



AVALIAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DE CULTURA SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS ATIVAS (SCOBY) EM KOMBUCHA COM DIFERENTES FONTES DE CAFEÍNA

Evaluation of development of symbiotic culture of bacteria and yeasts (scoby) in kombucha with different sources of caffeine

Amanda Mozarte Mariano CUNHA*¹; Valdemara Cristiane Pereira dos SANTOS²; Lucinéia Cavalheiro SCHNEIDER³

RESUMO: O SCOBY refere-se a um biofilme celulósico de leveduras e bactérias de alta cristalinidade, resistência à tração, insolubilidade, moldabilidade, polimerização, retenção de água e fibras mais finas que as de celulose vegetal. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar crescimento e desenvolvimento do biofilme flutuante em amostras de Kombucha produzidas em diferentes fontes de cafeína: *Camellia sinensis*, *Ilex paraguayensis*, *Coffea*, *Paullinia cupana* e *Theobroma cacao*. A pesquisa realizou-se em agosto de 2020 no laboratório da EMBASA, em Barreiras-BA. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (T1, chá verde, T2, chá mate, T3, café, T4, guaraná e T5, cacau 100%) e quatro repetições, no conjunto de 20 parcelas, realizadas em triplicata, totalizando 60 unidades experimentais. Os substratos de fermentação foram eficientes para a produção de um novo biofilme. O fator pH não variou com os teores de cafeína, diferente do crescimento da película bacteriana, que se multiplicou em maiores teores da substância. O tratamento 5 obteve maiores índices de crescimento, rendimento, quantidade de matéria seca, e menor teor de umidade em relação aos demais, seguindo pelos tratamentos 1 e 3, com rendimento de biofilme mediano e valores aproximados de teor de umidade 65% e 60% respectivamente. Os tratamentos com menores desempenhos foram o 2, com 80% de umidade, e 4, com 75,17%. Conclui-se que para produção de biofilmes com objetivo de obtenção de biocelulose, o cacau 100% torna-se a melhor opção como fonte de inóculo para as bactérias e leveduras microbiologicamente ativas presentes na Kombucha.

Palavras-chave: Biofilme. Rendimento. Fermentação. Biocelulose.

ABSTRACT: SCOBY refers to a cellulosic biofilm of yeasts and bacteria of high crystallinity, resistance to traction, insolubility, moldability, polymerization, water retention and finer fibers than as vegetable cellulose. This work aimed to develop and characterize growth and development of the floating biofilm in de Kombucha produced in different sources of caffeine: *Camellia sinensis*, *Ilex paraguayensis*, *Coffea*, *Paullinia cupana* and *Theobroma cacao*. The research was carried out in August 2020 at the EMBASA laboratory, in Barreiras-BA. The experiment was conducted in a completely randomized design, with five treatments (T1, green tea, T2, mate tea, T3, coffee, T4, guarana and T5, 100% cocoa) and four replications, in a set of 20 plots, carried out in triplicate, totaling 60 experimental units. The fermentation substrates were efficient for the production of a new biofilm. The pH factor did not vary with the levels of caffeine, unlike the growth of the bacterial film, which multiplied in higher levels of the substance. Treatment 5 has higher growth rates, yield, amount of dry matter, and lower moisture content compared to the others, followed by treatments 1 and 3, with median biofilm yield and approximate values of moisture content 65% and 60% respectively. The treatments with the lowest performance were 2, with 80% humidity, and 4, with 75.17%. It is concluded that for the production of biofilms with the objective of obtaining biocellulose, 100% cocoa becomes the best option as an inoculum source for microbiologically active bacteria and yeasts present in Kombucha.

Key words: Biofilm. Yield. Fermentation. Biocellulose.

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021; aprovado em 05/06/2021

¹Bacharel em Agronomia, Centro Universitário São Francisco de Barreiras, Barreiras Bahia; (77) 9.8116-8190, mozartemanda@gmail.com

²Mestre, professora do Curso de Agronomia, Centro Universitário São Francisco de Barreiras. cris@fasb.edu.br

³Mestre, Universidade Federal do Oeste da Bahia, lucineia_cs@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A Kombucha trata-se de um chá com significativa ação principalmente na saúde intestinal, adquirido por processo fermentativo através da ação simbiótica de bactérias e leveduras (CINTRA; KAWASHIMA, 2018).

Possui origem incerta, porém, acredita-se que seja oriunda do nordeste da China por volta de 220 a. C. Em 414 d. C, foi conduzido ao Japão como medicação para restabelecimento de distúrbios no trato digestivo, e guiado por trajetos mercantis para países da Europa Oriental, também como um fármaco (JULIE, 2019).

A produção de Kombucha ocorre a partir da infusão da planta *Camellia sinensis* dulcificada com açúcar, que é substrato da reação de fermentação. Ao chá adoçado é adicionado um volume de Kombucha já produzido, denominado líquido starter, também chamado de chá de arranque, ou ainda vinagre, e uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts) o SCOBY, que serão responsáveis pelo processo de fermentação que ocorre em geral de 7-10 dias (JAYABALAN et al., 2014).

Um novo SCOBY é formado na superfície do recipiente de produção da Kombucha a cada nova fermentação. Constituído majoritariamente por proteína e fibras, trata-se de um biofilme celulósico de microrganismos, que auxilia na produção de uma bebida fermentada rica em: sacarose, glucose, frutose, polifenóis, ácidos orgânicos, aminoácidos, elementos essenciais como Cu, Fe, Mn, Ni e Zn, vitaminas C e do complexo B, enzimas hidrolíticas, glicerol, aminoácidos, aminas biogênicas, purinas, pigmentos, lipídios, proteínas, compostos fenólicos, minerais, e demais metabolitos (JAYABALAN et al., 2014; JULIE, 2019).

As leveduras e as bactérias da Kombucha utilizam as substâncias da superfície onde se desenvolve para suas atividades metabólicas de forma integrada. As leveduras, pela ação da enzima invertase, hidrolisam a sacarose do chá adoçado em frutose e glucose, onde bactérias acéticas convertem a glucose em ácido glucônico e a frutose em ácido acético, fornecendo etanol e dióxido de carbono. Tanto o etanol como o ácido acético apresentam atividade antimicrobiana, inibindo o desenvolvimento de microrganismos patogênicos no chá fermentado. Já a cafeína, estimula a síntese de celulose bacteriana, onde neste meio ao longo do tempo o pH da Kombucha decresce devido à produção de ácidos orgânicos (SANTOS, 2016).

A cultura simbiótica de bactérias e leveduras é uma excelente opção de substituição de pele humana em tratamento de queimaduras e lesões dérmicas, remoção de poluentes metálicos de soluções aquosas, como biomaterial na engenharia de tecido nervoso, na alimentação de aves e na fabricação de roupas veganas (SANTOS, 2016).

Considerando a produção do biofilme disposto na kombucha, sua alta cristalinidade, resistência à tração, extrema insolubilidade na maioria dos solventes, moldabilidade, alto grau de polimerização, fibras 100 vezes mais finas que as fibras de celulose vegetal, e

grande capacidade de retenção de água (CHAWLA et al., 2009), nos quais hoje desenvolvem uma série de novos produtos, há necessidade de desenvolvimento e levantamentos específicos com base científica referentes ao mesmo, assim como sua observação de melhores meios para sua produção.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar crescimento e desenvolvimento do biofilme flutuante em amostras de Kombucha produzidas em diferentes fontes de cafeína: *Camellia sinensis*, *Ilex paraguaiensis*, *Coffea*, *Paullinia cupana* e *Theobroma cacao*.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no mês de agosto de 2020 no laboratório da Empresa Baiana de Águas e Saneamento - EMBASA, localizado na sede regional do Oeste da Bahia, no município de Barreiras.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos, referentes às diferentes fontes de cafeína (T1, chá verde, T2, chá mate, T3, café, T4, guaraná e T5, cacau 100%) e quatro repetições cada, no conjunto de 20 parcelas, nos quais foram realizados em triplicata, totalizando 60 unidades experimentais.

Para produção do biofilme utilizou-se 3 L de infusão para cada tratamento. Em uma panela, adicionou-se 3L de água potável, e seguindo as recomendações de Salinas (2002), foi aquecida a 90°C para melhor extração de compostos, sequencialmente, adicionou-se 150g de açúcar cristal branco (sacarose), e realizou-se a infusão de 27g das fontes de cafeína (Figura 1) adquiridas em mercado local: *Camellia sinensis* e *Ilex paraguaiensis* desidratadas, *Coffea*, *Paullinia cupana* e *Theobroma cacao* 100%, em pó, por 10 minutos.

Figura 1: Guaraná em pó, cacau 100%, chá verde, café e chá mate, em recipientes separados.



O chá preparado, após a infusão, foi arrefecido naturalmente, até temperatura ambiente, por cerca de 20 minutos, e adicionou-se 50 mL de vinagre de álcool a pH 4, para inibição de crescimento de microrganismos patogênicos e decrescimento do pH.

Transferiu-se o líquido para recipientes plásticos, para que não ocorresse transferência de compostos tóxicos para a bebida, de 250 mL, devidamente identificados. Foram utilizadas 12 unidades

para cada tratamento, nas quais foram adicionados uma fração de 10g de SCOBY ativo de estoque próprio, fermentado em chá verde (Figura 2A e 2B).

Figura 2A: Inoculação de substratos com SCOBY ativo.



Figura 2B: Fração com peso de 10g de SCOBY ativo.



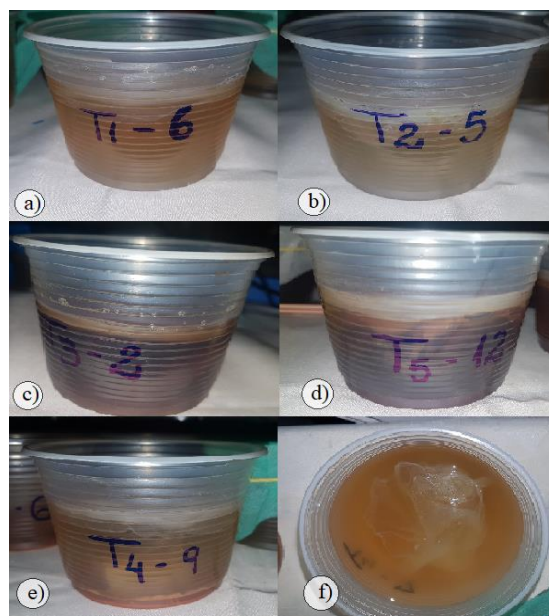
As unidades experimentais foram fermentadas com a média semanal de temperatura de 37°C. No segundo dia fermentativo observou-se a formação inicial do biofilme, uma fina camada com microrganismos em suspensão visíveis (Figura 3).

Figura 3: SCOBY em formação - tratamento 5.



No quinto dia fermentativo, notou-se a formação plena do biofilme celulósico nos tratamentos 1, 2, 3 e 5, e o tratamento 4 ainda não havia adquirido forma consistente, com biofilme sensível ao toque e ainda translúcido (Figura 4). Nesta etapa, todos os tratamentos já apresentavam odor característico de material fermentado e avinagrado.

Figura 4: Biofilmes – a) Tratamento 1; b) Tratamento 2; c) Tratamento 3; d) Tratamento 5; e) e f) Tratamento 4 apresentando má formação do biofilme.



No sétimo e último dia de análise fermentativa, todos os tratamentos apresentavam SCOBY desenvolvido, os quais ocuparam o formato do recipiente de 8cm de diâmetro, apresentando espessura firme e de coloração adquirida pelo meio de cultura.

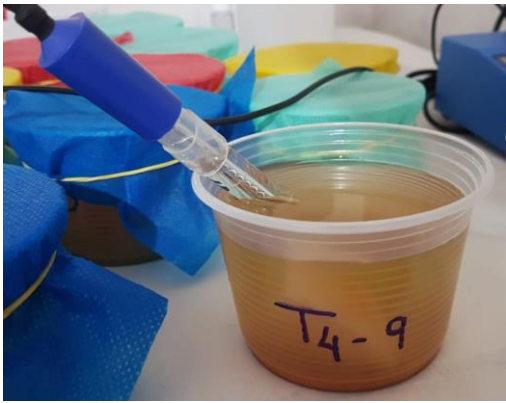
Na etapa de desenvolvimento e análises, os recipientes foram cobertos por tecido respirável (Figura 5), separados por cor para melhor identificação, presos com elástico para evitar contaminação via insetos e deixados em abrigo de luz direta, por aproximadas 168h (7 dias), em temperatura ambiente.

Figura 5: Recipientes de fermentação.



A coleta e a análise de dados para a determinação do pH foram realizadas segundo as instruções do Instituto Adolfo Lutz (2008), em três momentos: no chá pronto adoçado, após a adição do líquido starter (vinagre de álcool a pH 4), e diariamente após a adição do SCOBY, com auxílio de pHmetro previamente calibrado. O eletrodo limpo com água destilada a cada nova medição, era inserido, delicadamente, diretamente nos recipientes de fermentação (Figura 6), para que não causasse problemas de formação e estruturação do biofilme, prosseguindo com a leitura do aparelho e registro do pH.

Figura 6: Eletrodo inserido em recipiente de fermentação.



Para avaliação de desempenho dos substratos, realizou-se o cálculo de rendimento com base na seguinte equação:

$$R = \frac{\text{variação de massa}(g)}{\text{massa inicial}(g)} \times 100$$

Em que, o rendimento foi dado pela divisão entre a variação de massa do biofilme (peso inicial subtraído pelo peso final) por seu peso inicial, multiplicado por 100 (BATISTA, 2019).

Para a perda por desidratação assistida empregou-se a radiação por micro-ondas, realizando-a no sétimo dia de fermentação. Pesou-se 10 gramas de amostra em placa de petri e levou-se ao forno micro-ondas de um em um minuto até peso constante. Após, aplicou-se os valores obtidos à fórmula:

$$\text{Umidade \%} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Em que: P_i = Peso inicial da amostra (amostra úmida) em gramas (descontado o peso da cápsula) e P_f = Peso final da amostra (amostra seca) em gramas (descontado o peso da cápsula) (BOLZAN, 2013).

Ao término da fase experimental, os dados coletados foram tabulados e submetidos à análise de variância pelo teste "F", e teste de comparação de médias, Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o software AGROESTAT®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de pH realizadas em triplicata para cada tratamento não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos 5 e 3, 3 e 2, e 1 e 4 (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação de médias de pH para cada tratamento.

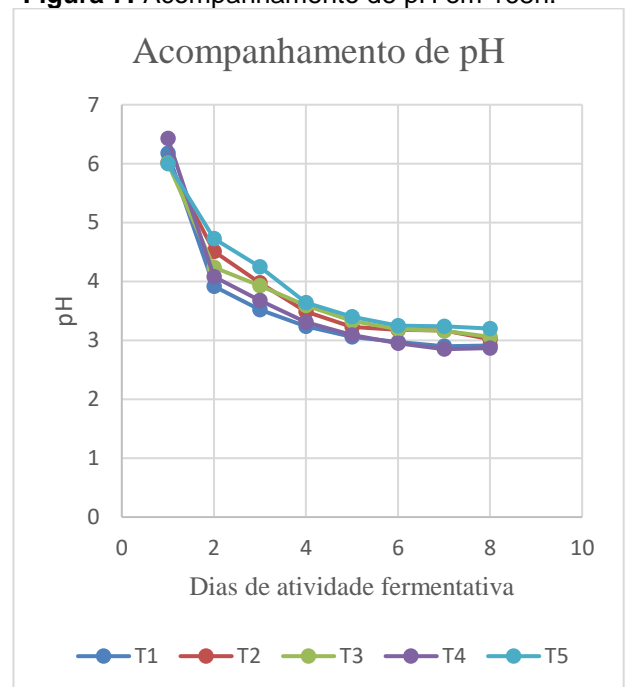
Tratamento	Média	
5- Cacau	3,2025	a
3- Café	3,0592	a b
2- C. Mate	3,0192	b
1-C. Verde	2,9075	c

A Tabela 1 refere-se as médias diárias referentes a cada tratamento. Paludo (2017), ao apresentar os resultados de acompanhamento de pH referentes as pesquisas comparativas de fermentação nos substratos de chá verde e extrato de erva mate, chegou aos resultados onde o material de erva-mate artesanal iniciou a fermentação com pH de 4,37 e, após os 7 dias de fermentação, foi detectado pH de 3,10, e o material de chá verde teve o valor inicial de pH de 4,10 e de 2,81 após os 7 dias de fermentação.

Kallel et al. (2012) analisaram o comportamento do pH durante a fermentação de kombuchas utilizando chá verde e chá preto como fonte de cafeína, não havendo variação significativa no valor do pH entre os dois substratos apresentando pH de 3,8 logo após a inoculação e, após 7 dias de fermentação o valor de 2,9. Os valores dos autores se assemelham aos valores encontrados nesta pesquisa.

Visualiza-se o acompanhamento na Figura 7, na qual apresenta um gráfico de variação de pH.

Figura 7: Acompanhamento de pH em 168h.



O tratamento 1 de infusão pura, iniciou com pH de 6,18, quando adicionou o líquido starter percebeu-se um decréscimo no pH para 3,92 e ao decorrer os 7 dias fermentativos findou em 2,91. O segundo tratamento, seguindo a mesma ordem, foi de 6,02 a 4,51 chegando a 3,02 ao final da fermentação, da mesma forma os tratamentos 3, 4 e 5 variaram de 6,01 – 4,24 a 3,06, 6,43 – 4,08 a 2,87 e 6 – 4,73 a 3,2 respectivamente. Para a Kombucha ideal, buscando a obtenção de uma bebida agridoce, a fermentação deve terminar quando a acidez total atingir o valor ideal de 4 a 5 g / L, não diminuindo abaixo de 3, sendo o do trato digestivo (SAPONJAC; VULIC, 2014).

Na mensuração do peso dos biofilmes formados em cada tratamento (Tabela 2), observou-se suas variações aplicadas à fórmula de rendimento:

Tabela 2- Comparação de médias

Tratamento	Média			
5- Cacau	301,67%	A	b	
3- Café	253,83%	A	b	
1-C. verde	235,83%	b	c	
4- Guaraná	215%		c	
2-C. Mate	190%		c	

Comparando as médias realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, os tratamentos 5 e 3 não apresentaram diferenças significativas entre si, com 301,67% e 253,33%, respectivamente, seguido pelos demais tratamentos, onde o 2 obteve menor rendimento. Sharma e Bhardwaj (2019), explicam que as bactérias acéticas transformam o etanol em ácido acético estimulando a produção de mais etanol e aumentam a produção de celulose. Desta forma com o aumento das bactérias acéticas e produção de celulose, conseqüentemente, há o rendimento de massa da película celulósica (FILLIPPIS et. al., 2017).

No experimento de Batista (2019), no qual observou a influência dos tipos de substratos na cinética mássica de produção da película celulósica do Kombucha, chegou aos resultados que o chá preto possuía maior rendimento, cerca de 352,86% em relação ao chá verde com 131,43%. Neste experimento, o chá verde obteve o rendimento de 235,83%.

A dessecação assistida após ser avaliada a cada 10 g do novo biofilme formado foi apresentada na Tabela 3.

Tabela 3- Comparação de médias desidratação assistida a cada 10g de biofilme.

Tratamento	Média	
5 – Cacau	5,2500	a
3 – Café	4,0000	a b
1 – C. Verde	3,5000	a b
4 – Guaraná	2,4833	b
2 – C. Mate	2,0000	b

O tratamento 5 apresentou melhor desenvolvimento com média de 5,25 g de matéria seca a cada 10g de SCOPY hidratado, assim como os tratamentos 3 e 1, os quais se apresentaram semelhantes aos demais tratamentos.

A cafeína presente no chá, e outras substâncias estimulantes, auxiliam na síntese da celulose. São as responsáveis pela produção de ácido acético, a partir da oxidação do etanol, e podem oxidar outros compostos, gerando diferentes substâncias as quais formam novas películas de massa bacteriana (BATISTA, 2019).

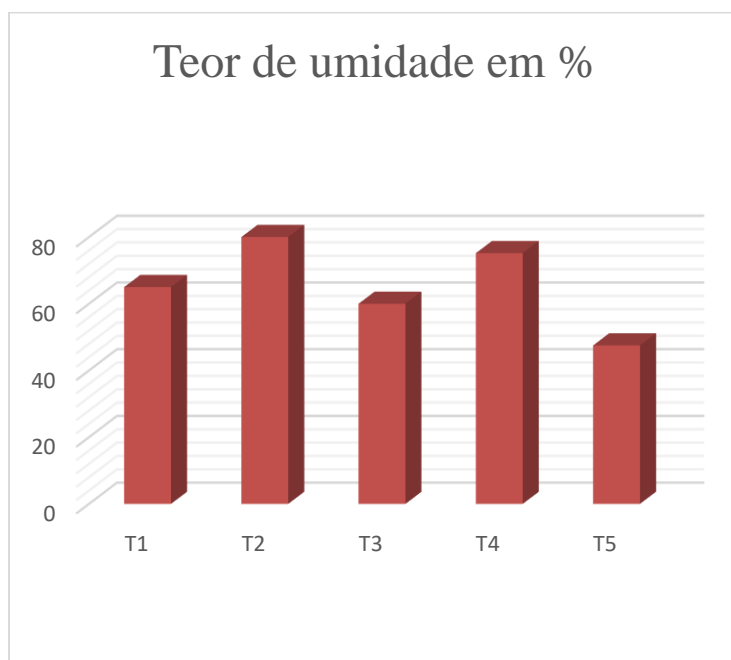
A obtenção dos valores referentes ao peso seco ocorreu a partir da dessecação assistida (Figura 8), foi

possível chegar aos seguintes valores de teor de umidade (Figura 9):

Figura 8: Biofilme antes e depois da desidratação.



Figura 9: Teor de umidade nos diferentes tratamentos.



Ao realizar os cálculos de umidade chegou-se aos seguintes resultados: o tratamento ao qual apresentou maior teor de umidade foi o T2 com 80%, seguido do T4 com 75,17%, T1 com 65%, T3 com 60% e T5 com 47,5. Segundo Schroeder (2019), a celulose microbiana produz-se extracelularmente na forma de fibrilas, e uma das principais características da celulose é sua capacidade de absorver água, o que explica os altos teores de umidade.

Observando os teores de cafeína dos tratamentos, a cada 100 g de cacau em pó, contém cerca de 230 mg de cafeína (USDA, 2019). Para o chá mate a cada 1 xícara de chá contém 20 a 30 mg de cafeína, e no chá verde (1 xícara de chá) de 25 a 40 mg (FERNANDES, 2018).

Um estudo sobre o teor de cafeína por xícara de café feito no Canadá por Stavric et al (1988), indica que o teor médio de cafeína, independentemente da preparação do café foi de 80mg por xícara. No caso do café torrado e moído, preparado em filtro ou coador, o teor médio era inferior a 85mg, processo no qual foi utilizado neste experimento. No caso do guaraná, a

quantidade de cafeína a cada 240mL é de até 40 miligramas (MENDES, 2018).

Desta forma, observou-se na Tabela 4 os seguintes valores de cafeína por mL:

Tabela 4- Cafeína em mg a cada 1mL.

Fonte	Cafeína mg/mL
Chá Verde	0,16
Chá Mate	0,12
Café	0,33
Guaraná	0,16
Cacau 100%	0,97

Fonte: Adaptado de USDA, 2019; FERNANDES, 2018; STAVRIC, et. al., 1988; MENDES, 2018.

O cacau 100% apresenta maiores teores de cafeína por ml, seguido do café, guaraná e chá verde, e por fim o chá mate. Pode-se afirmar que os substratos utilizados para a fermentação foram eficientes para a produção de um novo biofilme já que apresentaram desenvolvimento satisfatório. O fator pH não varia de acordo ao teor de cafeína, diferente do crescimento da película bacteriana, a qual tende a se multiplicar em maiores teores de cafeína.

Chegou-se aos seguintes resultados: o tratamento 5 obteve maiores índices de crescimento e rendimento, maiores quantidades de matéria seca, e menor teor de umidade em relação aos demais, seguindo pelos tratamentos 1 e 3, com rendimento de biofilme mediano e valores aproximados de teor de umidade 65% e 60% respectivamente.

Os tratamentos com menores desempenhos de produção foram o 2, com 80% de umidade e 4 com 75,17%.

CONCLUSÕES

Conclui-se que para produção de biofilmes com objetivo de obtenção de biocelulose, dentre os tratamentos, o cacau 100% torna-se a melhor opção como fonte de inóculo para as bactérias e leveduras microbiologicamente ativas presentes na Kombucha.

REFERÊNCIAS

BATISTA, M. E. Influência dos tipos de substratos na cinética mássica de produção da película celulósica do Kombucha. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019. Disponível em: http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/16453/1/PG_COENQ_2019_2_012.pdf. Acesso em: 18 out. 2020.

BOLZAN, R. C. Composição de alimentos e bromatologia. UFSM, Rio Grande do Sul, 2013.

CHAWLA, P. R.; et. al. Food Technol. Biotechnol., v. 47, n. 2, p. 107-124, p. 2009.

CINTRA, B. P. G.; KAWASHIMA, L. M. Desenvolvimento e avaliação de formulações de chá fermentado (Kombucha). Revista Científica UMC - Edição Especial PIBIC, Outubro, 2018.

FERNANDES, T. Conheça os alimentos que mais contêm cafeína no mundo. 2018. Disponível em: <https://segredosdomundo.r7.com/conheca-os-alimentos-que-mais-contem-cafeina-no-mundo/>. Acesso em: 20 out. 2020.

FILLIPPIS, F. et.al. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. Food Microbiology, v. 73, p. 11-16, ago. 2018.

JAYABALAN, R. et al. A review on kombucha tea – microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 13, n. 4, p. 538-550, jul. 2014.

JULIE, M. Kombucha: A Systematic Review of Empirical Evidence of Benefit to Human Health. Annals of Epidemiology. v. 30. p. 66 – 70. Fevereiro, 2019.

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. Food Research International, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 226-232, 2012.

MENDES, A. Veja 5 bebidas que possuem cafeína além do café. 2018. Disponível em: <https://villacafe.com.br/veja-5-bebidas-que-possuem-cafeina-alem-do-cafe/#:~:text=H%C3%A1%20quem%20diga%20que%20o,a%2035%20mg%20de%20cafe%C3%ADna>. Acesso em: 21 out. 2020.

PALUDO, N. Desenvolvimento e Caracterização De Kombucha Obtida a Partir de Chá Verde e Extrato de Erva-Mate: Processo Artesanal e Escala Laboratorial. Trabalho de Conclusão (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como. Porto Alegre, 2017.

SALINAS, R. D. Alimentos e Nutrição: introdução a bromatologia. 3 ed, Porto Alegre: Artmed, p. 221-254, 2002.

SANTOS, M. J. Kombucha: Caracterização da Microbiota e Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares Para Uso Em Restauração. 2016. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, 2016.

SAPONJAC, V. T. T.; VULIC, J. J. Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) Tea with Symbiotic consortium of bacteria and yeasts. Food Technology and Biotechnology, v.52, n.4, p. 420– 429, 2014.

SCHROEDER, J. Kombucha fermentada a partir de resíduo de acerola. Trabalho de Conclusão do Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos). 2019. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 132, p. 166-177, 1 jul. 2019.

STAVRIC, B. et al. Variability in caffeine consumption from coffee and tea: possible significance for epidemiological studies. *Fd Chem Toxic.* v.26, n.2. p. 111-118, 1988.

USDA- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Agricultural Research Service- Food Data Central. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/>. Acesso em: 21 out. 2020.