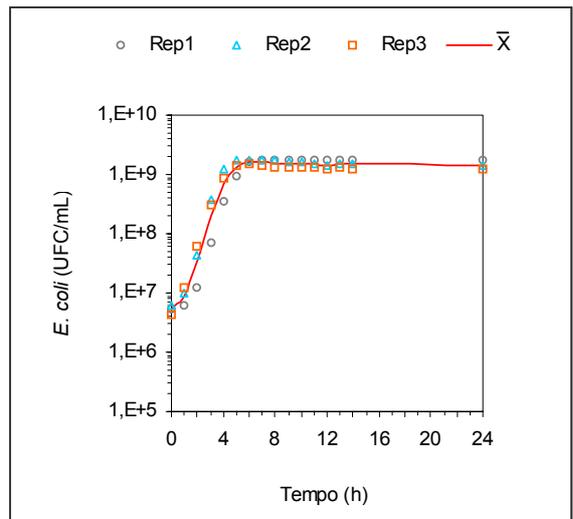
Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	3,6E+6	2,6E+6	2,2E+6	2,7E+6	14,8238
1	6,4E+6	5,4E+6	4,0E+6	5,2E+6	15,4585
2	3,0E+7	1,2E+7	7,6E+6	1,4E+7	16,4536
3	1,4E+8	3,5E+7	2,5E+7	5,0E+7	17,7208
4	3,3E+8	1,2E+8	1,3E+8	1,7E+8	18,9669
5	4,4E+8	2,6E+8	3,0E+8	3,2E+8	19,5993
6	4,6E+8	4,0E+8	3,7E+8	4,1E+8	19,8276
7	4,2E+8	4,8E+8	3,7E+8	4,2E+8	19,8580
8	4,0E+8	4,8E+8	3,6E+8	4,1E+8	19,8326
9	3,8E+8	4,6E+8	3,6E+8	4,0E+8	19,8013
10	3,6E+8	4,4E+8	3,4E+8	3,8E+8	19,7495
11	3,4E+8	4,0E+8	3,4E+8	3,6E+8	19,6986
12	3,4E+8	3,8E+8	3,3E+8	3,5E+8	19,6716
13	3,4E+8	3,6E+8	3,3E+8	3,4E+8	19,6536
14	3,4E+8	3,5E+8	3,2E+8	3,4E+8	19,6339
...
24	3,2E+8	4,1E+8	4,1E+8	3,8E+8	19,7491

* ln UFC/mL: calculado sobre a média geométrica das repetições



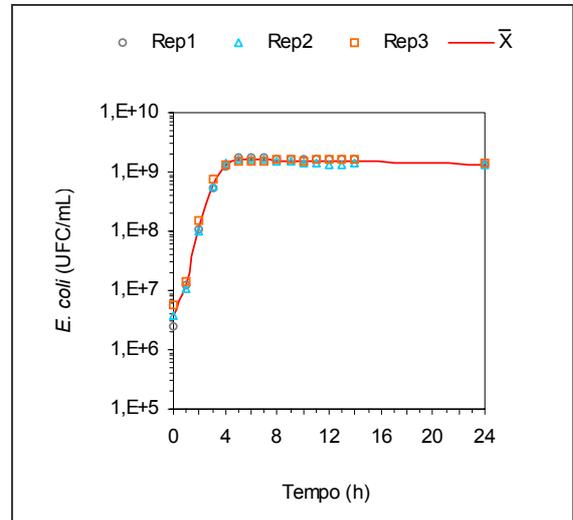
ANEXO 19 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 2 e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL).

Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	5,4E+6	6,0E+6	4,4E+6	5,2E+6	15,4688
1	6,0E+6	1,0E+7	1,2E+7	9,0E+6	16,0086
2	1,2E+7	4,3E+7	6,2E+7	3,2E+7	17,2733
3	7,1E+7	3,7E+8	3,0E+8	2,0E+8	19,1088
4	3,4E+8	1,2E+9	9,0E+8	7,2E+8	20,3893
5	9,1E+8	1,8E+9	1,4E+9	1,3E+9	20,9999
6	1,6E+9	1,7E+9	1,5E+9	1,6E+9	21,1920
7	1,8E+9	1,7E+9	1,4E+9	1,6E+9	21,2082
8	1,7E+9	1,7E+9	1,3E+9	1,6E+9	21,1645
9	1,8E+9	1,6E+9	1,3E+9	1,6E+9	21,1633
10	1,7E+9	1,6E+9	1,3E+9	1,5E+9	21,1443
11	1,7E+9	1,5E+9	1,3E+9	1,5E+9	21,1228
12	1,7E+9	1,4E+9	1,2E+9	1,4E+9	21,0731
13	1,7E+9	1,5E+9	1,3E+9	1,5E+9	21,1228
14	1,8E+9	1,5E+9	1,2E+9	1,5E+9	21,1151
...
24	1,8E+9	1,4E+9	1,2E+9	1,4E+9	21,0921



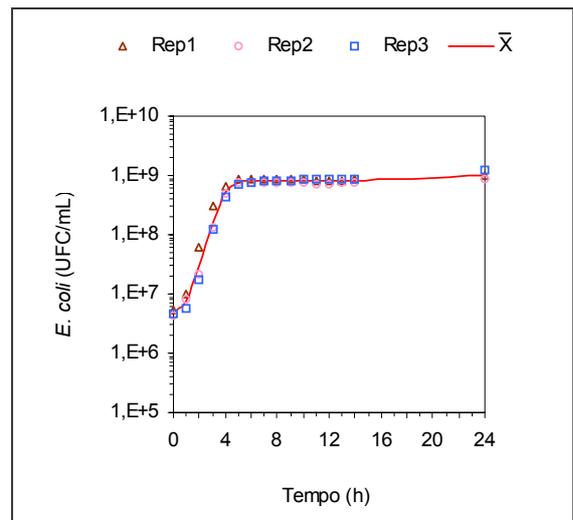
ANEXO 20 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 3 e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL).

Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	2,5E+6	3,7E+6	5,7E+6	3,7E+6	15,1372
1	1,2E+7	1,1E+7	1,4E+7	1,2E+7	16,3228
2	1,1E+8	9,9E+7	1,5E+8	1,2E+8	18,5843
3	5,2E+8	5,8E+8	7,7E+8	6,1E+8	20,2366
4	1,2E+9	1,4E+9	1,3E+9	1,3E+9	20,9837
5	1,7E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,6E+9	21,1920
6	1,8E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,6E+9	21,2110
7	1,7E+9	1,6E+9	1,5E+9	1,6E+9	21,1920
8	1,6E+9	1,5E+9	1,6E+9	1,6E+9	21,1718
9	1,6E+9	1,5E+9	1,6E+9	1,6E+9	21,1718
10	1,6E+9	1,4E+9	1,5E+9	1,5E+9	21,1272
11	1,6E+9	1,4E+9	1,6E+9	1,5E+9	21,1488
12	1,6E+9	1,3E+9	1,6E+9	1,5E+9	21,1241
13	1,6E+9	1,3E+9	1,6E+9	1,5E+9	21,1241
14	1,6E+9	1,4E+9	1,6E+9	1,5E+9	21,1488
...
24	1,3E+9	1,3E+9	1,4E+9	1,3E+9	21,0103



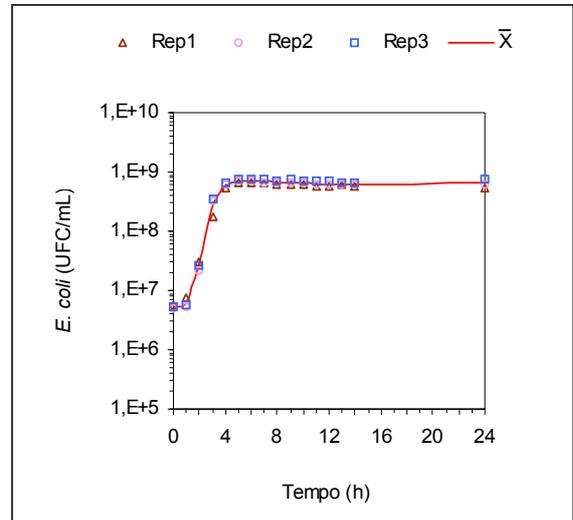
ANEXO 21 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 4 e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL).

Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	5,2E+6	4,4E+6	4,5E+6	4,7E+6	15,3603
1	1,0E+7	7,9E+6	5,9E+6	7,8E+6	15,8636
2	6,0E+7	2,1E+7	1,8E+7	2,8E+7	17,1586
3	3,0E+8	1,3E+8	1,2E+8	1,7E+8	18,9351
4	6,6E+8	5,0E+8	4,2E+8	5,2E+8	20,0645
5	8,8E+8	7,5E+8	7,0E+8	7,7E+8	20,4659
6	8,8E+8	7,6E+8	7,8E+8	8,1E+8	20,5064
7	8,6E+8	7,6E+8	7,9E+8	8,0E+8	20,5029
8	8,7E+8	7,6E+8	8,0E+8	8,1E+8	20,5110
9	8,7E+8	7,8E+8	8,2E+8	8,2E+8	20,5279
10	8,5E+8	7,4E+8	8,4E+8	8,1E+8	20,5106
11	8,3E+8	7,2E+8	8,4E+8	7,9E+8	20,4935
12	8,3E+8	7,1E+8	8,6E+8	8,0E+8	20,4967
13	8,3E+8	7,4E+8	8,8E+8	8,1E+8	20,5182
14	8,6E+8	7,5E+8	8,9E+8	8,3E+8	20,5383
...
24	9,8E+8	8,7E+8	1,2E+9	1,0E+9	20,7309



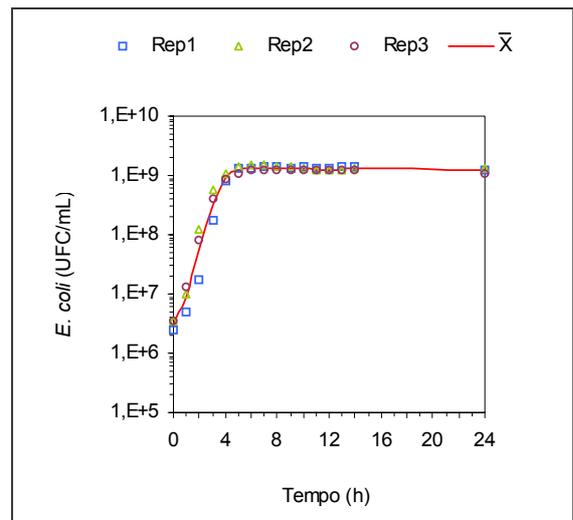
ANEXO 22 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 5 e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL).

Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	5,9E+6	5,1E+6	5,3E+6	5,4E+6	15,5061
1	7,8E+6	5,5E+6	5,9E+6	6,3E+6	15,6601
2	3,0E+7	2,2E+7	2,6E+7	2,6E+7	17,0656
3	1,8E+8	3,3E+8	3,6E+8	2,8E+8	19,4416
4	5,2E+8	6,0E+8	6,4E+8	5,8E+8	20,1863
5	6,5E+8	6,9E+8	7,5E+8	7,0E+8	20,3601
6	6,4E+8	6,9E+8	7,4E+8	6,9E+8	20,3504
7	6,4E+8	6,8E+8	7,6E+8	6,9E+8	20,3545
8	6,3E+8	6,7E+8	7,3E+8	6,8E+8	20,3309
9	6,2E+8	6,5E+8	7,5E+8	6,7E+8	20,3244
10	6,2E+8	6,4E+8	7,0E+8	6,5E+8	20,2963
11	5,7E+8	6,1E+8	7,1E+8	6,3E+8	20,2570
12	5,7E+8	6,0E+8	6,9E+8	6,2E+8	20,2419
13	6,2E+8	6,0E+8	6,8E+8	6,3E+8	20,2651
14	5,8E+8	6,3E+8	6,4E+8	6,2E+8	20,2389
...
24	5,5E+8	6,3E+8	7,8E+8	6,5E+8	20,2872



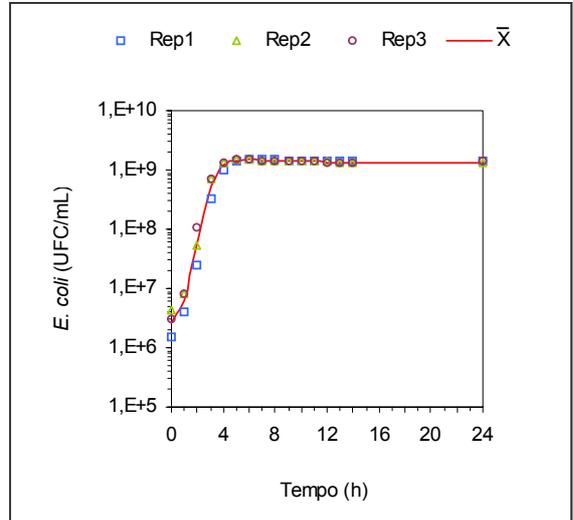
ANEXO 23 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 6 e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL).

Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	2,4E+6	3,5E+6	3,4E+6	3,1E+6	14,9328
1	4,9E+6	1,0E+7	1,3E+7	8,6E+6	15,9678
2	1,7E+7	1,2E+8	8,0E+7	5,5E+7	17,8164
3	1,7E+8	5,7E+8	3,9E+8	3,4E+8	19,6314
4	8,0E+8	1,1E+9	8,4E+8	9,0E+8	20,6225
5	1,3E+9	1,4E+9	1,1E+9	1,3E+9	20,9546
6	1,3E+9	1,5E+9	1,2E+9	1,3E+9	21,0066
7	1,4E+9	1,5E+9	1,2E+9	1,4E+9	21,0314
8	1,4E+9	1,4E+9	1,2E+9	1,3E+9	21,0084
9	1,3E+9	1,4E+9	1,2E+9	1,3E+9	20,9837
10	1,4E+9	1,3E+9	1,2E+9	1,3E+9	20,9837
11	1,3E+9	1,2E+9	1,2E+9	1,2E+9	20,9323
12	1,3E+9	1,2E+9	1,2E+9	1,2E+9	20,9323
13	1,4E+9	1,2E+9	1,2E+9	1,3E+9	20,9570
14	1,4E+9	1,3E+9	1,2E+9	1,3E+9	20,9837
...
24	1,2E+9	1,3E+9	1,1E+9	1,2E+9	20,9033



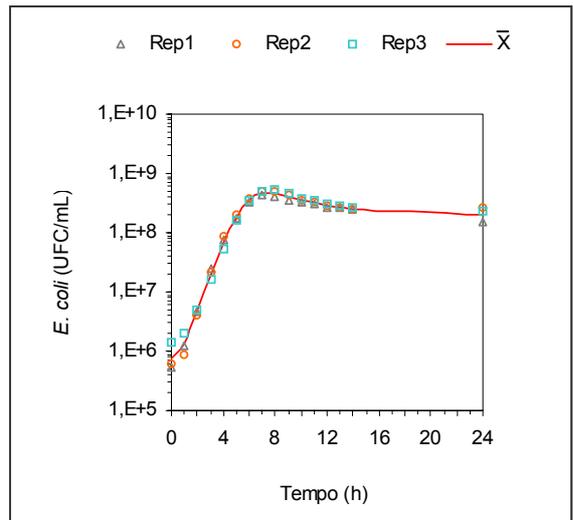
ANEXO 24 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo 7 e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL).

Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	1,5E+6	4,3E+6	3,1E+6	2,7E+6	14,8140
1	3,9E+6	8,1E+6	8,0E+6	6,3E+6	15,6596
2	2,4E+7	5,5E+7	1,1E+8	5,3E+7	17,7775
3	3,3E+8	7,1E+8	7,0E+8	5,5E+8	20,1207
4	1,0E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,2E+9	20,8982
5	1,4E+9	1,5E+9	1,5E+9	1,5E+9	21,1057
6	1,5E+9	1,5E+9	1,5E+9	1,5E+9	21,1287
7	1,5E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	21,0827
8	1,5E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	21,0827
9	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	21,0597
10	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	21,0597
11	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	1,4E+9	21,0597
12	1,4E+9	1,4E+9	1,3E+9	1,4E+9	21,0350
13	1,4E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,3E+9	21,0103
14	1,4E+9	1,3E+9	1,3E+9	1,3E+9	21,0103
...
24	1,4E+9	1,3E+9	1,4E+9	1,4E+9	21,0350



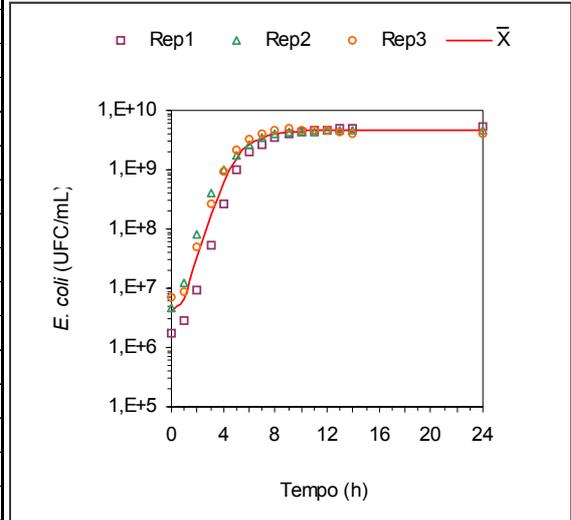
ANEXO 25 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo CL e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL).

Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	5,5E+5	6,0E+5	1,4E+6	7,7E+5	13,5581
1	1,2E+6	9,0E+5	2,0E+6	1,3E+6	14,0722
2	4,6E+6	4,1E+6	5,0E+6	4,6E+6	15,3310
3	2,4E+7	2,2E+7	1,6E+7	2,0E+7	16,8294
4	7,4E+7	8,4E+7	5,4E+7	6,9E+7	18,0568
5	1,8E+8	2,0E+8	1,6E+8	1,8E+8	19,0043
6	3,2E+8	3,7E+8	3,4E+8	3,4E+8	19,6524
7	4,2E+8	5,0E+8	5,0E+8	4,7E+8	19,9720
8	4,0E+8	5,0E+8	5,4E+8	4,8E+8	19,9814
9	3,6E+8	4,2E+8	4,8E+8	4,2E+8	19,8489
10	3,3E+8	3,6E+8	3,8E+8	3,6E+8	19,6906
11	3,0E+8	3,2E+8	3,5E+8	3,2E+8	19,5922
12	2,7E+8	2,8E+8	3,0E+8	2,8E+8	19,4612
13	2,6E+8	2,6E+8	2,8E+8	2,7E+8	19,4009
14	2,4E+8	2,4E+8	2,7E+8	2,5E+8	19,3354
...
24	1,5E+8	2,6E+8	2,3E+8	2,1E+8	19,1520



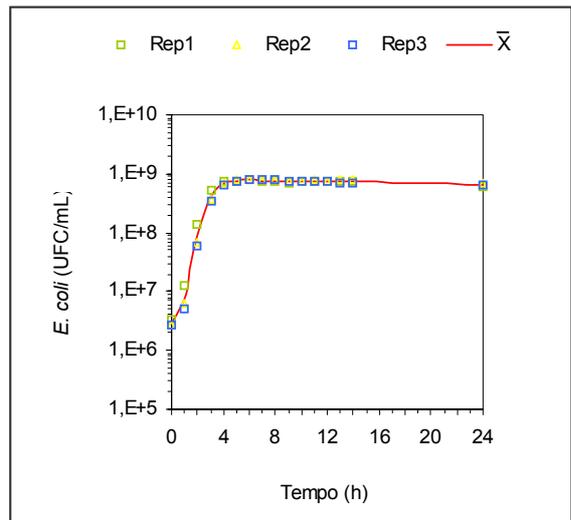
ANEXO 26 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C em Caldo TSB e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL).

Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	1,8E+6	4,8E+6	6,9E+6	3,9E+6	15,1782
1	2,8E+6	1,2E+7	8,5E+6	6,6E+6	15,7004
2	9,5E+6	8,0E+7	4,9E+7	3,3E+7	17,3239
3	5,5E+7	3,9E+8	2,7E+8	1,8E+8	19,0061
4	2,6E+8	1,0E+9	9,6E+8	6,3E+8	20,2606
5	1,0E+9	1,8E+9	2,1E+9	1,6E+9	21,1665
6	2,0E+9	2,7E+9	3,2E+9	2,6E+9	21,6731
7	2,7E+9	3,4E+9	4,1E+9	3,4E+9	21,9326
8	3,5E+9	3,9E+9	4,5E+9	3,9E+9	22,0959
9	4,0E+9	4,3E+9	4,9E+9	4,4E+9	22,2013
10	4,2E+9	4,3E+9	4,8E+9	4,4E+9	22,2107
11	4,6E+9	4,4E+9	4,8E+9	4,6E+9	22,2487
12	4,5E+9	4,5E+9	4,5E+9	4,5E+9	22,2273
13	4,9E+9	4,6E+9	4,4E+9	4,6E+9	22,2556
14	4,9E+9	4,6E+9	4,0E+9	4,5E+9	22,2238
...
24	5,3E+9	4,5E+9	4,1E+9	4,6E+9	22,2509



ANEXO 27 – Ajuste dos dados do crescimento de *Escherichia coli* CE-7A a 37 °C em Caldo 2 e transformação para logaritmo natural (ln UFC/mL).

Tempo	Repetição			Média Geométrica (\bar{X})	
	Rep1	Rep2	Rep3	UFC/mL	ln UFC/mL
0	3,3E+6	2,7E+6	2,8E+6	2,9E+6	14,8878
1	1,3E+7	6,2E+6	5,1E+6	7,4E+6	15,8218
2	1,4E+8	6,7E+7	5,8E+7	8,2E+7	18,2178
3	5,4E+8	3,8E+8	3,5E+8	4,2E+8	19,8454
4	7,4E+8	6,8E+8	6,3E+8	6,8E+8	20,3403
5	7,7E+8	7,8E+8	7,3E+8	7,6E+8	20,4484
6	7,8E+8	7,9E+8	8,2E+8	8,0E+8	20,4957
7	7,4E+8	7,8E+8	7,9E+8	7,7E+8	20,4615
8	7,2E+8	7,8E+8	7,8E+8	7,6E+8	20,4481
9	7,0E+8	7,6E+8	7,6E+8	7,4E+8	20,4214
10	7,2E+8	7,6E+8	7,3E+8	7,4E+8	20,4174
11	7,3E+8	7,8E+8	7,2E+8	7,4E+8	20,4260
12	7,3E+8	7,6E+8	7,2E+8	7,4E+8	20,4174
13	7,6E+8	7,8E+8	7,0E+8	7,5E+8	20,4301
14	7,4E+8	7,9E+8	7,1E+8	7,5E+8	20,4302
...
24	5,9E+8	6,9E+8	6,7E+8	6,5E+8	20,2902



ANEXO 28 – Dados para Correlação de DO⁽¹⁾ versus UFC/mL⁽²⁾ da população de *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* CE-7A nos meios de cultura.

Caldo 1 - <i>E. coli</i> ATCC 25922			Caldo 2 - <i>E. coli</i> ATCC 25922			Caldo 3 - <i>E. coli</i> ATCC 25922		
DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL
0,040	1,4E+7	7,1461	0,080	3,2E+7	7,5017	0,203	1,2E+8	8,0710
0,114	5,0E+7	7,6990	0,336	2,0E+8	8,2989	0,606	6,1E+8	8,7886
0,211	1,7E+8	8,2304	0,691	7,2E+8	8,8550	0,958	1,3E+9	9,1131
0,258	3,2E+8	8,5051	0,889	1,3E+9	9,1201	1,039	1,6E+9	9,2036
0,272	4,1E+8	8,6128	0,969	1,6E+9	9,2036	1,059	1,6E+9	9,2118
0,276	4,2E+8	8,6232	0,993	1,6E+9	9,2106	-	-	-
Caldo 4 - <i>E. coli</i> ATCC 25922			Caldo 5 - <i>E. coli</i> ATCC 25922			Caldo 6 - <i>E. coli</i> ATCC 25922		
DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL
0,073	2,8E+7	7,4519	0,069	2,6E+7	7,4115	0,101	5,5E+7	7,7376
0,227	1,7E+8	8,2234	0,275	2,8E+8	8,4434	0,447	3,4E+8	8,5258
0,431	5,2E+8	8,7139	0,416	5,8E+8	8,7668	0,806	9,0E+8	8,9563
0,485	7,7E+8	8,8882	0,455	7,0E+8	8,8423	0,957	1,3E+9	9,1005
0,515	8,1E+8	8,9058	-	-	-	-	-	-
Caldo 7 - <i>E. coli</i> ATCC 25922			Caldo CL - <i>E. coli</i> ATCC 25922			Caldo TSB - <i>E. coli</i> ATCC 25922		
DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL
0,105	5,3E+7	7,7207	0,271	6,9E+7	7,8420	0,092	3,3E+7	7,5237
0,526	5,5E+8	8,7383	0,456	1,8E+8	8,2535	0,328	1,8E+8	8,2543
0,838	1,2E+9	9,0760	0,707	3,4E+8	8,5349	0,640	6,3E+8	8,7991
0,968	1,5E+9	9,1661	0,837	4,7E+8	8,6737	0,871	1,6E+9	9,1925
-	-	-	0,861	4,8E+8	8,6778	1,026	2,6E+9	9,4125
Caldo 2 - <i>E. coli</i> CE-7A								
			DO	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL			
			0,192	8,2E+7	7,9119			
			0,552	4,2E+8	8,6187			
			0,791	6,8E+8	8,8337			
			0,828	7,6E+8	8,8806			
			0,841	8,0E+8	8,9012			

⁽¹⁾ Média de três repetições; ⁽²⁾ Média geométrica de três repetições

ANEXO 29 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 sobre o tempo (0h a 5h), em Caldo 1 a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	14,62263	0,163658	89,34869	0,000000	
Inclinação (b)*	1,01914	0,054054	18,85394	0,000047	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9889$					
Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,22613$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	18,17631	1	18,17631	355,4712	0,000047
Resíduo	0,20453	4	0,05113		
Total	18,38084	5			

* Intervalo de Confiança (95%): $0,8691 \leq b \leq 1,1692$

ANEXO 30 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 sobre o tempo (0h a 5h), em Caldo 2 a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	15,16290	0,283329	53,51694	0,000001	
Inclinação (b)*	1,21809	0,093580	13,01649	0,000201	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9769$					
Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,39148$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	25,96545	1	25,96545	169,4289	0,000201
Resíduo	0,61301	4	0,15325		
Total	26,57846	5			

* Intervalo de Confiança (95%): $0,9583 \leq b \leq 1,4779$

ANEXO 31 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 sobre o tempo (0h a 4h), em Caldo 3 a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	15,13156	0,339945	44,51182	0,000025	
Inclinação (b)*	1,56068	0,138782	11,24556	0,001508	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9768$					
Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,43887$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	24,35722	1	24,35722	126,4627	0,001508
Resíduo	0,57781	3	0,19260		
Total	24,93503	4			

* Intervalo de Confiança (95%): $1,1191 \leq b \leq 2,0023$

ANEXO 32 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 sobre o tempo (0h a 4h), em Caldo 4 a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	14,98044	0,293693	51,00721	0,000017	
Inclinação (b)*	1,24799	0,119900	10,40863	0,001893	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9731$					
Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,37916$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	15,57479	1	15,57479	108,3396	0,001893
Resíduo	0,43128	3	0,14376		
Total	16,00607	4			

* Intervalo de Confiança (95%): $0,8665 \leq b \leq 1,6295$

ANEXO 33 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 sobre o tempo (1h a 4h), em Caldo 5 a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	14,09975	0,579417	24,33437	0,001684	
Inclinação (b)*	1,59546	0,211573	7,54094	0,017135	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9660$					
Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,47309$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	12,72746	1	12,72746	56,86570	0,017135
Resíduo	0,44763	2	0,22382		
Total	13,17510	3			

* Intervalo de Confiança (95%): $0,6851 \leq b \leq 2,5059$

ANEXO 34 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 sobre o tempo (0h a 4h), em Caldo 6 a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	14,78558	0,232052	63,71679	0,000009	
Inclinação (b)*	1,50430	0,094735	15,87909	0,000543	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9882$					
Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,29958$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	22,62918	1	22,62918	252,1455	0,000543
Resíduo	0,26924	3	0,08975		
Total	22,89842	4			

* Intervalo de Confiança (95%): $1,2029 \leq b \leq 1,8057$

ANEXO 35 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 sobre o tempo (0h a 4h), em Caldo 7 a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	14,52810	0,403460	36,00879	0,000047	
Inclinação (b)*	1,66295	0,164712	10,09612	0,002070	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9714$ Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,52086$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	27,65403	1	27,65403	101,9316	0,002070
Resíduo	0,81390	3	0,27130		
Total	28,46793	4			

* Intervalo de Confiança (95%): $1,1388 \leq b \leq 2,1871$

ANEXO 36 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 sobre o tempo (0h a 6h), em Caldo CL a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	13,33565	0,209396	63,68627	0,000000	
Inclinação (b)*	1,10260	0,058076	18,98553	0,000007	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9863$ Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,30731$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	34,04057	1	34,04057	360,4505	0,000007
Resíduo	0,47219	5	0,09444		
Total	34,51276	6			

* Intervalo de Confiança (95%): $0,9533 \leq b \leq 1,2519$

ANEXO 37 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 sobre o tempo (0h a 6h), em Caldo TSB a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	15,04194	0,299453	50,23132	0,000000	
Inclinação (b)*	1,19120	0,083053	14,34257	0,000030	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9763$ Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,43948$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	39,73081	1	39,73081	205,7093	0,000030
Resíduo	0,96570	5	0,19314		
Total	40,69651	6			

* Intervalo de Confiança (95%): $0,9777 \leq b \leq 1,4047$

ANEXO 38 – Análise de Regressão linear simples da população (ln UFC/mL) de *E. coli* CE-7A sobre o tempo (0h a 4h), em Caldo 2 a 37 °C.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor-t	Valor-P	
Intercepto (a)	14,83690	0,428172	34,65170	0,000053	
Inclinação (b)*	1,49286	0,174801	8,54036	0,003373	
Coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9605$ Erro padrão da regressão, $s_{y..x} = 0,55277$					
Análise de Variância					
Causas de Variação	SQ	G.L.	QM	F	Valor-P
Regressão	22,28631	1	22,28631	72,93770	0,003373
Resíduo	0,91666	3	0,30555		
Total	23,20297	4			

* Intervalo de Confiança (95%): $0,9366 \leq b \leq 2,0491$

ANEXO 39 – Teste para diferença entre nove coeficientes angulares* de *E. coli* ATCC 25922.

Regressão (caldo)	Σx^2	Σxy	Σy^2	n	b	SQ Resíduo	GL Resíduo
Regressão 1 (1)	17,50	17,83495	18,38084	6	1,01914	0,20453	4
Regressão 2 (2)	17,50	21,31655	26,57846	6	1,21809	0,61301	4
Regressão 3 (3)	10,00	15,60680	24,93503	5	1,56068	0,57781	3
Regressão 4 (4)	10,00	12,47990	16,00607	5	1,24799	0,43128	3
Regressão 5 (5)	5,00	7,97730	13,17510	4	1,59546	0,44763	2
Regressão 6 (6)	10,00	15,04300	22,89842	5	1,50430	0,26924	4
Regressão 7 (7)	10,00	16,62950	28,46793	5	1,66295	0,81390	4
Regressão 8 (CL)	28,00	30,87290	34,51277	7	1,10260	0,47219	6
Regressão 9 (TSB)	28,00	33,35360	40,69651	7	1,19120	0,96570	6
<i>Pool da Regressão</i>						4,79530	32
Regressão Comum	136,00	171,11450	225,65112			10,35574	40
Regressão Total	144,32	169,37675	244,88773	50		46,10389	48

* Hipóteses: $H_0 : b_1 = b_2 = b_3 = b_4 = b_5 = b_6 = b_7 = b_8 = b_9$; H_a : pelo menos um b não é igual.

$$F = \frac{\frac{10,35574 - 4,79350}{9-1}}{\frac{4,79350}{32}} = 4,63824 \quad \text{Valor-P} = 0,0008$$

Conclusão: rejeita-se a hipótese de nulidade ($P = 0,0008$), pelo menos um coeficiente angular difere dos demais.

ANEXO 40 – Teste de comparações múltiplas de Tukey para os dados do ANEXO 39.

Coeficientes b ordenados:		1	8	9	2	4	6	3	5	7
Valores dos Coeficientes b:		1,0191	1,1026	1,1921	1,2181	1,2480	1,5043	1,5607	1,5955	1,6630
Ho: $b_B = b_A$										
Comparação (B vs. A)	Diferença ($b_B - b_A$)	$(S^2_{y.x})_p$	SE	q	q 0,05,32,9	Conclusão				
7 vs. 1	0,6439	0,14549	0,1069	6,022	4,698	Rejeita Ho: $b_7 = b_1$				
7 vs. 8	0,5604	0,16076	0,1044	5,365	4,698	Rejeita Ho: $b_7 = b_8$				
7 vs. 9	0,4718	0,22245	0,1229	3,840	4,698	Aceita Ho: $b_7 = b_9$				
7 vs. 2	Não testar									
7 vs. 4	Não testar									
7 vs. 6	Não testar									
7 vs. 3	Não testar									
7 vs. 5	Não testar									
5 vs. 1	0,5764	0,10869	0,1182	4,876	4,698	Rejeita Ho: $b_5 = b_1$				
5 vs. 8	0,4929	0,13140	0,1244	3,961	4,698	Aceita Ho: $b_5 = b_8$				
5 vs. 9	Não testar									
5 vs. 2	Não testar									
5 vs. 4	Não testar									
5 vs. 6	Não testar									
5 vs. 3	Não testar									
3 vs. 1	0,5416	0,11176	0,0937	5,780	4,698	Rejeita Ho: $b_3 = b_1$				
3 vs. 8	Não testar									
3 vs. 9	Não testar									
3 vs. 2	Não testar									
3 vs. 4	Não testar									
3 vs. 6	Não testar									
6 vs. 1	0,4852	0,06768	0,0729	6,654	4,698	Rejeita Ho: $b_6 = b_1$				
6 vs. 8	Não testar									
6 vs. 9	Não testar									
6 vs. 2	Não testar									
6 vs. 4	Não testar									
4 vs. 1	0,2289	0,09083	0,0845	2,710	4,698	Aceita Ho: $b_4 = b_1$				
4 vs. 8	Não testar									
4 vs. 9	Não testar									
4 vs. 2	Não testar									
2 vs. 1	Não testar									
2 vs. 8	Não testar									
2 vs. 9	Não testar									
9 vs. 1	Não testar									
9 vs. 8	Não testar									
8 vs. 1	Não testar									

Representação gráfica do Teste de Tukey:

Caldo1	CaldoCL	CaldoTSB	Caldo2	Caldo4	Caldo6	Caldo3	Caldo5	Caldo7
1	8	9	2	4	6	3	5	7
1,0191	1,1026	1,1921	1,2181	1,2480	1,5043	1,5607	1,5955	1,6630

ANEXO 41 – Teste para diferença entre dois coeficientes angulares* de *E. coli* ATCC 25922 (Regressão 1) e *E. coli* CE-7A (Regressão 2) em Caldo 2.

Regressão	Σx^2	Σxy	Σy^2	n	b	SQ Resíduo	GL Resíduo
Regressão 1	17,50	21,31655	26,57846	6	1,21809	0,61301	4
Regressão 2	10,00	14,92860	23,20297	5	1,49286	0,91666	3

* Hipóteses: $H_0 : b_1 = b_2$; $H_a : b_1 \neq b_2$.

$$(S^2_{y,x})_p = 0,21852 \quad S_{b_1 - b_2} = 0,1853 \quad t = 1,4828 \quad t_{0,05,7} = 2,365 \quad \text{Valor-P} = 0,1817$$

Conclusão: aceita-se a hipótese de nulidade, não existe diferença significativa ($P=0,1817$) entre os dois coeficientes de regressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W.; BRATT; D. E. Young coconut water for home rehydration in children with mild gastroenteritis. **Tropical and Geographical Medicine**, Amsterdam, v. 45, p. 149-153, 1992.

ARAÚJO, M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. Viçosa: UFV, Impr. Univ., 1995. p. 267-278, 335 p.

AXE, D. D.; BAILEY, J. E. Transport of acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 47, n.1, p. 8-19, 1995.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Nutrição. In: _____; _____. **Microbiologia básica**. São Paulo: Atheneu, 1998. 89-101p. 196 p.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **E. coli**: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Tradução de Manuel Ramis Vergés. Zaragoza: Acribia, 1998. p. 1-2, 234 p. Título original: *E. coli*: a practical approach to the organism and its control in foods.

BETTELHEIM, K. A. *Escherichia coli*. **Microbionet**, 2000. Disponível em: <<http://www.microbionet.com.au/topicsescherichia4.htm>>. Acesso em: 24 maio 2005.

BILSKA, F. M. M.; LEITE, R. S. S. F.; SAVITCI, L. A. O coco no Brasil: aspectos econômicos e de mercado. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 81-105, 1995.

BLUME, H. *et al.* Água de coco no cultivo de embriões bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 4, p. 395-399, 1998.

BOBBIO, P. A.; _____, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1995. p. 51-61, 151 p.

CAMPOS, C. F. *et al.* Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, Trumbull, v. 20, p. 487-500, 1996.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L. R. *et al.* (Ed.); **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 215-228, 586 p.

CAPPUCCINO, J. G.; SHERMAN, N. **Microbiology**: a laboratory manual. 5th ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1998. p. 79-84, 477 p.

COOK, D. W. *et al.* Molluscan shellfish: oysters, mussels, and clams. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, D.C.: APHA, 2001. p. 507-514, 676 p.

CORNU, M.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; FLANDROIS, J.P. Characterization of unexpected growth of *Escherichia coli* O157:H7 by modeling. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 12, p. 5322-5327, 1999.

DALGAARD, P. *et al.* Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p. 391-404, 1994.

DANIELS, N. A. *et al.* Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: a prevention quandary. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 284, n. 12, p. 1541-1545, 2000.

DOMÍNGUEZ, M. C.; ROSA, M.; BOROBIÓ, M. V. Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts in agar. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 47, p. 391-398, 2001.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, p. 855-856, 1984.

DUFFY, G.; WHITING, R. C.; SHERIDAN, J. J. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, London, v. 16, p.299-307, 1999.

FAGUNDES NETO, U. *et al.* Água de coco: variações de sua composição durante o processo de maturação. **Jornal de Pediatria**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 17-21, 1989.

FARMER III, J. J. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: MURRAY, P. R. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington: ASM, 1999. p. 451, 1773 p.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Sept. 2002. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA/CFSAN. **Bacteriological analytical manual** on line. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em: 08 June 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAOSTAT**: agriculture data. 2004. Last updated February 2004. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collections?subset+agriculture>>. Acesso em: 23 ago. 2004.

FRANCO, B. D. G. M. Fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: _____; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 19-20, 182 p.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. Microrganismos indicadores. In: _____; _____. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 50-55, 182 p.

GRIMWOOD, B. E. Coconut palm products: their processing in developing countries. FAO. **Agricultural Paper**, Rome, n. 99, p. 159-166, 1975.

HASSAN, H. M; FRIDOVICH, I. Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Escherichia coli*: glucose effect. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 132, n. 2, p. 505-510, 1977.

INGRAHAM, J. L.; MAALØE, O.; NEIDHARDT, F. C. Microbial growth. In: PERRY, J. J.; STALEY, J. T. (Ed.). **Microbiology**: dynamics and diversity. Fort Worth: Sauders College Publishing, 1997. p. 136-157.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Banco de Dados Agregados**: Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA . 2004. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp>>. Acesso em: 23 ago. 2004.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Ecología microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1985. v. 2, p. 573-613.

JAYALEKSHMY, A. *et al.* Changes in the chemical composition of coconut water during maturation. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 23, n. 4, p. 203-207, 1986.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 4th ed. Nova York: AVI, 1992. p. 76, 701 p.

KILIKIAN *et al.* Process strategies to improved heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 9, p. 1019-1025, 2000.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. APHA , Washington, 2001, p. 69-82, 676.

KUBERSKI, T. *et al.* Coconut water as a rehydration fluid. **New Zealand Medical Journal**, Wellington, n. 8, p. 89-100, 1979.

LANDGRAF, M. Deterioração microbiana de alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 99-101, 182 p.

LI, R. C.; NIX, D. E.; SCHENTAG, J. J. New turbidimetric assay for quantitation of viable bacterial densities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 37, n. 22, p. 371-374, 1993.

LOUIS, I. H. A study of variation in tender nut characters in eight coconut varieties. **Journal of Plantation Crops**, Kasaragod, v. 5, n. 1, p. 59-60, 1977.

MACIEL, M. I.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, I. P. Effects of different storage conditions on preservation of coconut (*Cocos nucifera*) water. **Journal of Food Processing and Preservation**, Trumbull, v. 16, p. 13-22, 1992.

MATHEW, A. G. Processing of coconut in India. **Journal of Plantation Crops**, Kasaragod, v. 19, n.2, p. 183-190, 1991.

MINAS GERAIS. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Técnicas agropecuárias**: cultivo do coqueiro, 2001. Disponível em: <<http://www.agridata.mg.gov.br>>. Acesso em: 23 ago. 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS/BRASIL). Portaria MS nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. D.O.U., Brasília, DF, 26 março 2004. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 8 jun. 2005.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiment**. 4th ed. New York: J. Wiley & Sons, 1997. 704 p.

MONTVILLE, T. J. Principles which influence microbial growth, survival, and death in foods. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology**: fundamentals and frontiers. Washington, DC: ASM, 1997. p. 13-29, 768 p.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan., 1998.

NUNES, A. J. P.; PARSONS, G. J. Dynamics of tropical coastal aquaculture systems and the consequences to waste production. **World Aquaculture**, Baton Rouge, v. 29, n. 2, p. 27-37, 1998.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.

ØRSKOV, F. Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 420-423.

PANDALAI, K. M. Coconut water and its uses. **Coconut Bulletin**, Ernakulam, v. 12, n. 5, p. 167-173, 1958.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. Tradução de Manuel Adolpho May Pereira. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. v. 1, p. 111-127, 574 p. Título original: Microbiology.

_____; _____. **Microbiologia**. Tradução de Manuel Adolpho May Pereira. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981. v. 2, p. 929. 1072 p. Título original: Microbiology.

PUE, A. G. *et al.* Preliminary studies on changes in coconut water during maturation of the fruit. **Science in New Guinea**, v. 18, n. 2, p. 81-84, 1992.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Negative H₂S character and flocculation as yeast strain markers for inoculum recovery. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 3, p. 292-297, 2004.

ROBERTS, D.; HOOPER, W.; GREENWOOD, M. (Ed.). **Practical food microbiology**. 2nd ed. London: Public Health Laboratory Service, 1995. p. 51-55, 232 p

SHIVASHANKAR, S. Biochemical changes during fruit maturation in coconut. **Journal of Plantation Crops**, Kasaragod, v. 19, n.2, p. 102-119, 1991.

SMITH, M. E.; BULL, A. T. Studies of the utilization of coconut water waste for the production of the food yeast *Saccharomyces fragilis*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 41, p. 81-95, 1976.

SREBERNICH, S. M. **Caracterização física e química da água de fruto de coco (*Cocos nucifera*), variedade Gigante e Híbrido PB-12, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água de coco**. 1998. 189 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

STAINER, R. *et al.* Microbial growth. In: _____ *et al.* (Ed.) **General microbiology**. 5th ed. Hong Kong: Macmillan Press, 1995. p. 183-195, 689 p.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2nd ed. Oxford: Pergamon, 1995. p. 13-33, 357 p.

SUARÉZ, I. D.; LIRIA, C. W.; KILIKIAN, B. V. Effect of yeast extract on *Escherichia coli* growth and acetic acid production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 331-335, 1998.

TRINCI, A. P. J.; THURSTON, C. Transition to the nongrowing state in eucaryotic microorganisms. In: GRAY, T. R. G.; POSTGATE, J. R. (Ed.). **The survival of vegetative microbes**. Cambridge University Press, 1976. p. 55-79, 432 p.

TASSARO, H. **Frutas no Brasil: coco**. 1998. In: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO: Biblioteca virtual do estudante brasileiro. Disponível em: <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/index.php>>. Acesso em: 24 maio 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 3rd ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1996. p. 211-221, 317-369, 662 p.