

Comunicación Técnica

Comportamiento de películas de Quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate

S. Patricia Miranda,^{1*} Galo Cárdenas,² Damián López,¹ Alma V. Lara-Sagahon¹

¹ Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54700, Estado de México, México

² Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Edmundo Larenas 129, Concepción, Chile

Recibido el 27 de junio del 2003; aceptado el 20 de enero del 2004

Resumen. Se conoce que las películas de quitosán son buenas barreras al oxígeno y al dióxido de carbono. No obstante, las películas de quitosán mezcladas con emulsificantes y plastificantes mejoran sus propiedades fisicomecánicas. La adición de glicerol, tween 80 y cera a las películas, aseguran la permeabilidad al agua y mejoran las propiedades mecánicas como elongación, fuerza de tensión y módulo elástico. Este material novedoso potencialmente puede ser usado como empaque de alimentos biodegradable.

Palabras clave: Películas de quitosán, películas biodegradables, películas comestibles, permeabilidad al vapor de agua, pruebas mecánicas, almacenamiento de aguacate.

Abstract. Chitosan films are known as a good oxygen and carbon dioxide barrier. However, chitosan composite films containing mixtures with emulsifier and plasticizers are able to improve their physico-mechanical properties. The addition of glycerol, tween 80 and wax into the films ensure the water permeability and improve mechanical properties such as elongation, tension force and elastic modulus. This novel materials exhibit a potential to be used as biodegradable food packing.

Key words: Chitosan films, biodegradable films, edible films, water vapor permeability, mechanical properties, avocado storage conditions.

Introducción

Las películas y recubrimientos comestibles y biodegradables representan una alternativa de empaque sin costos ambientales. Aunque no se pretende el reemplazo total de películas de empaque sintéticas, se tiene el potencial de reducir considerablemente estos materiales.

Los materiales que se emplean para la formación de películas y recubrimientos comestibles y biodegradables son proteínas, lípidos y polisacáridos.

Los polisacáridos solubles en agua son polímeros de cadena larga que se disuelven o dispersan en agua confiriendo un efecto viscoso [1] y son comúnmente usados en alimentos como espesantes debido a que incrementan su viscosidad cuando son hidratados. Los polisacáridos también pueden formar películas comestibles. Esta clase de películas incluyen las que son a base de celulosa y sus derivados, quitosano, almidones, dextrinas, alginatos, carragenina y pectina [2-6]. Debido a su relativa insolubilidad en estado natural, la celulosa y la quitina son químicamente tratadas para incrementar su solubilidad en agua. El alginato y la pectina requieren adición de iones de calcio para formar geles [3].

El mecanismo de formación de películas de polisacáridos, es el rompimiento del polímero en segmentos y regenerar la cadena del polímero al interior de la matriz de la película o gel. Esto es usualmente logrado por evaporación de un solvente, creando enlaces hidrofílicos con hidrógeno y enlaces iónicos [3].

Las películas de polisacáridos pueden emplearse para extender la vida de anaquel de frutas, hortalizas, productos marinos o de carne, reduciendo su deshidratación, rancidez oxidativa y obscurecimiento superficial [1]. Los polisacáridos pueden reducir los niveles internos de O₂ y elevar los de CO₂ permitiendo prolongar la vida de anaquel de los productos vegetales frescos [1].

Los beneficios de los recubrimientos a base de polisacáridos son: a) Retención de sabor, ácidos, azúcares, textura y color, b) mayor estabilidad durante el embarque y almacenamiento, c) mejor apariencia y d) reducción de pudriciones ya que reduce la posibilidad de que las condiciones anaeróbicas se presenten [1].

El quitosán es de interés potencial como base de películas y recubrimientos comestibles porque tiene propiedades de barrera al oxígeno además de tener actividad bactericida y fungicida contra algunos patógenos de frutos [7-10]. Sin embargo, el quitosán es una molécula hidrofílica la cual debe tratarse con algunos aditivos para propiciar cierta hidrofobicidad y mejorar sus propiedades mecánicas, además de que a alta humedad relativa se puede disolver.

El objetivo de este trabajo es estudiar la permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas de películas de quitosán con aditivos que proveen humectación, elasticidad e hidrofobicidad, neutralizadas y no neutralizadas, bajo condiciones simuladas de almacenamiento del aguacate y condiciones inversas de humedad relativa a temperatura de refrigeración y temperatura ambiente.

Materiales y métodos

Determinación de la actividad de agua en aguacate. Se seleccionaron aguacates variedad Hass en estado de madurez comercial obtenidos de la Central de Abasto del Estado de México. Los aguacates fueron lavados, despulpados y la pulpa fue homogeneizada manualmente para determinar la actividad de agua (A_w) en un Aqualab modelo CX2. Esta prueba se realizó por triplicado.

Preparación de quitina y quitosán. La quitina se preparó a partir de caparazones de camarón, se llevó a cabo la desmineralización con HCl 1N a 30 °C y la desproteinización con NaOH 1N a 100 °C.

Se desacetiló la quitina para obtener quitosán usando NaOH al 50% p/v a 100 °C por 1-2 horas.

Caracterización de quitosán

Determinación del peso molecular. Se usó un viscosímetro Ostwald de 0.44 mm con un baño termostático de Cole Palmer. Una vez obtenida la viscosidad intrínseca se obtuvo K y a de tablas para HAc/NaAc siendo 0.076 y 0.76 respectivamente [11]. A partir de los datos y con la ecuación de Mark Houwink se obtuvo el peso molecular viscosimétrico.

Grado de desacetilación. Se usó un potenciómetro W1W pH 531 con electrodo de vidrio combinado. El porcentaje de desacetilación se determinó por titulación potenciométrica [12].

Preparación de la solución base de quitosán. Se preparó una solución de quitosán al 2 % p/v en una solución de ácido acético al 1%.

Preparación de las soluciones para películas de quitosán compuestas. A partir de la solución base de quitosán se prepararon las soluciones para formar las películas compuestas. Se adicionó glicerol, tween 80 y cera de abeja a las concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.1 % respectivamente. Posteriormente las soluciones se homogenizaron en un homogenizador marca Silverson L4R por 15 minutos. Se dejaron reposar las soluciones hasta que se eliminaron las burbujas.

Formación de películas. Se usaron recipientes de vidrio de 10 cm de diámetro, los cuales fueron lavados y desengrasados con acetona. A cada recipiente se le adicionó 15 ml de cada una de las soluciones de quitosán. Los recipientes se dejaron a temperatura ambiente 24 °C y 50% humedad relativa y por evaporación del solvente se formaron las películas.

A otro grupo igual de películas se les neutralizó "in situ", sumergiendo los recipientes con la película formada en una solución de hidróxido de sodio 1N por 5 minutos y posteriormente fueron lavadas con agua hasta eliminar todo el hidróxido restante. Las películas se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron almacenadas en un recipiente cerrado a 25 °C.

Evaluación del grosor de las películas. El grosor de las películas fue medido con un micrómetro Mitutoyo modelo Digimatic con una resolución de 0.001 mm. Las películas se midieron en 5 puntos y fue considerado el valor promedio.

Evaluación de la permeabilidad al vapor de agua de películas compuestas de quitosán

Acondicionamiento de la cámara ambiental y la cámara de prueba. Las cámaras ambientales fueron acondicionadas 24 h antes, con soluciones saturadas KCl y K₂SO₄ creando humedades relativas de 85 y 97%, respectivamente. Las celdas de prueba fueron acondicionadas con las mismas soluciones.

De acuerdo a la ASTM E96-80, el método gravimétrico sugiere una celda de doble fondo. Los dos grupos de películas fueron colocadas en las celdas de prueba, sujetadas con bandas de goma y selladas. El peso inicial se registró y las celdas de prueba fueron transferidas a las cámaras ambientales las cuales ya estaban acondicionadas a 85% y 97% de humedad relativa. Las cámaras ambientales se mantuvieron a 4°C ± 2 y a 24 °C ± 2. La pérdida o incremento de peso de las celdas de prueba fueron monitoreadas a través del tiempo y se registraron un mínimo de siete valores a partir del estado de equilibrio [13].

Se graficaron la pérdida o ganancia de peso contra el tiempo y la pendiente resultante fue dividida por el área expuesta de la película obteniéndose así, la Transmisión de Vapor de Agua. Los datos fueron tratados de acuerdo a las ecuaciones descritas para Permeabilidad en la ASTM y se hicieron las correcciones de acuerdo con lo descrito por Schwartzberg y Mc Hugh para películas hidrofilicas quienes consideran el aire estancado entre la solución saturada dentro de la cámara de prueba y la superficie de la película dentro de la cámara así como la presión parcial debajo de la película.

Al grupo de 8 películas compuestas no neutralizadas, se le realizó la determinación de permeabilidad al vapor de agua bajo condiciones de Humedad relativa interna de 85% y externa de 97% (modelo de condiciones de almacenamiento de aguacate) y viceversa, a temperaturas de 4 °C y 24 °C. De igual manera se realizó el experimento al grupo de 8 películas compuestas neutralizadas.

El planteamiento estadístico fue una análisis de varianza para un experimento factorial en bloques completos y los bloques fueron la temperatura a 4 °C y 24 °C y los factores i) 8 Películas, ii) humedad relativa de 85% interna y 97% externa, 97% interna y externa, iii) películas no neutralizadas y películas neutralizadas.

Evaluación de las propiedades mecánicas de películas compuestas de quitosán. Las propiedades mecánicas fueron evaluadas con los métodos estándar de la ASTM (D882-91) para tensión [14]. Películas recién formadas se cortaron en listones de 2.8 cm de ancho por 10.5 cm de largo y se almacenaron a 30 °C y 50% de humedad relativa por 48 horas antes de la prueba. Se empleó un analizador de textura TAxT2, (Texture Technologies, Corp., New York), a una velocidad

transversal de 2 mm / s para tensión. El área expuesta de la película fue de 6.7 cm de largo. Se evaluó la fuerza de tensión y elongación al punto de fractura y módulo elástico. Se probaron cuatro muestras por película y por prueba. Con el método estadístico ANOVA-MANOVA $p < 0.05$, se analizaron los datos obtenidos.

Resultados y discusión

Evaluación de la actividad de agua en aguacate Hass. De acuerdo a los datos obtenidos en el Aqualab, el valor promedio de la actividad de agua de la pulpa del aguacate es de 0.973. Por lo tanto la Humedad relativa del aguacate es 97.3 % (HR = Actividad de agua * 100).

Determinación del peso molecular del quitosán y grado de desacetilación del quitosán. De los datos obtenidos y de la ecuación de Mark-Houwink se obtuvo un peso molecular para el quitosán de 130,000 g/mol. El grado de desacetilación fue de 85% y completamente soluble en una solución de ácido acético al 1%.

Elaboración de películas de quitosán compuestas. Las películas de quitosano compuestas tuvieron las siguientes características en general: translúcidas, elásticas sin fracturas y sin poros. Las películas que contenían cera presentaron partículas sin disolver y las que contenían glicerol eran más elásticas. Las que contenían Tween 80 eran elásticas y adherentes.

Las películas que fueron neutralizadas presentaron un comportamiento hidrofóbico, es decir no se disolvían al contacto con el agua.

Determinación del grosor de las películas de quitosán compuestas. La Tabla 1, muestra el grosor de las diferentes películas no neutralizadas y neutralizadas.

En general se observa que el grosor de las películas se incrementa cuando algún aditivo se adiciona, en particular los que contienen ácidos grasos como es la cera de abeja y el

Tabla 1. Grosor promedio de películas de quitosán compuestas (mm).

Película	no neutralizada	neutralizada
Quitosán	0.015	0.012
Quitosán-cera de abeja	0.027	0.028
Quitosan-glicerol	0.014	0.015
Quitosán-tween 80	0.017	0.015
Quitosán-cera-glicerol	0.035	0.026
Quitosán-cera-tween	0.035	0.022
Quitosán-glicerol-tween	0.022	0.016
Quitosán-cera-glicerol-tween	0.033	0.017

tween, el máximo grosor es obtenido con las películas de quitosán con cera y tween y cera glicerol.

También se observa que la neutralización de las películas disminuye el grosor de éstas y esto puede ser debido al efecto de precipitación del polímero. El efecto de disminución del grosor es más dramático en las películas que tienen dos aditivos, en particular la película compuesta con tres aditivos, debido esto a la presencia de otros grupos orgánicos activos que son capaces de generar interacciones atómicas en la macromolécula cuando es neutralizada.

Evaluación de la permeabilidad al vapor de agua de películas de quitosán compuestas. En la figura 1A, se observan los resultados obtenidos de permeabilidad efectiva al vapor de agua de la películas de quitosán neutralizadas y no neutralizadas a temperatura de 4°C bajo las condiciones simuladas del almacenamiento de aguacate, en donde la humedad relativa interna (del aguacate) es de 97% y la externa (del refrigerador) es de 85%.

La menor permeabilidad efectiva fue presentada por la película de quitosán no neutralizada con un valor de 0.2613 g mm / m² h KPa y el valor mas alto de permeabilidad fue para las películas de quitosán-cera-glicerol neutralizada con un valor de 6.96 g mm / m² h KPa. Este último valor, se debe principalmente a la presencia de glicerol ya que el glicerol

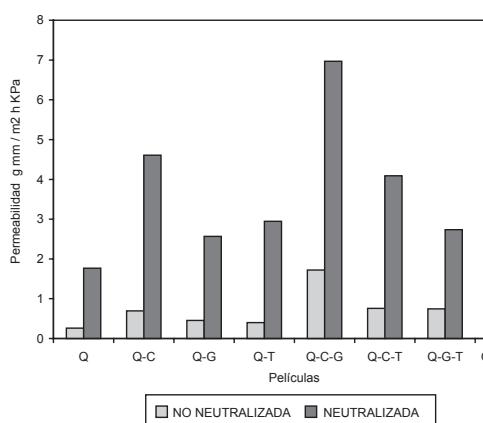


Fig. 1A

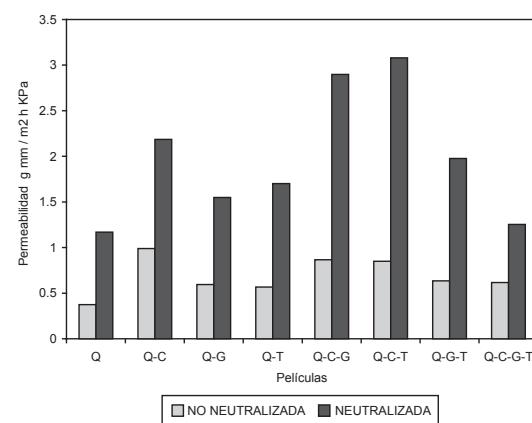


Fig. 1B

produce relajación en las cadenas del quitosano reduciendo los enlaces de hidrógeno e incrementando el espacio intermolecular, aumentando además, la sorción de moléculas polares como el agua, ya que la neutralización de la película se llevó a cabo *in situ* por lo que la superficie de la película estirada expuesta a la solución neutralizadora se precipitó formándose así poros grandes.

La Figura 1B, muestra los resultados de permeabilidad efectiva del mismo grupo de películas bajo las mismas condiciones de temperatura pero con el flujo de permeante en dirección opuesta, es decir humedad interna 85% y humedad externa 97%.

Se observa que las películas de quitosán no neutralizadas muestran el valor más bajo de permeabilidad con un valor de 0.3744 g mm / m² h KPa.

En ambos casos figura 1A y 1B, es evidente que la neutralización causa un efecto sobre el incremento en la permeabilidad y es mucho mayor cuando el sentido del flujo del permeante es de adentro hacia fuera o sea de 97% de humedad relativa interna y 85% de humedad relativa externa.

En las figuras 2A y 2B se resumen los valores de permeabilidad de las películas de quitosán compuestas bajo las dos condiciones de humedad relativa pero en este caso a temperatura de 24 °C.

Las películas de quitosán no neutralizadas en la figura 2A exhiben el valor mas bajo de permeabilidad efectiva siendo 0.2435 g mm / m² h KPa , mientras que en la figura 2 B, en las condiciones inversas de humedad relativa, también las películas de quitosán neutralizadas y no neutralizadas muestran valores semejantes de 0.27 g mm / m² h KPa.

En todas las condiciones experimentales aquí probadas, las películas de quitosán poseen el valor mas bajo de permeabilidad al vapor de agua y estos valores son mas bajos que los obtenidos previamente por Garnica, en donde las películas de quitosán con aditivos fueron estudiadas bajo un gradiente de humedad relativa mucho mayor (100 -0 %), siendo estos valores 700 % mayores a las que se obtienen en este trabajo en donde el gradiente de humedad relativa es de 97-85 % [15]. Esto demuestra que la permeabilidad de las películas hidrofilicas está relacionada directamente con el gradiente de humedad relativa.

Ahora bien, la dirección de flujo del permeante es otra de las condiciones que tienen influencia en la permeabilidad de las películas y esto puede verse en las figuras 1A y 1B en donde 1 A son las condiciones simuladas de almacenamiento recomendadas de aguacate, y es 134 % mayor que 1B donde las condiciones de humedad relativa son inversas. Este mismo efecto fue reportado por Mauer quien obtuvo valores de 300% mayores cuando el flujo del permeante en películas de ? caseína con glicerol [16].

Los valores de permeabilidad a 4 °C son mayores a los que presentan las películas a 24 °C y para explicar este fenómeno , existen algunas hipótesis, la primera propone que la sorción de agua se incrementa debido al decremento en la temperatura iniciando el factor preponderante de transferencia [17, 18]; Rogers observó un incremento en permeabilidad de polietileno a bajas temperaturas y muestra que la difusión y la sorción se desvían de la forma lineal a bajas temperaturas debido al efecto plastificante de las moléculas sorbidas [19]. La segunda hipótesis se basa en un cambio en la estructura de la película entre 5 y -10°C que afecta la difusión de agua en la matriz. Otra hipótesis concierne a las propiedades de las moléculas del penetrante.

Evaluación de las propiedades mecánicas de películas compuestas de quitosán. Las propiedades mecánicas de las películas son tan importantes como las propiedades de barrera. La fuerza de tensión, da una medida de la integridad y durabilidad de las películas para potenciales aplicaciones y el porcentaje de elongación es una medida que representa las propiedades de estiramiento de las mismas.

Los resultados de elongación de películas de quitosán compuesto neutralizadas y no neutralizadas se muestran en la figura 3. El mayor porcentaje de elongación fue de las películas de quitosán-cera y tween y quitosán —cera— glicerol no neutralizadas con valores de 9.3 y 9.1 respectivamente. Estos valores representan un aumento de 365 % de elongación respecto a las películas de quitosán no neutralizada sin aditivos. El valor mas bajo de elongación fue de 0.1 % en la película de quitosán neutralizada, lo que indica que la neutralización en efecto elimina las interacciones entre cadenas del polímero haciéndolo mas rígido.

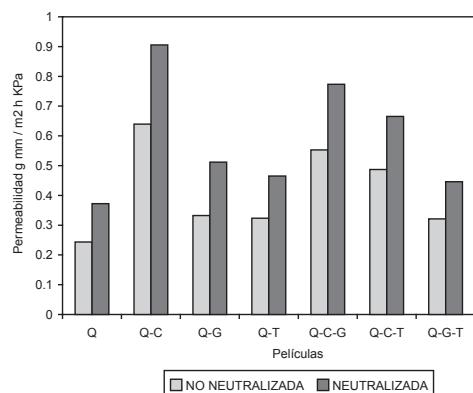


Fig. 2A

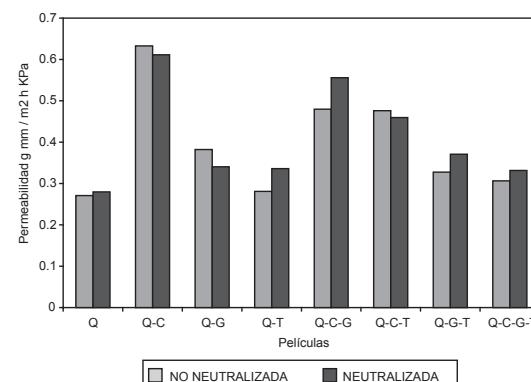
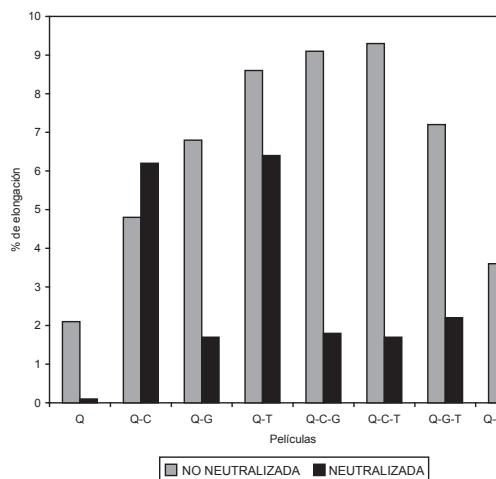


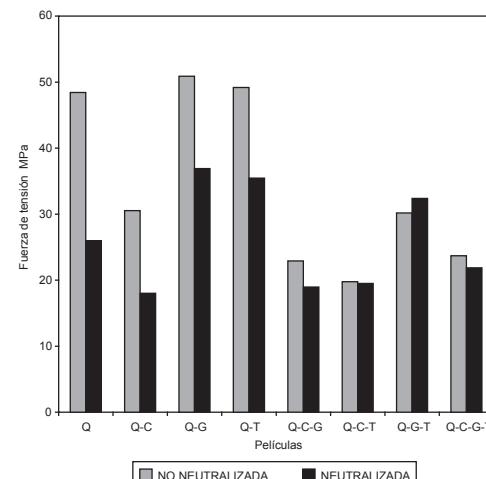
Fig. 2B

**Fig. 3**

La adición de cera, glicerol y tween a las películas de quitosán, incrementa el porcentaje de elongación debido al glicerol y al éster del ácido graso presente en la composición del tween los cuales actúan como plastificantes. La medida molecular, la configuración y el total de grupos polares en los plastificantes así como su compatibilidad con las cadenas de quitosán es lo que hace que exhiba diferentes porcentajes de elongación [20,25]. Se observa que la mayoría de las películas no neutralizadas muestran valores mayores comparados con las películas neutralizadas. En el caso de las películas de quitosán-cera-tween hubo un aumento en la elongación de 342 % comparado con la película de quitosán solo no neutralizado.

Las películas de quitosán exhiben valores de elongación mas bajos en la mayoría de las películas, sin embargo cuando se lleva a cabo la neutralización usando NaOH se nota que éste reacciona con los aditivos, haciendo mas flexible a las películas que los contienen, particularmente con cera y tween.

La fuerza de tensión que se obtiene en las películas de quitosán compuesto tanto neutralizado como no neutralizado se resume en la figura 4.

**Fig. 4**

Los valores máximos de tensión los presentan las películas no neutralizadas de quitosán, quitosán con glicerol y quitosán con tween con valores de 48.4, 50.9 y 49.2 MPa respectivamente. También se obtuvieron valores altos con las películas de quitosán-tween y quitosán-glicerol neutralizado. Esto es importante si se piensa en la posible aplicación de estas películas como envolturas de alimentos.

El módulo elástico es definido por Mauer [16] como la fuerza intrínseca de las películas y es evaluado en el rango lineal de la gráfica de fuerza de tensión.

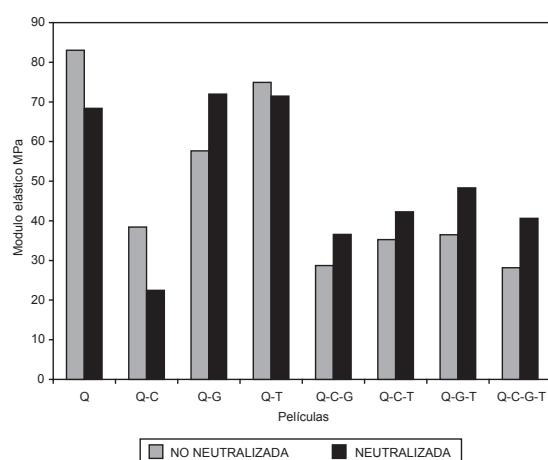
La figura 5 resume el comportamiento elástico de las películas de quitosán compuesto neutralizadas y no neutralizadas.

Las películas de quitosán-glicerol, quitosán-tween y quitosán neutralizadas muestran el valor máximo de 71.9, 71.4 y 68.4 MPa respectivamente. El valor mas bajo fue para las películas de quitosán-cera con 22.5 MPa. En cuanto a las películas no neutralizadas el valor mas grande lo presentan las películas de quitosán y quitosán-tween con valores de 83 y 74.9 MPa.

Las propiedades mecánicas en términos de elasticidad y rigidez no son muy diferentes comparadas con los polímeros sintéticos. El módulo de elasticidad de biomateriales varía de 2500-3000 MPa, son menores para los polímeros rígidos como los almidones termoplásticos de 50 MPa y más bajos para materiales elásticos como polihidroxialcanoatos de cadena mediana [26].

Conclusiones

La literatura provee una vasta cantidad de información sobre las propiedades de barrera de biomateriales. De cualquier modo, las comparaciones entre biomateriales son complicadas y algunas veces no posibles debido al uso de diferentes tipos de equipos y a las diversas condiciones de evaluación. De acuerdo a las condiciones de almacenamiento de frutas y vegetales deben ser considerados algunos factores ya sean mecánicos o químicos involucrados en el diseño de películas para evitar el daño por microorganismos.

**Fig. 5**

Se obtuvieron películas de quitosán compuesto transparentes, elásticas, sin poros ni fracturas. Las películas de quitosán contenido tween son más elásticas y con mejores propiedades adherentes. Las películas neutralizadas se comportan hidrofóbicamente y del análisis estadístico se concluye que el tipo de película, la neutralización y la temperatura tienen efecto significativo sobre la permeabilidad efectiva al vapor de agua. Con este trabajo se tiene información suficiente que nos permite pensar en algunas condiciones que pueden ser adecuadas para el recubrimiento de frutos en particular el aguacate para alargar su vida útil.

Agradecimientos

Al apoyo económico del Programa de Cátedras, en particular la 1.06 de Biotecnología de la FESC-UNAM

Referencias

1. Bosques, M. E.; Vernon C. J.; Pérez F. L.; Guerrero L. I. *Industria Alimentaria*, **2000** Ene Feb. p. 4-36.
2. Krochta, J. M.; De Mulder Johnston, C. *Food Technology* **1997**, 51, 60-74.
3. Butler, B.L.; Vergano, P.J.; Testing R.F.; Bunn, J.M.; Wiles J.L., *Journal of Food Science* **1996**, 61, 953 - 961.
4. Coffin, D. R.; Fishman, M. L. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 1192-1197.
5. McHugh, T. H.; Huxsoll, C.C.; Krochta, J.M . *Journal of Food Science* **1996**, 61, 87-91.
6. Gnanasambandam, R.; Hettiarachchy, N.S., Coleman, M. *Journal of Food Science* **1997**, 62, 395-398.
7. Wong, D. W. S.; Gastineau, F. A.; Gregorsy, K. S.; Tillin, S. J.; Pavlath, A. E., *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 540-544.
8. Wiles, J.L.; Vergano, P.J.; Barron, F.H.; Bunn, J.M.; Testin, R.F. *Journal of Food Science* **2000**, 65, 1175-1179.
9. Hosokawa, J.; Nishiyama, M.; Yoshihara, K.; Kubo, T. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1990**, No. 29: 800-805.
10. Olabarrieta, I.; Forstrom, D.; Gedde, U.W. Hedenqvist, *Polymer*. **2001**, 4401-4408.
11. Schwartzberg, H.G. in "Edible films coatings to improve Food Quality", Lancaster-Basel, PA Technomic Publishing Co. **1994**, p 139-187.
12. MacHugh, T.H.; Avena-Bustillos, R.; Krochta, J.M. *Journal of Food Science* **1993**, 58, 899-903.
13. ASTM. "Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials", ASTM E 96-80, **1987**, p. 629-636
14. ASTM. "Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting", ASTM D 882-91, **1994a**, p 194-202
15. Garnica, M. O. Tesis Profesional. FESC-UNAM **2001**.
16. Mauer, L.J.; Smith, D.E.; Labuza, T.P. *International Dairy Journal* **2000**, 10, 353-358
17. Labuza, T.P. and Contreras-Medellín R. *Cereal Food World* **1981**, 26, 335-343
18. Johansson, F. and Leufven, A. *J. Food Sci.* **1994**, 59: 1328-1331.
19. Rogers, C.E. "Polymer permeability", in J. Comyn (Ed.). Elsevier, New York, **1985**, p 11-73
20. Chen, H. *J. Dairy Sci.* **1995**, 78: 2563-2583.
21. Fairley, P.; Monahan, F.J.; German, J.; Bruce, J.; Krochta, J.M. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 438-443.
22. Gennadios, C.L.Weller;; Hanna, M.A.; Froning, G.W. *J. Food Sci.* **1996**, 61, 585-589.
23. McHugh, T.H.; Aujard, J.F.; Krochta, J.M. *J. Food Sci.* **1994**, 59, 416-423.
24. Park, H.J.; Weller, C.L.; Vergano, P.J.; Testin, R.F. *J. Food Sci.* **1993**, 58, 1361-1370.
25. Sothornvit, R. and Krochta, J.M. *J. Food Sci.* **2000**, 65, 700-703.
26. Weber, C.J. "Biobased Packaging Materials for the Food Industry" **2000**, Nov, 12-44.