



# Qualidade fisiológica de sementes de arroz submetidas à solução de hipoclorito de sódio

## *Physiological quality of rice seeds submitted to sodium hypochlorite solution*

Camila **CIGEL**<sup>1,2</sup>; Cileide Maria Medeiros **COELHO**<sup>1</sup>; Virgilio Gavicho **UARROTA**<sup>1</sup>; Rodrigo **KANDLER**<sup>1</sup> & Elijanara Raissa da **SILVA**<sup>1</sup>

### RESUMO

Objetivou-se verificar a eficiência do hipoclorito de sódio (NaClO) na superação de dormência e na qualidade fisiológica de sementes de arroz. O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes, no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/Udesc). Utilizaram-se sementes de arroz cultivar SCS122 Miura, com delineamento experimental inteiramente casualizado e quatro repetições, sendo os tratamentos: T1 – sementes dormentes imersas em NaClO; T2 – sementes com dormência superada, em NaClO; T3 – sementes dormentes, em água; T4 – sementes com dormência superada, em água. O NaClO provocou aumento da condutividade elétrica (CE) para sementes com e sem dormência de 28,77 e 26,24  $\mu\text{S cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  respectivamente, quando comparadas à imersão em água, indicando degradação das células. Sementes com e sem dormência imersas em NaClO apresentaram, respectivamente, aumento de 6,52 e 10,54 para o índice de velocidade de germinação (IVG) em relação às dormentes em água (9,2). Para a primeira contagem de germinação, a amostra com dormência em NaClO apresentou aumento de 5% em relação à imersão em água. No teste de germinação, obteve-se incremento de 5,81% para ambas as amostras com NaClO, comparadas a sementes com dormência em água (86%). Concluiu-se que o método de imersão em NaClO e em água promoveu a superação da dormência em arroz, mas afetou o vigor das sementes no teste de CE.

**Palavras-chave:** dormência; germinação; *Oryza sativa*.

### ABSTRACT

The aim of this study was to verify the efficiency of NaClO in overcoming dormancy and the physiological quality of rice seeds. The experiment was conducted at the Laboratory of Seed Analysis, CAV/ UDESC. Rice cultivar SCS122 Miura seeds were used, with completely randomized experimental design and four replicates. The treatments were: T1 – dormant seeds immersed in NaClO; T2 – seeds with dormancy overcome, in NaClO; T3 – dormant seeds in water; T4 – seeds with dormancy overcome, in water. NaClO increased the EC (electrical conductivity) for seeds with and without dormancy of 28.77 and 26.24  $\mu\text{S cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectively, when compared to immersion in water, indicating cells degradation. Seeds with and without dormancy immersed in NaClO presented, respectively, an increase of 6.52 and 10.54 for GSI (Germination speed index) in relation to the dormant seeds in water (9.2). For the first germination count, the sample with dormancy in NaClO showed an increase of 5% in relation to immersion in water. In the germination test, an increase of 5.81% was obtained for both samples with NaClO, compared to seeds with dormancy in water (86%). It was concluded that the immersion method in NaClO and in water promoted the overcoming of dormancy in rice, but affected the vigor of the seeds in the EC test.

**Keywords:** dormancy; germination; *Oryza sativa*.

Recebido em: 11 jan. 2019

Aceito em: 18 jun. 2020

<sup>1</sup> Departamento de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), Avenida Luís de Camões, n.º 2.090, Conta Dinheiro – CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Autor para correspondência: camilacigel@gmail.com.

## INTRODUÇÃO

O adequado e satisfatório estabelecimento das culturas a campo é dependente, entre outros fatores, da qualidade das sementes utilizadas. Elas são submetidas às análises a fim de verificar se suas características se encontram em conformidade com o padrão de qualidade definido pela legislação para, posteriormente, serem comercializadas aos agricultores (MARCOS FILHO, 2015).

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura com relevante importância econômica para o Brasil e o mundo. Segundo dados da FAO (2018), a China é o maior produtor de arroz, seguido pela Índia e pela Indonésia, e o Brasil é classificado como o 9.º colocado. O consumo médio por pessoa chega a 60 kg/ano, exceto em países asiáticos, onde o consumo pode variar de 100 a 150 kg/ano/pessoa (SOSBAI, 2014). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), o Brasil produziu mais de 11,0 milhões de toneladas na safra 2017/2018.

As sementes de arroz apresentam dormência logo após a colheita, o que pode ser induzido pelas condições ambientais, como temperaturas baixas nos estádios iniciais da maturação e próximas a 30°C após a floração, além de inibidores e estruturas que impedem a germinação (MENEZES *et al.*, 2009). Taiz *et al.* (2017) definem a dormência como uma condição morfológica e/ou fisiológica de uma semente privada de sua germinação, mesmo estando em condições ambientais aptas para que esta ocorra.

Nessa cultura, a dormência pode ocorrer em virtude da presença de compostos fenólicos que inibem a germinação e pela limitação de oxigênio para o embrião, provocada pelo tegumento (MENEZES *et al.*, 2009). A impermeabilidade do pericarpo das sementes do cereal pode ser explicada pela sua estrutura e composição química, que impedem a passagem de água e oxigênio ao embrião, o próprio consumo de oxigênio pelo tegumento e a presença de compostos fenólicos que também o retêm na cobertura (MARCOS FILHO, 2015).

A presença de dormência dificulta as análises de germinação e vigor voltadas à comercialização das sementes (MENEZES *et al.*, 2009), além de impedir a antecipação da semeadura pelos produtores (STINGHEN, 2015). Contudo, após um período de armazenamento, entre 90 e 120 dias, a dormência das sementes de arroz é superada naturalmente (BEWLEY & BLACK, 1994).

Entre os métodos de superação da dormência em sementes de arroz descritos nas *Regras para análise de sementes* (RAS) (BRASIL, 2009), há o método do hipoclorito de sódio (NaClO). O NaClO é um componente empregado também nos laboratórios para assepsia de sementes ou outros materiais (CARNELOSSI *et al.*, 1995). Considerado um potente oxidante, que remove ou oxida os compostos inibidores da germinação das sementes, o NaClO modifica as membranas do tegumento das sementes, deixando-as mais porosas, permitindo que o oxigênio alcance o interior da semente e ocorra o desenvolvimento do embrião (HSIAO & QUICK, 1984).

Todavia sementes de arroz com dormência e sementes com dormência já superada são submetidas ao método do hipoclorito de sódio por padronização, não havendo evidências quanto ao seu efeito sobre a qualidade fisiológica de ambas, assim como na germinação e no vigor. Dessa forma, objetivou-se verificar a eficiência da utilização da solução de NaClO na superação de dormência de sementes de arroz e as respostas fisiológicas em sementes com dormência superada naturalmente pelo armazenamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes (LAS), localizado no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/Udesc),

no município de Lages (SC). O período de condução foi de abril a junho de 2018. Utilizaram-se sementes do cultivar de arroz SCS 122 Miura, proveniente da safra 2017/2018 (recém-colhidas), caracterizadas por apresentar dormência, e da safra 2016/2017 (com um ano de armazenamento), com dormência superada pelo período de armazenamento (sem dormência).

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e quatro repetições, sendo os tratamentos: T1 – sementes com dormência submetidas à concentração de 0,5% da solução de NaClO/24 horas; T2 – sementes sem dormência submetidas à concentração de 0,5% de NaClO/24 horas de imersão; T3 – sementes com dormência submetidas à imersão em água/24 horas; T4 – sementes sem dormência submetidas à imersão em água/24 horas.

Previamente às análises com o uso do hipoclorito de sódio, realizou-se o teste de germinação (BRASIL, 2009), para verificar o percentual de dormência das sementes de ambas as amostras. Assim, nessa etapa inicial, não se submeteram as sementes à pré-embebição para posterior realização do teste de germinação.

A amostra média das sementes dormentes e das sementes sem dormência foi composta por 1.400 g, conforme as recomendações de Brasil (2009). As amostras de trabalho de ambas as sementes foram obtidas pela homogeneização e subdividindo-as em quatro repetições. De cada uma destas, retiraram-se duas amostras de 5 g, uma para imersão em água e outra para imersão em NaClO. Desse modo, obtiveram-se oito subamostras para sementes dormentes e oito para sementes sem dormência.

Quatro dessas subamostras de ambas as sementes foram colocadas em imersão em 50 ml de água, e as quatro restantes em 50 ml da solução de NaClO a 0,5% conforme os tratamentos, em caixas gerbox. Posteriormente, permaneceram em estufa a 40°C por 24 horas e, após esse período, foram lavadas com água destilada para retirar possíveis resíduos do sal e, então, submetidas aos testes relacionados à germinação e condutividade elétrica (BRASIL, 2009).

Para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes com e sem dormência submetidas à pré-embebição com água e NaClO, efetuaram-se as seguintes análises:

- Teor de água: secagem em estufa a 105°C, por período de 24 horas (BRASIL, 2009);
- Condutividade elétrica (CE): conforme descrita por Vieira & Krzyzanowski (1999), realizada com quatro repetições de 50 sementes de arroz por tratamento, imersas em 75 ml de água deionizada e mantidas sob temperatura de 25°C por 24 horas. Após esse período, utilizou-se um condutímetro para verificar a condutividade da água de cada amostra. Os resultados foram obtidos pela fórmula:  $CE = (CE \text{ medida da amostra com sementes} - CE \text{ medida da água pura}) / \text{peso da amostra}$  (valores finais apresentados em  $\mu S \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ );
- Percentual de germinação: utilizaram-se oito repetições de 50 sementes para cada amostra e imersão, semeadas em rolos de papel umedecidos com água destilada, mantidas em germinador a 25°C e avaliadas aos 14 dias após o início do teste (BRASIL, 2009) (porcentagem de plântulas normais);
- Primeira contagem de germinação (PC-GER): efetivada juntamente com o teste de germinação, computando-se as plântulas normais após cinco dias da instalação do teste (BRASIL, 2009) (porcentagem de plântulas normais);
- Índice de velocidade de germinação (IVG): foi realizado com contagens diárias de plântulas normais no teste de germinação com intervalos de 24 horas a partir da constatação da primeira plântula normal e calculado conforme Maguire (1962) pela equação  $IVG = (G1/N1)$

+ (G2/N2) + (Gn/Nn), em que G é o número de plântulas germinadas observadas em cada contagem, e N, o número de dias da semeadura a cada contagem.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste F, aplicando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade quando verificada diferença significativa entre os tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de germinação realizadas inicialmente à imersão em água e hipoclorito de sódio (NaClO), com as sementes de arroz cultivar SCS122 Miura com dormência, apresentaram como resultado: percentual de germinação de 32%, plântulas anormais (22%), sementes dormentes (35%) e mortas (11%); e amostra com dormência superada naturalmente pelo período de armazenamento (sem dormência): 93% de germinação, 4% de plântulas normais, 2% de sementes dormentes e 1% de mortas. Nesse teste, obtiveram-se diferença e baixos percentuais de plântulas anormais, além de sementes dormentes e mortas para a amostra de sementes com dormência, possibilitando a realização dos testes posteriores.

Ambas as amostras das sementes apresentaram teor de água de 14%, caracterizado como adequado para o armazenamento, pois preserva a viabilidade e a longevidade das sementes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2012).

Os resultados da análise de variância referente às avaliações para condutividade elétrica (CE), primeira contagem (PC-GER), germinação (GER) e índice de velocidade de germinação (IVG) demonstram que houve diferença significativa para os tratamentos nas análises de condutividade elétrica, primeira contagem de germinação e IVG. Para as variáveis plântulas anormais (PA), sementes dormentes (SD) e sementes mortas (SM), os coeficientes de variação obtidos foram altos, por conta da maior dispersão nos dados e da presença de valores iguais a zero (tabela 1).

**Tabela 1** – Resumo da Anova para análises de primeira contagem de plântulas normais (PC-GER), germinação (GER), plântulas anormais (PA), sementes dormentes (SD), sementes mortas (SM), índice de velocidade de germinação (IVG) e condutividade elétrica (CE) em amostras de arroz com dormência e sem dormência, submetidas à imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) e água (H<sub>2</sub>O).

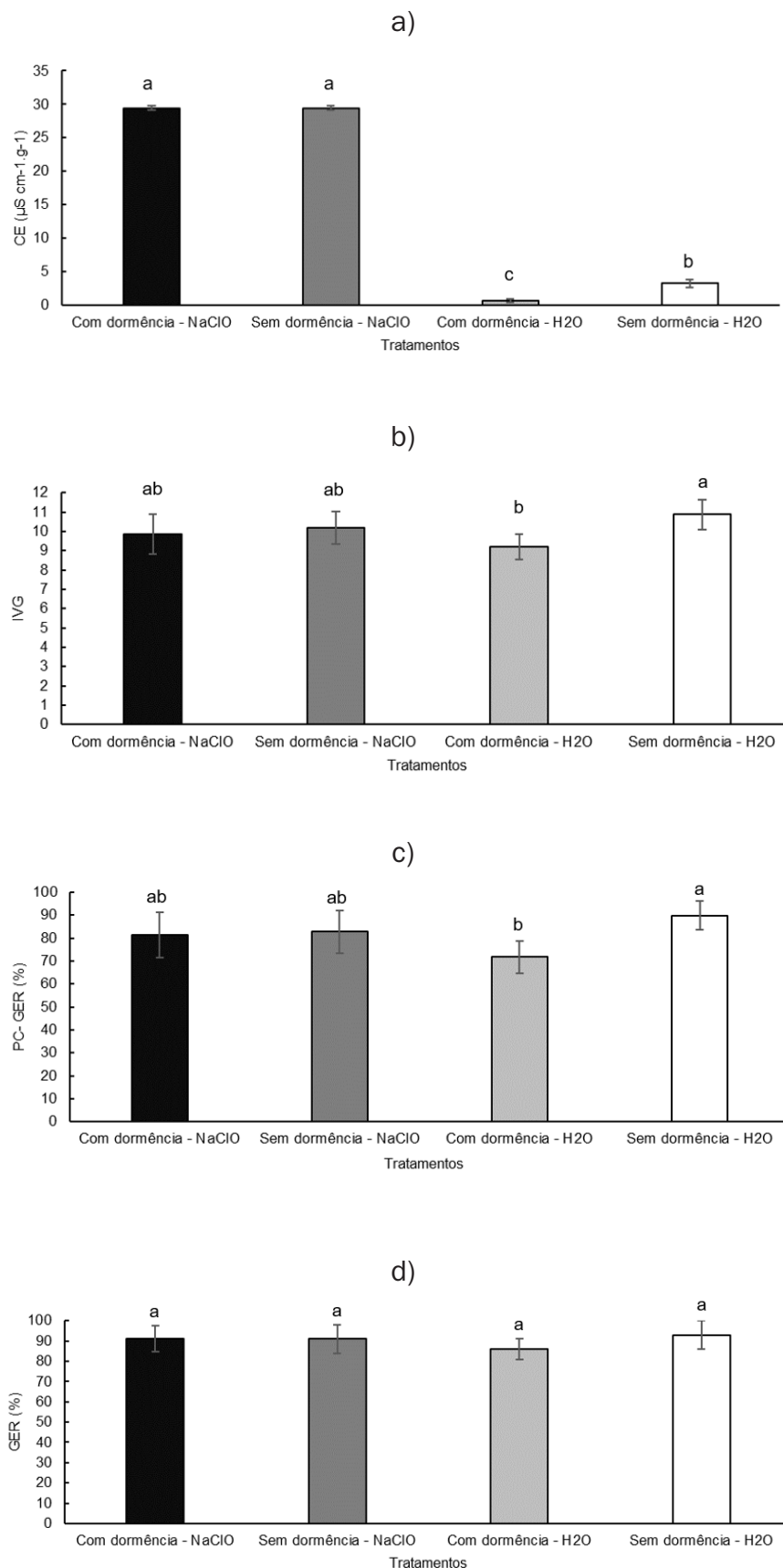
Fonte de variação	QUADRADO MÉDIO						
	PC-GER	GER	PA	SD	SM	IVG	CE
Tratamentos	437,46**	64,46 <sup>ns</sup>	3,46 <sup>ns</sup>	31,13 <sup>ns</sup>	3,13 <sup>ns</sup>	3,85**	759,91**
Erro	68,16	41,48	11,73	12,48	6,05	0,69	0,15
CV* (%)	10,15	7,14	81,8	92,67	135,75	8,31	2,48
Média geral	81,31	90,18	4,19	3,81	1,81	10,02	15,69

\* CV (%): Coeficiente de variação.

\*\* Significativo.

ns: não significativo a p > 0,05 pelo teste F.

Observa-se que houve efeito significativo nos valores de CE para as sementes submetidas ao NaClO, com aumento na CE de 28,77  $\mu\text{S cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$  para a amostra com dormência e 26,24  $\mu\text{S cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$  para a amostra de sementes sem dormência, quando comparadas à imersão em água, cuja CE obtida foi de 0,67 e 3,20  $\mu\text{S cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ , respectivamente (figura 1a).



**Figura 1** – Testes de condutividade elétrica (CE) (a), índice de velocidade de germinação (IVG) (b), primeira contagem de germinação (PC-GER) (c) e germinação (GER) (d), para amostras de sementes de arroz com dormência e sem dormência, submetidas à imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) e água (H<sub>2</sub>O).

\*Médias com letras iguais minúsculas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Observaram-se, com o teste de CE, maior extravasamento de solutos das sementes, provavelmente causado pela menor integridade das células da cariopse das sementes, e redução da capacidade dessas membranas de se recompor após a embebição com o NaClO, resultando na redução da qualidade fisiológica das sementes (MARCOS FILHO, 2015). Ressalta-se que a utilização de NaClO também causou danos nas sementes sem dormência, com diferença de  $2 \mu\text{S cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$  da amostra com dormência. Tais resultados corroboram os de Carnelossi *et al.* (1995), pois esses autores inferem que, embora empregado em laboratórios de análise de sementes para assepsia delas, o poder oxidante do NaClO pode atuar na permeabilidade de células.

A análise para o IVG contabilizada no teste final de germinação demonstrou diferenças significativas (figura 1b). As sementes sob imersão com NaClO com dormência e sem dormência apresentaram respectivamente aumento de 6,52% e 10,54% no índice, quando comparadas à amostra de sementes com dormência com a utilização de água, com valor de IVG de 9,2. As sementes sem dormência sob imersão com água apresentaram maior IVG, de 10,87, explicado pelo período de um ano de armazenamento a que estiveram submetidas desde a colheita. Resultados semelhantes foram encontrados por Stingham (2015) em sementes de arroz irrigado que superaram a dormência após 90 dias da colheita.

O percentual de plântulas normais na primeira contagem de germinação (PC-GER) (figura 1c) apresentou variações em relação à dormência quando submetidas à imersão em água, na qual as sementes sem dormência (90%) tiveram incremento de 18% em relação às sementes com dormência (72%).

Em relação à germinação, a análise estatística não revelou diferença significativa entre os tratamentos após a imersão das sementes em água e em NaClO (figura 1d), como verificado no teste prévio à imersão, porém obteve-se para a amostra de sementes com dormência imersas em água menor percentual de germinação (86%). Para as amostras de sementes sem dormência imersas em água, notou-se incremento de 7% de germinação, e, para as sementes com e sem dormência em NaClO, houve em ambas incremento de 5%, quando comparadas à germinação de sementes com dormência em imersão em água. Segundo Carnelossi *et al.* (1995), a utilização de hipoclorito pode estimular a germinação das sementes ou inibi-la, pois em algumas espécies a imersão por tempo maior pode ter efeito prejudicial, enquanto em menores períodos se tornaria estimulante.

Observa-se que, independentemente do nível de dormência das sementes ao serem condicionadas no NaClO, o elevado extravasamento de solutos visualizado nelas através da condutividade elétrica não afetou o percentual de plântulas normais e o IVG, pois estes não diferiram significativamente quanto à imersão em água nas sementes com e sem dormência (figura 1).

Dessa maneira, o uso do NaClO pode ter causado oxidação nos componentes de proteção da semente, como compostos fenólicos e no tegumento, ocasionando a sua ruptura e o efeito na germinação de ambas as amostras, com e sem dormência, pois a dormência nas sementes de arroz logo após a colheita se deve à presença de compostos fenólicos (MENEZES *et al.*, 2009). Esses compostos insolúveis (fenólicos) das paredes celulares têm ligações com componentes de lignina (ZHOU *et al.*, 2004). O fato de a casca de arroz possuir em torno de 14,5% de lignina (SILVA *et al.*, 2016) pode ter permitido a reação do NaClO através da oxidação ou pela adição de cloro nas moléculas de lignina das sementes (HISE, 1996 *apud* SOFIATTI *et al.*, 2009).

O efeito do uso de NaClO pode apresentar dúvidas, conforme a concentração utilizada já observada em outras espécies. Em *Avena fatua* L., o emprego da concentração de 6% de cloro ativo causou alterações nas membranas do tegumento das sementes, proporcionando maior fornecimento de oxigênio para o embrião e, então, maior germinação (HSIAO & QUICK, 1984). A utilização de 0,5% de NaClO por 24h e a secagem a 45°C mostraram-se eficientes para a superação da dormência em azevém (*Lolium multiflorum*) armazenado até 88 dias (MARTINS *et al.*, 2016). Em sementes de café, o uso de NaClO na concentração de 4% foi eficiente na degradação do pergaminho que envolvia as sementes e favoreceu a germinação (SOFIATTI *et al.*, 2009). Para a germinação de sementes de mamão, a imersão sob concentração de até 6% de NaClO por 8 a 24h foi prejudicial, quanto maior a concentração (GÓMEZ, 2016). Em sementes de alface, cultivar Moreninha de Uberlândia, a utilização do hipoclorito de sódio em solução de 2% de cloro prejudicou a germinação (CARNELOSSI *et al.*, 1995), e, em estudo com o cultivar Regina, a imersão em solução de hipoclorito a 1% após

o condicionamento das sementes aumentou a germinação (RODRIGUES *et al.*, 2012). No presente trabalho, fez-se uso das recomendações do RAS quanto à concentração de NaClO e à temperatura de imersão das sementes de arroz, pelo fato de ser considerado um método com potencial para a superação de dormência na cultura. Dessa forma sugere-se, para pesquisas futuras, a utilização de imersão das sementes em maiores concentrações de NaClO.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que o método de imersão de sementes em solução de hipoclorito de sódio e em água promove a superação da dormência em sementes de arroz.

O NaClO causa alterações prejudiciais na qualidade fisiológica das sementes relacionadas ao vigor, pelo teste de condutividade elétrica em sementes de arroz cultivar SCS 122 Miura.

## REFERÊNCIAS

Bewley, J. D. & Black, M. Seeds: physiology of development and germination. New York: Plenum Press; 1994. 445 p.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: ACS; 2009. 398 p.

Carnellosi, M. A. G., Lamounier, L. & Ranal, M. A. Efeito da luz, hipoclorito de sódio, escarificação e estratificação na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), cv. maioba e moreninha-de-Uberlândia. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 1995; 30: 779-787.

Carvalho, N. M. & Nakagawa, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5. ed. Jaboticabal: Funep; 2012. 590 p.

Companhia Nacional de Abastecimento – Conab. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília: Conab; 2018. 129 p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. Commodities by country. 2018. [Acesso em: 27 mar. 2018]. Disponível em: [http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities\\_by\\_country](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country).

Gómez, S. J. Efeito do hipoclorito de sódio na qualidade fisiológica e integridade do tegumento de sementes de mamão [Dissertação de Mestrado em Fitotecnia]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2016.

Hsiao, A. I. & Quick, W. A. Actions of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide on seed dormancy and germination of wild oats, *Avena fatua* L. Weed Research. 1984; 24: 411-419.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1984.tb00604.x>

Maguire, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science. 1962; 2: 176-177.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

Marcos Filho, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. 2. ed. Londrina: Abrates; 2015. 660 p.

Martins, A. B. N., Radke, A. K., Monteiro, M. A., Dias, L. W., Tunes, L. V. M., Meneghelo, G. E., Xavier, F. M., Bruner, A. P., Costa, C. J. & Mittelman, A. Methods for breaking seed dormancy of ryegrass during storage periods. *African Journal of Agricultural Research*. 2016; 11: 4567-4570.

DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11657>

Menezes, N. L., Franzin, S. M. & Bortolotto, R. P. Dormência em sementes de arroz: causas e métodos de superação. *Ciências Agro-ambientais*. 2009; 7: 35-44.

Rodrigues, D. L., Lopes, H. M., Silva, E. R. & Menezes, B. R. S. Embebição, condicionamento fisiológico e efeito do hipoclorito de sódio na germinação de sementes de alface. *Revista Trópica*. 2012; 6: 52-61.

Silva, P. R. N., Gonçalves, G. R. & Freitas, J. C. C. Preparação, caracterização e avaliação na gaseificação de celuligninas de bagaço de cana e casca de arroz: caso de reaproveitamento de resíduos lignocelulósicos. *Revista Virtual de Química*. 2016; 20: 1-15.

Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado – Sosbai. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Santa Maria; 2014. 199 p.

Sofiatti, V., Araújo, E. F., Araújo, R. F., Cargnin, A., Reis, M. S. & Silva, L. V. B. D. Uso de hipoclorito de sódio para acelerar a emergência das plântulas e o desenvolvimento das mudas de caféiro. *Bragantia*. 2009; 68: 233-240.

Stinghen, J. C. Caracterização de cultivares de arroz irrigado quanto à dormência e tolerância ao frio na germinação [Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal]. Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina; 2015.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M. & Murphy, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

Vieira, R. D. & Krzyzanowski, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: Vieira, R. D, Krzyzanowski, F. C. & França Neto, J. de B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: Abrates; 1999. p. 1-28.

Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. & Blanchard, C. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry*. 2004; 87: 401-406.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.015>