UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CHRISTIAN HUMBERTO CAICEDO FLAKER

**Estudo da dispersão da nanopartícula em água e seu efeito nas
propriedades de filmes nanocompósitos de gelatina**

Pirassununga

2014

CHRISTIAN HUMBERTO CAICEDO FLAKER

**Estudo da dispersão da nanopartícula em água e seu efeito nas
propriedades de filmes nanocompósitos de gelatina**

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção
de Título de Mestre em Engenharia
de Alimentos.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo José do
Amaral Sobral**

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

F576e Flaker, Christian Humberto Caicedo
Estudo da dispersão da nanopartícula em água e seu efeito nas propriedades de filmes nanocompósitos de gelatina / Christian Humberto Caicedo Flaker. -- Pirassununga, 2014.
71 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral.

1. Filmes biodegradáveis 2. Proteína
3. Montemorilhonita 4. Propriedades físicas
5. Propriedades mecânicas I. Título.

DEDICATÓRIA

Com todo o meu amor para as pessoas
que fizeram tudo na vida para que eu
pudesse realizar os meus sonhos, a
vocês sempre meu coração e gratidão.

Fredy e Esperanza.

AGRADECIMENTOS

À República Federativa do Brasil pela generosidade e hospitalidade durante minha estadia de estudos de mestrado.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral, pela confiança, constância e sempre permanecer como exemplo e modelo a seguir.

Aos técnicos: Ana Monica Bittante, Rodrigo Lourenço, Carla Mônaco e Ednelí Monterrey pelo apoio na realização das análises.

À Prof. Dra. Eliria Pallone, pela orientação na interpretação das análises de DRX.

Às Professoras Samantha Pino, Rosemary Carvalho e Professor Holmer Savastano Junior por facilitar o uso dos seus laboratórios.

Aos colegas da Pós-graduação pela sua companhia e amizade.

À seção de Pós-graduação, Layla Denófrío e funcionários, que sempre me atenderam com muita amabilidade.

Ao Comitê de Relações Internacionais, Prof. Dr. Raul Franzolin e Clélia de Godoy, pelo apoio administrativo nos trâmites da internacionalização.

À FAPESP pela bolsa (2011/15784-1), que permitiu a dedicação exclusiva ao projeto.

À Adriana Bordinon, por estar sempre do meu lado, brindando seu apoio, amor e colaboração durante o desenvolvimento do Mestrado.

À todos aqueles que me acompanharam por esta travessia.

Muito obrigado a todos

RESUMO

FLAKER, C.H.C. **Estudo da dispersão da nanopartícula em água e seu efeito nas propriedades de filmes nanocompósitos de gelatina**. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Uma das alternativas possíveis para substituir os materiais sintéticos na área de embalagem de alimentos é o desenvolvimento de filmes baseados em biopolímeros. Vários estudos têm demonstrado o melhoramento nas propriedades de filmes baseados em biopolímeros, devido à utilização de nanopartículas como reforço. No entanto, as melhorias observadas são ainda limitadas e pode-se considerar que isso é devido a problemas de dispersão das nanopartículas em água, especialmente quando se utiliza a técnica tipo casting. Assim, os objetivos deste projeto foram: A) estudar a qualidade da dispersão de nanopartículas de montemorilhonita em água, e B) estudar o efeito dessas dispersões sobre algumas propriedades físicas e funcionais de filmes de gelatina produzidos com elas. As nanopartículas foram dispersas em água na concentração de 1 g MMT/100 g solução, com três dispositivos: homogeneizador mecânico (UT), moinho coloidal (MC) e processador ultrassônico (US). As dispersões foram analisadas para determinação de tamanho das partículas e potencial zeta, e por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica. Os filmes foram produzidos pela técnica de “casting”, com 5 g de gelatina/100 g de solução filmogênica e 30 g de glicerol/100g de gelatina. A concentração de nanopartículas foi 0, 1, 3, 5 e 7 g de MMT/100g de gelatina. Os filmes de controle e nanocompósitos produzidos com as dispersões de montemorilhonita foram caracterizados para determinação de espessura, umidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas por testes de tração e perfuração, cor e opacidade, brilho, microestrutura por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, transição vítrea por calorimetria diferencial de

varredura, difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e ângulo de contato. O potencial zeta e tamanho médio da partícula foi -53, -40, -47 mV e 377, 289, 395 nm, para as dispersões processadas por UT, US e MC, respectivamente. No geral, os filmes reforçados com montemorilhonita, foram 44% menos brilhantes e foram ligeiramente mais hidrofílicos do que os filmes de controle. A tensão na ruptura aumentou de 22 MPa para filmes de controle até 40 MPa, quando a concentração da montemorilhonita foi de até 5 g de MMT/100g de gelatina. A permeabilidade ao vapor de água não variou nos filmes nanocompósitos. O método de dispersão utilizado teve uma forte influência sobre a qualidade das dispersões, afetando o tamanho da partícula e potencial zeta, com efeito evidente sobre as propriedades físicas dos nanocompósitos. A concentração crítica de montemorilhonita como reforço pareceu estar limitada a 5 g de MMT/100 g de gelatina.

Palavras-chave: filmes biodegradáveis, proteína, montemorilhonita, propriedades físicas, propriedades mecânicas.

ABSTRACT

FLAKER, C.H.C. **Study of the nanoparticle dispersion in water and its effect on the properties of gelatin films nanocomposites**. 2014. 71 f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Engenharia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

One of the possible alternatives to replace synthetic materials in the area of food packaging is the development of films based on biopolymers. Several studies have demonstrated the improvement in properties of films based on biopolymers due to the use of nanoparticles as reinforcement. However, the observed improvements are still limited and it can be considered that this is due to dispersion problems of nanoparticles in water, particularly when using the casting technique. The aim of this project was to study the quality of the dispersion of nanoparticles (montmorillonite) in water, and to analyze the effect of these dispersions on some physical and functional properties of gelatin films. The nanoparticles were dispersed in water (1 g MMT/100 g solution), with three devices: mechanical homogenizer (UT), colloidal mill (MC) and ultrasonic processor (US). The dispersions were analyzed for determination of particle size and zeta potential, and by scanning electron and atomic force microscopies. Films were produced by casting, with 5 g of gelatin/100 g of film-forming solution and 30 g of glycerol/100 g of gelatin. The nanoparticles concentrations were 0, 1, 3, 5 and 7 g of MMT/100g of gelatin. The control and nanocomposite films were characterized for determination of thickness, moisture, water solubility, water vapor permeability, tensile and puncture mechanical properties, color and opacity, brightness, microstructure by scanning electron microscopy and atomic force microscopy, glass transition temperature by differential scanning calorimetry, X-ray diffraction, infrared spectroscopy with Fourier transform and contact angle. The zeta potential and average particle size was -53, -40, -47 mV and 377, 289, 395 nm; for UT, US and MC dispersions, respectively. In general, the films filled with montmorillonite were 44% less glossy and were slightly more hydrophilic than control film. The

maximum tensile strength increased from 22 MPa for control film to 40 MPa when the concentration of montmorillonite was up to 5 g of MMT/100g of gelatin. The water vapor permeability did not change in the nanocomposite films. The dispersion method used had a strong influence on the quality of dispersions; it can affect the particle size and zeta potential, with evident effect on the physical properties of nanocomposites. The critical concentration of montmorillonite as reinforcement seemed to be limited to 5 g of MMT/100 g of gelatin.

Keywords: biodegradable films, protein, montmorillonite, physical properties, mechanical properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Princípio de formação de nanocompósitos (baseado em Weiss, Takhistov e McClements, 2006).....	14
Figura 2. Aplicador automático de filmes do Laboratório de Tecnologia de Alimentos.....	22
Figura 3. Microscopia Eletrônica da montemorilhonita em pó comercial.	28
Figura 4. Distribuição do tamanho da partícula (a), e curvas de Potencial Zeta (b) das dispersões de montemorilhonita (MMT) em água em função da concentração de MMT.....	29
Figura 5. Microscopia Eletrônica da montemorilhonita após o processo de dispersão em água (a) Ultraturrax (b) Moinho coloidal (c) Ultrassom (d) Comb: Ultraturrax+ Ultrassom, e organização das camadas em um filme de argila após crio fratura (e).....	35
Figura 6. Micrografia das partículas por microscopia de força atômica após o processo de dispersão em água (a), e detalhe de uma partícula individual (b).	36
Figura 7. Curvas típicas dos testes de tração para os filmes de gelatina e nanocompósitos variando a concentração de MMT.	39
Figura 8. Curvas típicas dos testes de perfuração para os filmes de gelatina e nanocompósitos.	40
Figura 9. Micrografias (MEV) da superfície (a) e criofratura transversal (b) do filme de controle de gelatina.....	46
Figura 10. Micrografias MEV da superfície dos filmes nanocompósitos agrupados por método de dispersão e concentração de MMT	48
Figura 11. Micrografias MEV da seção transversal (após criofratura) dos filmes nanocompósitos, agrupados por método de dispersão e concentração de MMT	49
Figura 12. Micrografias AFM da superfície 2D e 3D dos filmes nanocompósitos com 5 g MMT/100 g gelatina e de controle.	50
Figura 13. Espectros de difração da MMT antes e após processamento com Ultraturrax+ Ultrassom.	51

Figura 14. Espectros de difração dos filmes nanocompósitos processados com Ultraturrax.....	52
Figura 15. Espectros de difração dos filmes nanocompósitos processados com os diferentes equipamentos. Concentração fixa de 7 g MMT/100 g gelatina. ...	53
Figura 16. Curvas de DSC dos filmes controle e nanocompósitos com diferentes concentrações de montemorilhonita (a) e detalhe de transições vítreas (entre 40 e 80 °C) (b).....	54
Figura 17. Curvas de DSC dos filmes controle e nanocompósitos processados com os diferentes equipamentos com concentração de 5 g MMT/100 g gelatina (a) e detalhe de transições vítreas (entre 40 e 80 °C) (b).....	55
Figura 18. Espectros de Infravermelho dos constituintes dos filmes.	56
Figura 19. a) Espectros de infravermelho dos filmes de controle e nanocompósitos processados com Ultrassom e diferentes concentrações de MMT. b) Detalhe do efeito do aumento na concentração de MMT nos espectros de infravermelho.....	57
Figura 20. a) Espectros de infravermelho dos filmes de controle e nanocompósitos processados com os diferentes equipamentos e 7 g MMT/100 g gelatina. b) Detalhe do efeito do método de dispersão de MMT nos espectros de infravermelho com 7 g MMT/100 g gelatina.	58
Figura 21. Efeito do método de dispersão e concentração de MMT sobre o ângulo de contato em filmes de gelatina.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potencial Zeta e tamanho da partícula de montemorilhonita dispersa em água, em função da concentração da argila.....	30
Tabela 2. Tamanho da partícula e potencial zeta de dispersões de montemorilhonita por equipamento e tempo de processo.....	32
Tabela 3. Valores de umidade, solubilidade, espessura e permeabilidade ao vapor de água dos filmes.	37
Tabela 4. Propriedades Mecânicas dos filmes.....	41
Tabela 5. Valores dos parâmetros de cor dos filmes.	44
Tabela 6. Brilho das duas faces dos filmes observados a 60°.	45
Tabela 7. Ângulo de contato na superfície dos filmes de controle e nanocompósitos com várias concentrações de MMT.....	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Estudo da dispersão de montemorilhonita em água	19
4.1.1. Efeito da Concentração de montemorilhonita em água.....	19
4.1.2. Efeito do tempo de processamento.....	19
4.1.3. Caracterização das dispersões de montemorilhonita em água	20
4.2. Produção de filmes	20
4.3 Caracterização dos filmes.....	22
4.3.1. Espessura e umidade.....	22
4.3.2. Permeabilidade ao vapor de água.....	23
4.3.3. Propriedades mecânicas: testes de tração e perfuração	23
4.3.4. Solubilidade em água.....	24
4.3.5. Cor e opacidade	24
4.3.6. Brilho a 60º.....	25
4.3.7. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);.....	25
4.3.8. Ângulo de contato	26
4.3.9. Microestrutura por MEV e AFM	26
4.3.10. Calorimetria Diferencial de Varredura	26
4.3.11. Difração de raios X.....	27
4.4. Análises estatísticas	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Características da montemorilhonita comercial	28
5.2 Características da dispersão de montemorilhonita em água	28

5.2.1. Efeito da Concentração de montemorilhonita	28
5.2.2. Efeito do método de dispersão e tempo de processamento de montemorilhonita.....	32
5.3 Características dos filmes nanocompósitos.....	36
5.3.1. Propriedades funcionais.....	36
5.3.2. Propriedades Mecânicas.....	39
5.3.3. Cor, opacidade e brilho a 60°	43
5.3.4. Microestrutura por Microscopia MEV e AFM	46
5.3.5. Difração de Raios-X	51
5.3.6. Propriedades térmicas – DSC.....	53
5.3.7. Espectroscopia de Infravermelho.....	55
5.3.8. Ângulo de Contato.....	58
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

O acúmulo de embalagens plásticas na natureza é uma situação cada vez mais preocupante no que diz respeito ao ambiente, e representa um desafio para a gestão dos resíduos em termos de tratamento e de reciclagem. Uma das alternativas possíveis, particularmente no setor de embalagens de alimentos, é o desenvolvimento de filmes a base de biopolímeros, que podem substituir os materiais sintéticos.

Segundo Gurgel et al. (2011), as recentes inovações na elaboração de filmes a partir de polímeros biodegradáveis têm trazido grandes avanços na área de embalagens para alimentos, e propõe uma classificação para esses polímeros: (a) agropolímeros divididos em polissacarídeos (ex.: amidos, produtos ligno-celulósicos, pectinas, etc.), e proteínas de origem animal (ex.: gelatina, colágeno, etc.) e vegetal (ex.: proteínas de soja, glúten, etc.); (b) biopolímeros obtidos por produção microbiana (ex.: PHA, PHB, PHBv); (c) polímeros sintetizados quimicamente usando monômeros produzidos a partir de recursos agropecuários (ex.: PLA); (d) e biopolímeros obtidos de fontes não renováveis.

Os principais biopolímeros utilizados na elaboração de filmes biodegradáveis são os polissacarídeos e as proteínas (ANDREUCCETTI; CARVALHO; GROSSO, 2010). As proteínas são macromoléculas particularmente interessantes porque possuem na sua estrutura até 20 monômeros diferentes (aminoácidos), com elevado potencial de interações intermoleculares (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011), das quais dependem as propriedades funcionais ou físicas (propriedades mecânicas, barreira aos gases, etc.) do material produzido.

Dentre as proteínas mais estudadas, a gelatina é reconhecida pela excelente propriedade filmogênica (ARVANITOYANNIS, 2002). No entanto, vários fatores como pH, tratamentos térmicos, adição de plastificantes, concentração iônica, concentração de proteína e a sua conformação molecular, podem afetar as propriedades dos filmes (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). De modo geral, os

filmes à base de gelatina apresentam boa resistência mecânica, porém reduzida barreira ao vapor de água.

Uma alternativa para melhorar as propriedades dos filmes à base de biopolímeros é a utilização de nanopartículas como reforço, produzindo-se assim, um tipo de material denominado nanocompósitos (LAGARÓN et al., 2005). Entende-se como nanocompósito o material em que o reforço apresenta pelo menos uma dimensão nanométrica (PAVLIDOU; PAPASPYRIDES, 2008).

A perfeita dispersão das nanopartículas numa matriz polimérica, ou biopolimérica, pode aumentar as propriedades mecânicas e térmicas, e melhorar a estabilidade à umidade dos materiais produzidos com aqueles biopolímeros (HEDENQVIST et al., 2006; KOLMAN et al., 2012; LAGARÓN et al., 2005; WEISS; TAKHISTOV; MCCLEMENTS, 2006). Portanto, a qualidade da esfoliação das nanopartículas na matriz biopolimérica é muito importante e justifica por si só, a necessidade de estudos da dispersão das nanopartículas em água, fundamental no processo de produção de filmes por “casting”.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto foram estudar a qualidade da dispersão de nanopartículas de montemorilhonita em água e analisar o efeito dessas dispersões sobre algumas propriedades físicas e funcionais de filmes de gelatina produzidos com elas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A gelatina é uma proteína capaz de formar uma rede tridimensional, com zonas de junções intermoleculares micro cristalinas, e a desidratação deste sistema pode produzir filmes quebradiços (ARVANITOYANNIS, 2002). Assim, a adição de um plastificante é necessária para impedir esse caráter quebradiço, possibilitando a formação de um material fino e flexível (SOBRAL et al., 2001).

Em função de sua excelente propriedade filmogênica, a gelatina tem sido amplamente utilizada em estudos sobre filmes comestíveis e/ou biodegradáveis. Denavi et al. (2009), Jongjareonrak et al. (2006), Sobral et al. (2001), Thomazine, Carvalho e Sobral (2005) e Vanin et al. (2005), entre outros, estudaram as propriedades físicas e funcionais de filmes a base de gelatina, em função da origem da gelatina, do tipo e concentração de plastificantes, das condições de secagem ou da espessura dos filmes.

De maneira geral, esses filmes apresentaram características típicas de filmes a base de biopolímeros com plastificantes higroscópicos, com sensibilidade às condições ambientais, notadamente à umidade relativa, e de boa resistência mecânica, e com alta elasticidade. Uma alternativa para se melhorar essas propriedades, e, sobretudo a questão da sensibilidade à umidade relativa ambiente, é o emprego de cargas de nanopartículas.

O emprego de nanopartículas na tentativa de se melhorar e/ou controlar as propriedades físicas e funcionais de filmes a base de biopolímeros, pode ser considerado como a mais recente alternativa do ponto de vista tecnológico. Dessa forma, pode-se considerar que os filmes nanocompósitos são, ou serão, materiais de embalagens flexíveis de última geração. Certamente por causa disso, as pesquisas sobre esse tema começaram recentemente.

As nanopartículas podem ser orgânicas, normalmente desenvolvidas a partir de biopolímeros, ou inorgânicas, como as de argilas (WEISS; TAKHISTOV; MCCLEMENTS, 2006). As argilas mais comuns são os filosilicatos ou esmectitas. A principal característica desse tipo de material é possuir uma estrutura cristalina em folhas de espessura nanométrica, conferindo uma

grande superfície específica. As esmectitas naturais, chamadas de montemorilhonita, são facilmente encontradas em qualquer parte do mundo e são as mais utilizadas em estudos sobre nanocompósitos à base de proteínas (ANGELLIER-COUSSY et al., 2008; BAE et al., 2009; CHEN; ZHANG, 2006; HEDENQVIST et al., 2006; TUNC et al., 2007).

As nanopartículas são estruturas que podem ser dispersas numa matriz polimérica, podendo ocorrer três tipos de dispersões (Figura 1). No caso particular de nanopartículas de argilas, as dispersões mais comuns são do tipo intercalação e esfoliação. A intercalação é o estado em que as cadeias do polímero estão intercaladas entre camadas da nanopartícula, resultando numa estrutura multicamada que se repete em escala nanométrica, enquanto na esfoliação, as camadas da nanopartícula se encontram completamente separadas e dispersas individualmente na matriz contínua do polímero (PAVLIDOU; PAPASPYRIDES, 2008).

Figura 1. Princípio de formação de nanocompósitos (baseado em Weiss, Takhistov e Mcclements, 2006).

Uma compreensão básica da interação molecular e estrutura em nanocompósitos de proteína são essenciais para a pesquisa fundamental e

desenvolvimento de materiais à base de proteínas (CHEN; ZHANG, 2006). Quando em suspensão, a montemorilhonita e em geral as nanoargilas tem um comportamento coloidal definido, com a formação de agregados aleatórios borda-face abaixo pH 7, e de estruturas orientadas face-face acima de pH 8. Segundo Tombácz e Szekeres (2004), o desenvolvimento de carga dependente do pH, é o que governa as interações das partículas.

Luckham e Rossi (1999) fizeram uma revisão completa sobre a interação de bentonita com polímeros, ressaltando os mecanismos de absorção e a interação formada entre eles, que pode ser de quatro formas: interações íon-dipolo, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e efeitos de entropia. Especificamente, a interação entre nanopartícula e proteína tem sido estudada em vários cenários, que tem levado a considerar que essas interações se dão por dois mecanismos principalmente; a interação eletrostática da superfície entre os domínios de positivos da proteína e as camadas de MMT carregadas negativamente, assim como a ligação de hidrogênio entre os grupos -NH e Si-O. Estas duas interações beneficiam a intercalação e a delaminação das camadas de MMT na matriz de proteína (CHEN; ZHANG, 2006).

A gelatina é um polieletrólito anfotérico com ponto isoelétrico de 5.05. As possíveis interações dependentes do pH estão representadas na Equação 1. Quando o $\text{pH} < \text{pI}$, as cadeias de gelatina com mais $-\text{NH}_3^+$ podem ligar-se com as lamínas de MMT através de interações eletrostáticas e intercalar-se entre os espaços interlamelares da MMT. Entretanto, quando o $\text{pH} > \text{pI}$, existe uma forte interação entre os grupos $-\text{COO}^-$ da gelatina com a MMT em meio alcalino, gerando a formação de ligações de hidrogênio (ZHENG et al., 2002; XU et al., 2006). Sendo assim, a MMT atua como agente físico de reticulação entre as moléculas de gelatina, resultando na melhoria das propriedades de nanocompósitos de gelatina-MMT (MU et al., 2012b).

Tunc et al. (2007) desenvolveram filmes de glúten (WG) carregados com montemorilhonita (MMT), em concentrações variando de 0 a 10% (MM/WG) e observaram que a permeabilidade ao vapor de água pôde, em princípio, ser controlada: a permeabilidade ao vapor de água foi alta, no caso do filme com baixa umidade ($\leq 2,5\%$), mas sofrendo uma redução por um fator 2 para umidades maiores ($\geq 5\%$), apesar do fato dessas nanopartículas não se apresentarem completamente esfoliadas na matriz de glúten.

Angellier-Coussy et al. (2008) também observaram importantes melhoras nas propriedades de filmes à base de glúten com montemorilhonita (0-5%), produzidos por termoprensagem. Hedenqvist et al. (2006) aplicaram a montemorilhonita para o desenvolvimento de filmes a base de isolado protéico de soro de queijo em blenda com o poli(vinilideno pirrolidona), mas observaram por microscopia eletrônica de varredura, que as nanopartículas não se encontravam perfeitamente esfoliadas.

Chen e Zhang (2006) também prepararam filmes compósitos a base de proteínas de soja com montemorilhonita e observaram que a estrutura desses nanocompósitos foi fortemente dependente da concentração das nanopartículas: em concentrações menores que 12% em relação à proteína, a montemorilhonita se encontrava altamente esfoliada em camadas de aproximadamente 1-2 nm, enquanto que a estrutura tipo intercalada predominou quando a concentração foi maior que 12%. A montemorilhonita também foi empregada no reforço de filmes a base de amido, sendo observada uma esfoliação não completa Cyras et al. (2008). E, Luecha, Sozer e Kokini (2010), trabalhando com filmes a base de zeína, observaram que houve problema de dispersão das nanopartículas a partir de 5% de montemorilhonita.

Zheng et al. (2002) prepararam filmes de gelatina incorporados com até 30% de montemorilhonita e concluíram que a dispersão da argila na matriz melhorou as propriedades térmicas e mecânicas dos filmes, que ao mesmo tempo dependem do pH da matriz. Segundo Li et al. (2003), que testaram o inchamento e absorção de solventes em filmes de gelatina e montemorilhonita e verificaram que o pH e as interações entre os componentes do filme são fatores que diminuíram a taxa de inchamento e a absorção máxima de solvente desses filmes. Posteriormente, Xu et al. (2006) determinaram por simulação molecular as formas de interação entre gelatina e montemorilhonita, sendo que a pH inferior ao ponto isoelétrico a interação é entre -NH_3^+ e as camadas de argila; e a pH superior ao ponto isoelétrico a interação ocorre entre -COO^- e os grupos hidroxilas da montemorilhonita.

Rao (2007) produziu filmes de gelatina e montemorilhonita com elevado módulo de Elasticidade e modelou os seus resultados, revelando que o estado de esfoliação e o teor de carga das partículas, entre outros parâmetros, têm grande influência sobre as propriedades dos filmes. Dessa forma, filmes de gelatina e montemorilhonita sem plastificante foram desenvolvidos por Martucci, Vázquez e Ruseckaite (2007), que estudaram por microscopia de força atômica o estado de esfoliação/intercalação das nanopartículas na matriz, determinando que concentrações elevadas ($>10\%$) de montemorilhonita favoreceu a aglomeração e reduziu as interações de estabilização entre gelatina e montemorilhonita.

Mais recentemente, Mu et al. (2012a) desenvolveram um método por congelamento/descongelamento para gerar filmes nanocompósitos de gelatina e montemorilhonita altamente esfoliada; nesses filmes, o efeito da temperatura favoreceu a formação da triple hélice da gelatina e a esfoliação da montemorilhonita na matriz formando filmes mais densos. Bae et al. (2009) reforçaram filmes a base de gelatina de peixe com montemorilhonita e observaram um aumento considerável da resistência mecânica (de 30 para 41 MPa) com a inclusão de 5% de nanopartículas, devido a boa esfoliação provocada por ultrassom. Como exemplo oposto, Sothornvit et al. (2010), trabalhando com isolado protéico de soja e uma montemorilhonita modificada, observaram que as propriedades mecânicas dos filmes diminuíram com a

presença da argila. Esses autores explicaram esses resultados pelas quantidades elevadas de nanopartículas e consideraram que não houve uma esfoliação completa com o tratamento de dispersão usado.

Certamente em função desses problemas, alguns estudos têm sido orientados a diminuir o tamanho e conhecer o comportamento das nanopartículas de argila em suspensão. Cadene et al. (2005), que trabalhando com dispersões de montemorilhonita de sódio, estudaram o tamanho e morfologia das partículas individuais por microscopia de força atômica e relataram que as nanopartículas apresentam uma distribuição do tamanho com duas populações, e tem uma forma aproximada a um tactoide elipsoidal. Poli et al. (2008), Mekhamer (2010) e Cao, Fasulo e Rodgers (2010) estudaram o efeito do ultrassom sobre o tamanho e relação de aspecto das partículas de argila e concluíram que o ultrassom permite uma boa esfoliação, induz a delaminação mantendo a estrutura e aumenta a área de superfície do material.

De maneira geral, a dispersão das nanopartículas em água (antes de misturar com o biopolímero) tem sido promovida com agitação magnética (Ultraturrax, agitador simples, etc.) (CHEN; ZHANG, 2006; HEDENQVIST et al., 2006; TUNC et al., 2007) ou por tratamento por ultrassom (BAE et al., 2009; CAO; FASULO; RODGERS, 2010; CYRAS et al., 2008; LUECHA; SOZER; KOKINI, 2010; POLI et al., 2008; SOTHORNVIT et al., 2010; TUNC et al., 2007). Assim, pode-se considerar que outras técnicas de dispersão das nanopartículas em água devem ser estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O biopolímero usado neste projeto foi gelatina de pele suína Bloom 270, adquirida da empresa Gelita South América (São Paulo, Brasil), o agente plastificante foi glicerol (Synth). A nanopartícula usada foi a montemorilhonita comercial ("Nanomer® clay", PGV, Sigma).

O estudo foi dividido em duas partes, na primeira (4.1), foi analisado o comportamento das dispersões de montemorilhonita em água após processamento com diferentes equipamentos. A segunda parte do estudo (4.2) foi dedicada a estudar as propriedades dos filmes produzidos com as dispersões de montemorilhonita processada com os diferentes equipamentos, sendo, Ultraturrax UT, Ultrassom de ponta US e Moinho coloidal MC; variando a concentração de montemorilhonita entre 1 - 7 g/100 g de gelatina.

4.1 Estudo da dispersão de montemorilhonita em água

4.1.1. Efeito da Concentração de montemorilhonita em água

As dispersões de montemorilhonita (MMT) foram processadas com homogeneizador mecânico (UT) Ultraturrax (T25, IKA) operando a 20.000 RPM, com elemento dispersor S25-18G e o tempo de processo foi fixado em 30 min. Usou-se um tubo de vidro de diâmetro 5 cm e comprimento de 25 cm com fundo esférico. A concentração de montemorilhonita variou entre 0,05 – 1 g/100 g de água.

4.1.2. Efeito do tempo de processamento

Avaliou-se a dispersão de montemorilhonita em água usando diferentes equipamentos, como sendo Agitador magnético AM (Lab disk, IKA), Ultraturrax UT (T25, IKA), Ultrassom de ponta US (750W, Sonics), Moinho coloidal MC (tipo SPEX), e Moinho de bolas MB (TE 500 1, TECNAL). Os tempos de

processo foram fixados para 15 e 30 min, com exceção do moinho de bolas onde o tempo foi de 120 e 300 min e o Agitador magnético com tempo de 60 min. A concentração de montemorilhonita foi fixada para 1 g/100 g de água.

Após o processamento para dispersão da MMT em água, essas foram mantidas em repouso por no mínimo 18 h para permitir a hidratação das nanopartículas. Na sequência, foram realizadas as análises de caracterização. Finalmente, as condições que geraram menor tamanho da partícula para cada equipamento foram usadas na produção de filmes.

4.1.3. Caracterização das dispersões de montemorilhonita em água

As dispersões foram analisadas para determinação das dimensões características e do potencial Zeta das nanopartículas, utilizando-se um medidor de tamanho da partícula por espalhamento de luz quase-elástico e de potencial Zeta 'Zeta Plus' (Brookhaven Instruments Company, EUA) (CHEN; ZHANG, 2006).

Além disso, para a avaliação da qualidade da dispersão das nanopartículas, as dispersões foram aplicadas sobre porta amostras, devidamente preparadas, e desidratadas em estufa com circulação de ar, a 30°C. Esses porta amostras foram analisados por microscopia eletrônica de varredura, utilizando-se um microscópio Hitachi (modelo TM3000, Tokyo, Japão) com feixe a 15 kV, e por microscopia de força atômica, utilizando-se um Microscópio de Força Atômica NT-MDT (modelo NTEGRA PRIMA) em modo de contato intermitente com cantilever macio (Constante de mola: 5 N/m; Freq. de ressonância: 150KHz) (VILLALOBOS et al., 2005).

4.2. Produção de filmes

Os filmes foram produzidos pela técnica de "casting", com 5 g de gelatina/100 g de solução filmogênica e 30 g de glicerol/100g de gelatina. Filmes de gelatina sem nanopartícula foram considerados como controle. A concentração de nanopartículas foi de 1, 3, 5 e 7 g de MMT/100g de gelatina. Para a dispersão

das nanopartículas em água, foram usadas as condições que geraram menor tamanho da partícula na primeira parte do estudo.

Por outro lado, a gelatina foi hidratada em água destilada a 25 °C durante 30 minutos e solubilizada em banho termostático a 70 °C por 15 minutos, seguidos de 5 minutos em banho ultrassônico a 60 °C para remoção de bolhas de ar, e por mais 13 minutos em banho termostático a 70 °C. Na sequência, para preparar os filmes controle, glicerol e água destilada foram adicionados na gelatina. Para preparar os filmes nanocompósitos, foram adicionados o glicerol e a dispersão aquosa de montemorillonita nas concentrações indicadas anteriormente. O peso de cada solução formadora de filme foi corrigido com água destilada. Após, a solução foi homogeneizada e mantida por 10 minutos em banho ultrassônico a 60 °C.

Na sequência, a solução foi resfriada até 26 °C em banho termostático, e espalhada em placas de acrílico (26cm x 30cm x 0,5cm) com um aplicador automático de filmes (TKB Erichsen, modelo Speed II) (Figura 2), acoplado a um banho ultratermostatizado (Marconi, modelo MA 184/20) para controle da temperatura da superfície de espalhamento, que foi mantida a 20 °C. As temperaturas da superfície de espalhamento e das soluções formadoras de filmes no momento do espalhamento foram baseadas nos estudos de Coronado-Jorge (2012). A altura do dispositivo do aplicador foi mantida em 1,5 mm e a velocidade de espalhamento foi fixada em 35mm/segundos. Os filmes foram obtidos após secagem em estufa com circulação de ar forçado (Marconi, modelo MA 035), a 30 °C por 24 horas.

Figura 2. Aplicador automático de filmes do Laboratório de Tecnologia de Alimentos.

4.3 Caracterização dos filmes

Os filmes de gelatina e nanocompósitos produzidos foram caracterizados, após o acondicionamento em dessecadores com NaBr (58 %HR) por 7 dias, para determinação das seguintes propriedades:

4.3.1. Espessura e umidade

A espessura foi determinada com um micrômetro digital (Modelo, Mitutoyo) com sensor de ponta ($\pm 0,001$ mm), analisando 10 pontos em cada filme. A espessura foi expressa em mm, calculada como a média de 10 medições.

A umidade do material foi determinada gravimetricamente por secagem em estufa durante 24 horas (SOBRAL et al., 2001), a 105 °C, e calculada com a Equação 2:

$$Umidade (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100 \quad (2)$$

Onde m_i é o peso inicial, m_f , o peso final do filme, em gramas.

4.3.2. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada gravimetricamente de acordo com a norma ASTM E96 (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). O filme foi fixado em célula de alumínio, contendo sílica gel (UR ~ 0%; pressão de vapor ~ 0 Pa), com área de permeação de 32,17 cm². Essa célula foi acondicionada em dessecador contendo água destilada (UR=100%; pressão de vapor de 2642 Pa) e mantida em ambiente controlado (estufa BOD TE 390, Tecnal), a 25°C. O ganho de peso do conjunto foi determinado em balança semi-analítica (Marte, AS2000), a cada 24 horas durante 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada com a Equação 3.

$$P_v = \frac{G}{t} \frac{e}{A(P_1 - P_2)} \quad (3)$$

Onde G/t é a pendente da curva ganho de massa vs. tempo (g/h); e, a espessura do filme (mm); A, área de permeação do filme (m²); e (P₁-P₂) a diferença de pressão de vapor entre as superfícies do filme (2642 Pa).

4.3.3. Propriedades mecânicas: testes de tração e perfuração

Os testes de tração foram realizados de acordo com a norma ASTM D882, os filmes foram cortados em tiras de 15mmx100mm e fixados no Texturômetro TA.XT icon (Stable Micro Systems, Surrey, U.K.) com separação inicial do suporte de 50 mm. A velocidade de tração foi 0,9 mm/s (THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2005). Os parâmetros estudados foram a tensão na ruptura e a elongação na ruptura, obtidos diretamente da curva de tensão vs deformação, e o módulo de elasticidade determinado como a pendente da parte linear da mesma curva, esses parâmetros foram calculados pelo software do equipamento (Exponent Lite Express, v 4,0,13,0).

Os testes de perfuração foram conduzidos segundo a norma ASTM F1306. As amostras foram fixadas em uma célula com diâmetro de 5,3 cm e perfuradas por uma sonda de 3 mm de diâmetro com velocidade de 1mm/s (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). Foram determinadas a força e deformação na perfuração diretamente das curvas pelo software do equipamento (Exponent Lite Express, v 4,0,13,0).

4.3.4. Solubilidade em água

Filmes cortados em forma de discos de 2 cm de diâmetro, foram imersos em água destilada e mantidos sob agitação em mesa agitadora orbital (MA-141, Marconi) por 24 horas a 25 °C. Posteriormente, a amostra não solubilizada foi colocada em estufa a 105 °C por 24 horas para determinação da umidade (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). A solubilidade em água, expressa como matéria seca dissolvida, foi calculada com a seguinte equação 4:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{m_{si} - m_{sf}}{m_{si}} \times 100 \quad (4)$$

Onde m_{si} é o peso inicial da matéria seca do filme, m_{sf} , o peso final da massa seca do filme, em gramas.

4.3.5. Cor e opacidade

A cor dos filmes foi determinada de acordo a norma ASTM D2244 (SOBRAL et al., 2001), utilizando-se um colorímetro HunterLab (Miniscan XE), operando com iluminante D65, ângulo de 10° e célula de medida com abertura de 30 mm. Foram usados os parâmetros de cor CIELab, sendo L^* , variando de 0 a 100 (preto a branco); a^* , do verde (-) ao vermelho (+); b^* , do azul (-) ao amarelo (+). Os parâmetros L^* , a^* e b^* das amostras foram determinados sobrepondo-se o filme sobre uma placa branca padrão e a diferença total de cor (ΔE^*) foi calculada com a Equação 5 (VANIN et al., 2005).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (5)$$

Onde ΔL^* , Δa^* e Δb^* é a diferença entre os valores da amostra e o padrão, obtidos para cada parâmetro.

A opacidade dos filmes foi determinada de acordo com Sobral (2000), utilizando-se o mesmo colorímetro e o programa Universal Software 3.2 (Hunterlab Associates Laboratory). A opacidade ($Y=Y_p/Y_b$) da amostra foi calculada como a relação entre a opacidade da amostra colocada sobre o padrão preto (Y_p) e a opacidade da amostra colocada sobre o padrão branco (Y_b).

4.3.6. Brilho a 60°

O brilho dos filmes nanocompósitos foi determinado utilizando-se um Glossímetro Rhodopoint NGL 20/60, no ângulo de 60°, de acordo com a norma ASTM D2457 (VILLALOBOS et al., 2005). Foram analisadas 10 posições aleatórias na superfície de secagem, e na superfície em contato com a placa. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em unidades de brilho GU.

4.3.7. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);

As análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas usando um espectrofotômetro Spectrum-One (Perkin-Elmer), de acordo com Vicentini et al. (2005). Foram analisadas amostras dos filmes, e da gelatina e montemorillonita em pó. Foram realizadas 20 varreduras na faixa espectral de 650 a 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} . Os espectros de varredura foram coletados e analisados com o programa FTIR Spectrum Software (Perkin-Elmer).

4.3.8. Ângulo de contato

O ângulo de contato foi estudado usando um tensiômetro ótico (Optical tensiometer, Finlândia). Os filmes foram fixados no equipamento e uma gota de água destilada foi colocada sobre o filme com uma seringa de pistão automático e fotografado instantaneamente, de acordo com a norma ASTM D7334 (CORONADO JORGE, 2012). Foi analisada a superfície do filme que ficou em contato com o ar de secagem. O ângulo formado entre a superfície e a tangente à gota, foi calculado com o software Attension Theta lite optical tensiometer. As leituras foram realizadas em triplicata.

4.3.9. Microestrutura por MEV e AFM

A microestrutura (superficial e interna) dos filmes nanocompósitos e de controle foi analisada usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (TM30000, Hitachi) a 5 e 15kV, de acordo com Lu, Weng e Cao (2006). Préviamente ao teste, as amostras foram condicionadas em dessecadores contendo sílica gel, sob vácuo. Para a análise da microestrutura interna, os filmes foram criofraturados, após imersão em nitrogênio líquido. As imagens foram feitas em posições aleatórias dos filmes com amplificação de 2000x.

Também, foram realizadas análises com o microscópio de força atômica AFM (NT-MDT model NTEGRA PRIMA) em modo intermitente para determinar a topografia e rugosidade da superfície dos filmes. As análises foram realizadas em áreas de 25umx25um em posições aleatórias, e a rugosidade foi estimada por software de análise de imagens (Image analysis Nova Px).

4.3.10. Calorimetria Diferencial de Varredura

As amostras dos filmes de controle e nanocompósitos foram analisadas para determinação de algumas propriedades térmicas com um calorímetro (DSC TA2010, TA Instruments). As amostras foram pesadas em cápsulas de alumínio, seladas hermeticamente e aquecidas a uma taxa de 5°C/minuto, entre -50 e 200°C em atmosfera inerte (45 mL/minuto de N₂) (SOBRAL;

HABITANTE, 2001; GONTARD; RING, 1996). A referência foi uma cápsula vazia. As propriedades de interesse foram calculadas de acordo com a norma ASTM D3418. A temperatura de transição vítrea (T_g) foi calculada como o ponto de inflexão da linha de base, a temperatura de fusão calculada como o pico endotérmico na curva de fluxo do termograma, e a entalpia de fusão como a área sob a curva do pico de fusão; utilizando-se nos três o programa Universal Analysis V1.7F (TA Instruments).

4.3.11. Difração de raios X

A difração de raios X foi usada para estudar a estrutura cristalográfica dos filmes controle nanocompósitos, e das amostras de montemorilhonita em pó, usando um difratômetro de raios-X (RU200B, Rigaku Rotaflex), conforme descrito por Angellier et al. (2006). Foi feita uma varredura entre $2\theta = 3^\circ - 60^\circ$, com aumentos de $0,1^\circ$.

4.4. Análises estatísticas

Em 4.2, os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tuckey para verificação de diferenças significativas ($\alpha=5\%$) entre resultados, em função da concentração de nanopartículas e em função do tempo de dispersão. E, em 4.3, os dados de propriedades físicas e funcionais dos filmes nanocompósitos foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tuckey (two way), para verificação de diferenças significativas ($\alpha=5\%$) entre resultados, em função da concentração de nanopartículas e do equipamento usado para dispersá-las. Todas as análises foram realizadas com o programa SAS (SAS system, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características da montemorilhonita comercial

A análise de morfologia por microscopia eletrônica de varredura da montemorilhonita (MMT) em pó (Figura 3) permitiu observar que a MMT comercial se apresentava em forma de aglomerados esféricos, com diâmetro que variava entre 5 e 30 μm , similar ao observado por Tran e James (2012). Ou seja, o produto comercial se apresentava em dimensões micrométricas e sua aplicação como reforço em filmes exige sua dispersão, que estejam em dimensões nanométricas.

Figura 3. Microscopia Eletrônica da montemorilhonita em pó comercial.

5.2 Características da dispersão de montemorilhonita em água

5.2.1. Efeito da Concentração de montemorilhonita

Inicialmente, foi avaliado o efeito da concentração de montemorilhonita sobre o tamanho da partícula e potencial Zeta das dispersões em água, após processamento com ultraturrax. Em todos os testes realizados, os resultados de distribuição do tamanho da partícula por espectroscopia de correlação de

fótons apresentaram um comportamento bimodal (Figura 4a). A população da partículas presente na distribuição do tamanho entre 700-1000 nm pode ter sido consequência de aglomerados de montemorilhonita, enquanto a população de menor tamanho, entre 200-500 nm, pode ser considerada como consequências das nanopartículas na forma de lamelas, ou seja, ainda não completamente dispersa. Este resultado foi similar ao observado por Cadene et al. (2005).

Figura 4. Distribuição do tamanho da partícula (a), e curvas de Potencial Zeta (b) das dispersões de montemorilhonita (MMT) em água em função da concentração de MMT.

A Figura 4b apresenta as curvas típicas de potencial Zeta das dispersões de montemorilhonita em água com pH 9. Pode-se observar nestas curvas, maior intensidade do sinal na região de -31 a -35 mV indicando o caráter negativo das partículas, caráter que é mantido na faixa inteira de pH (ZARZYCKI; SZABELSKI; PIASECKI, 2007).

Os resultados das determinações de tamanho da partícula, calculadas considerando o modelo D[4,3], e de potencial Zeta estão apresentados na Tabela 1. O tamanho médio das partículas variou entre 418 e 435 nm, independentemente da concentração de MMT na dispersão, não sendo observada diferença significativa ($p>0,05$) entre os valores obtidos para as diferentes concentrações de MMT. Estes resultados coincidem com o reportado por Cadene et al. (2005), que trabalhando com montemorilhonita de sódio em concentrações inferiores a 4%, verificaram que a concentração não teve um efeito significativo no tamanho das partículas.

Tabela 1. Potencial Zeta e tamanho da partícula de montemorilhonita dispersa em água, em função da concentração da argila.

Concentração (%)	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)
0,05	434,5 $\pm$ 17,7 ^a	-32,2 $\pm$ 1,4 ^a
0,15	417,7 $\pm$ 14,2 ^a	-33,6 $\pm$ 1,7 ^a
0,25	425,1 $\pm$ 12,5 ^a	-33,2 $\pm$ 1,6 ^a
0,35	424,3 $\pm$ 16,9 ^a	-33,5 $\pm$ 2,1 ^a
1,00	428,3 $\pm$ 10,4 ^a	-33,0 $\pm$ 2,5 ^a

Médias com a mesma letra em uma coluna não são diferentes estatisticamente.

Teoricamente, as montemorilhonitas individuais deveriam ter dimensões médias inferiores a 100 nm, já que as interfaces entre nanopartícula e matriz são as que dominam as propriedades dos compósitos devido ao pequeno tamanho das partículas e aumento da área superficial (ASHTON, 2010). Assim,

pode-se considerar que o tratamento realizado nesta etapa não foi capaz de provocar a completa dispersão das nanopartículas.

A estabilidade das dispersões de nanopartículas é dada pela força das interações partícula/partícula e partícula/solvente e pode ser avaliada por medidas de potencial Zeta (AMIRI; ØYE; SJÖBLOM, 2011). Quando dispersa em um solvente, o inchamento (ou absorção do solvente) das nanoargilas depende de fatores como pH, temperatura, pressão, constante dielétrica do meio, polaridade do solvente. Assim, esses fatores podem influenciar na estabilidade das nanopartículas em suspensão, e, conseqüentemente influenciam na interação partícula-partícula, que podem agregar-se em tamanhos diferentes (DEIBER; PEIROTTI; OTTONE, 2011). Nas condições deste estudo, o Potencial Zeta das dispersões de MMT manteve-se invariável ($p > 0,05$) em função da concentração da argila (Tabela 1), mantendo-se em torno de -33 mV. Valores similares de potencial Zeta (-35,5 mV) foram observados por Ünlü, Günister e Atici (2012) trabalhando com dispersões de 0,5 a 1,2% de montemorilhonita de sódio em pH 10. Entretanto, os valores encontrados neste trabalho foram maiores que os obtidos por Chen e Zhang (2006), que trabalhando em dispersões de 4 a 24% (baseado no peso do polímero) de montemorilhonita e pH 7-8, observaram um valor de potencial Zeta em torno de -25,2 mV. Tantra, Schulze e Quincey (2010) e Tunç e Duman (2008), estudando dispersões de diferentes tipos de nanopartículas e montemorilhonita de sódio, observaram que a concentração das nanopartículas não exerceu efeito sobre o tamanho das partículas, nem sobre o potencial Zeta.

Pode-se considerar que a concentração de montemorilhonita não interferiu na estabilidade da dispersão em água para o pH 9 dentro da faixa de concentração usada.

5.2.2. Efeito do método de dispersão e tempo de processamento de montemorilhonita

Visando diminuir o tamanho de aglomerados e partículas, a montemorilhonita foi dispersa em água usando vários equipamentos com diferentes princípios de funcionamento e os resultados de tamanho da partícula e potencial zeta estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Tamanho da partícula e potencial zeta de dispersões de montemorilhonita por equipamento e tempo de processo

Equipamento	Tamanho (nm)		Pontencial Zeta (mV)	
AGITADOR	501,5±27,6		-34,3±3,1	
COMB	317,3±4,6		-35,2±0,6	
	15MIN	30MIN	15MIN	30MIN
UT	426,5±17,7	377,7±9,6	-51,8±6,7	-53,8±8,1
US	316,5±8,6	289,6±4,0	-32,6±1,4	-40,2±13,8
MC	418,3±13,4	395,7±5,5	-42,5±8,8	-47,7±11,4

MC: Moinho Coloidal; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; COMB: Ultraturrax+Ultrassom.

A dispersão da MMT comercial em água por agitação magnética, isto é, de fraca tensão de agitação, provocou certo rompimento da estrutura do produto comercial (Figura 3), produzindo nanopartículas com dimensão média de 501,9±27,6 nm, um valor típico para este tipo de nanoargila, segundo Tombácz e Szekeres (2006), e potencial Zeta igual a -34,3±3,1 mV.

O homogeneizador mecânico UT gerou uma redução de até 24,68% no tamanho das partículas, quando comparado com o agitador magnético; essa diminuição no tamanho das partículas deve ter sido consequência da alta tensão de cisalhamento gerada pelo equipamento, que reduziu o tamanho, rompendo os aglomerados (Figura 3). Valores similares foram reportados por Cao, Fasulo e Rodgers (2010), obtendo um tamanho da partícula inferior a 450 nm em dispersões aquosas de montemorilhonita processadas com

homogeneizador mecânico com sistema estator/rotor a 12000 rpm durante 8 horas.

Por outro lado, as dispersões de montemorilhonita processadas com o Processador Ultrassônico apresentaram uma redução do tamanho da partícula de até 42,25%, resultado similar ao obtido pelo método combinado, essa redução pode ser creditada ao fenômeno de cavitação que ocorre no sistema devido à vibração das moléculas. Essa alta energia favorece a colisão das partículas e a consequente destruição de aglomerados. Valores similares podem ser observados em Poli et al. (2008), que também trabalharam com ultrassom e períodos de tempo similares ao deste estudo.

Também foi usado o moinho de alta energia para dispersar a montemorilhonita em água, favorecendo a diminuição no tamanho da partícula em até 21,10%, quando comparado com a dispersão feita com agitador magnético. Essa diminuição deve ter sido resultado da alta velocidade de colisão gerada pelo equipamento, em que o movimento "vai-e-vem" é combinado com movimentos laterais e com cada oscilação do frasco, a inércia das bolas faz com que elas impactam contra a amostra e as paredes e fundo do frasco rompendo os aglomerados.

Neste estudo, foram testados tempos de processo de 15 e 30 minutos em cada equipamento, esse aumento no tempo teve como consequência a diminuição do tamanho das partículas de montemorilhonita como apresentado na Tabela 2. No caso do homogeneizador mecânico UT, as partículas apresentaram um tamanho de 426,5 nm quando processadas por 15 minutos, e experimentaram uma redução de 11,44% no tamanho quando aumentou para 30 minutos. Resultados similares foram obtidos para o processador ultrassônico e para o moinho coloidal, nos quais o aumento do tempo de processo de 15 min para 30 min provocou redução de 8,5% e 5,4%, respectivamente, no tamanho das partículas de montemorilhonita (Tabela 2).

Por outro lado, o potencial zeta das dispersões processadas com agitação magnética foi de -34,3 mV, e aumentou ($p < 0,05$) para valores mais negativos quando foram usados equipamentos mais robustos para processá-las. Entre os equipamentos usados também houve variação no potencial zeta, ou seja, este

parâmetro foi maior (valor absoluto) quando foi usado o Ultraturrax (-53,8 mV) do que quando as dispersões foram processadas com ultrassom (-40,2 mV). Sendo que as dispersões processadas com moinho coloidal ficaram com valores intermediários (Tabela 2). No entanto, o potencial zeta das partículas de montemorilhonita dispersas em água não foi influenciado ($p > 0,05$) pelo aumento no tempo de processo nesses equipamentos.

A presença das nanopartículas em forma de aglomerados pode ser evidenciada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 5a-5d), onde observou-se partículas com forma elipsoidal de tamanho inferior a 1000 nm, apoiando os resultados obtidos nos testes anteriores. Observou-se ainda que as partículas formaram aglomerados e as lamelas individuais encontram-se orientadas em todos os ângulos possíveis dentro desses aglomerados, não sendo possível ressaltar partículas individuais. Quando dispersa num solvente, o inchaço das nanoargilas depende de vários fatores como o pH, temperatura, pressão, constante dielétrica do meio, etc. Estes fatores afetam a estabilidade das nanopartículas em suspensão, e consequentemente, influenciam as interações entre as partículas que podem formar agregados de diferentes tamanhos (DEIBER; PEIROTTI; OTTONE, 2011).

Figura 5. Microscopia Eletrônica da montemorilhonita após o processo de dispersão em água (a) Ultraturrax (b) Moinho coloidal (c) Ultrassom (d) Comb: Ultraturrax+ Ultrassom, e organização das camadas em um filme de argila após crio fratura (e).

Algumas dispersões de MMT forma colocadas em placas de petri e secadas em estufa formado um filme de montemorilhonita. Micrografias desse filme de montemorilhonita, após crio fratura, permitiram observar a organização das camadas da partículas conforme vão se depositando na placa (Figura 5e).

As dispersões de nanopartículas desidratadas convenientemente e também foram analisadas por microscopia de força atômica, comprovando-se a

presença de aglomerados (Figura 6a). Além disso, observou-se o um aglomerado individual das partículas, sem um formato definido, com dimensão maior de cerca de 300nm (Figura 6b), similar ao observado por Cao, Fasulo e Rodgers (2010) após o processamento de cloisite (outra nanoargila) com homogeneizador mecânico.

Figura 6. Micrografia das partículas por microscopia de força atômica após o processo de dispersão em água (a), e detalhe de uma partícula individual (b).

5.3 Características dos filmes nanocompósitos

5.3.1. Propriedades funcionais

Os filmes de gelatina e nanocompósitos produzidos neste trabalho apresentaram-se de forma geral transparentes, brilhantes e uniformes na superfície. Os Resultados de espessura, umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água desses filmes estão apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que a montemorilhonita provocou um ligeiro aumento ($p < 0,05$) na espessura dos filmes quando a concentração era de 7 g de MMT/100 g de gelatina, sugerindo que as nanopartículas devem ter influenciado a densidade dos nanocompósitos. Este efeito foi evidenciado de forma mais clara no caso dos filmes UT e do método combinado.

Tabela 3. Valores de umidade, solubilidade, espessura e permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

C_{MMT} (g/100 g gelatina)	1	3	5	7
Umidade (%)				
CONTROLE	17,22±0,6			
MC	16,36±0,4Aa	15,2±0,7Aa	16,5±2,2Aa	15,9±0,6Aab
UT	13,64±1,3Ab	14,31±0,4Aa	15,6±1,2Aa	15,71±0,3Aab
US	15,81±1,4Aab	14,79±0,2Aa	14,07±1,7Aa	16,25±0,4Aa
COMB	15,62±0,2Aab	14,82±0,2Ba	15,54±0,2Aa	14,98±0,4ABb
Solubilidade (%)				
CONTROLE	36,29±3,4			
MC	34,77±1,5Aa	32,31±1,6ABa	31,05±1,4ABa	29,91±1,1Ba
UT	35,63±1,0Aa	33,03±1,0Ba	26,95±0,6Cb	28,14±0,7Cab
US	34,95±0,9Aa	31,38±0,4Ba	29,78±0,6Ba	26,51±1,0Cbc
COMB	28,13±1,7Ab	27,84±0,2Ab	22,15±0,6Cc	24,68±0,4Bc
Espessura (µm)				
CONTROLE	66,73±3,7			
MC	66,79±0,6ABa	71,95±3,3Aab	64,88±1,6Ba	68,75±2,3Abc
UT	65,30±4,0Ba	67,27±2,2Bb	68,22±2,5Ba	77,06±2,4Ab
US	77,62±2,5ABa	80,70±6,8Aa	67,06±5,3Ba	77,63±2,0ABb
COMB	69,67±9,9Ba	68,33±3,8Bb	73,67±3,5Ba	89,33±3,1Aa
PVA (g.mm/cm².h.Pa)				
CONTROLE	4,33±0,2			
MC	4,22±0,1Aba	4,51±0,2Aa	3,81±0,1Ba	4,33±0,2Aa
UT	4,17±0,2Ba	4,32±0,2ABa	3,98±0,1Ba	4,80±0,2Aa
US	4,82±0,3Aa	4,94±0,4Aa	4,56±0,1Aa	5,02±0,2Aa
COMB	5,18±0,8Aa	4,32±0,3Aa	4,52±0,7Aa	5,02±0,5Aa

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente. Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente. MC: Moinho Coloidal; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; COMB: Ultraturrax+Ultrassom; PVA: permeabilidade ao vapor de água.

A variação de espessura verificada neste estudo, até 18% no caso do método combinado, foi maior do que a reportada por Coronado Jorge (2012), que trabalhando com filmes de gelatina com 10% de MMT, observou aumento de 11% na espessura em relação ao filme sem MMT.

Em relação à umidade dos filmes, observou-se que a MMT afetou levemente a higroscopicidade do material, sendo que a presença da MMT diminuiu ($p < 0.05$) a quantidade de água presente nos nanocompósitos quando comparado com o filme controle. Assim, os filmes nanocompósitos com as diferentes concentrações de montemorilhonita absorveram a mesma quantidade de água no acondicionamento em NaBr (58% UR), devido à natureza higroscópica dos componentes, gelatina e glicerol, este último, altamente higroscópico (SOBRAL et al., 2001; THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2005). Muito possivelmente, a montemorilhonita não influenciou a umidade dos nanocompósitos por estar em baixa concentração no filme. Para cada 100g de filme (com umidade de cerca de 15%), a quantidade de MMT pode ser calculada como sendo 4,6g, que é muito pouco em relação aos produtos higroscópicos (gelatina e glicerol). Da mesma forma o método de dispersão usado para processar as nanopartículas não influenciou de forma clara na umidade dos filmes.

Por outro lado, observou-se diferença significativa na solubilidade dos filmes em função da presença da MMT (Tabela 3). Assim, os filmes nanocompósitos foram até 39% menos solúveis em água devido à presença da montemorilhonita. Entretanto, a solubilidade dos nanocompósitos variou com as diferentes concentrações de MMT usadas, sendo que os filmes com 5 e 7 g de MMT/g de gelatina foram menos solúveis em água. Quanto ao método de dispersão, os filmes processados com o método combinado pareceram ter os valores mais baixos de solubilidades para todas as concentrações de MMT.

De forma geral, a montemorilhonita não modificou a permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes. A PVA dos filmes nanocompósitos com 5 g de MMT/100 g de gelatina foi ligeiramente inferior quando comparado com os filmes de controle, especialmente no caso do MC e UT, onde essa redução foi em torno de 10%; entretanto, essa diferença pode ser desprezada, em termos tecnológicos, considerando-se os filmes como bastante permeáveis ao vapor

de água, embora a PVA determinada neste trabalho tenha sido inferior que a reportada por Bae et al. (2009), que trabalhou com filmes de gelatina de peixe e montemorilhonita. Era de se esperar que a presença da MMT, bem dispersa na matriz biopolimérica, reduzisse a PVA, uma vez que ela aumentaria a tortuosidade do sistema. Sothornvit et al. (2010) observaram que em filmes de isolado protéico de soro de leite reforçados com montemorilhonita diminuiu a permeabilidade ao vapor de água com o aumento da concentração da MMT.

5.3.2. Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram analisadas por testes de tração e perfuração. As curvas representativas desses testes são apresentadas nas Figuras 7 e 8, onde é possível se observar que a MMT não alterou o comportamento das curvas mecânicas. Os valores das propriedades mecânicas, calculadas a partir das respectivas curvas mecânicas, estão apresentados na Tabela 4.

Figura 7. Curvas típicas dos testes de tração para os filmes de gelatina e nanocompósitos variando a concentração de MMT.

Figura 8. Curvas típicas dos testes de perfuração para os filmes de gelatina e nanocompósitos.

Pôde-se observar, em ambos os testes, que a MMT apresentou um efeito positivo na resistência dos filmes, ou seja, provocou aumento ($p < 0,05$) tanto na tensão na ruptura, quanto na força na perfuração (Tabela 4), indicando que a montemorilhonita agiu como reforço, assim como também afetou a rigidez do material, uma vez que houve efeito ($p > 0,05$) no módulo de Elasticidade. Resultados similares foram obtidos por outros pesquisadores (BAE et al., 2009; GIMÉNEZ et al., 2012; LUECHA; SOZER; KOKINI, 2010; TUNC et al. 2007), que, trabalhando com diferentes proteínas, conseguiram aumentar a resistência dos filmes, quando aumentaram a concentração de argila até pelo menos 5% (baseado no peso da proteína).

Tabela 4. Propriedades Mecânicas dos filmes.

C_{MMT} (g/100 g gelatina)	1	3	5	7
Tensão na ruptura (MPa)				
CONTROLE	22,62±3,4			
MC	26,98±3,0Ca	28,79±0,9BCb	35,14±0,9Aab	32,26±1,2ABb
UT	29,61±2,3Ba	30,66±1,8Bab	40,20±3,2Aa	25,29±2,6Bc
US	30,57±0,9Aa	33,68±0,3Aa	32,40±1,6Ab	24,97±1,7Bc
COMB	27,72±1,1Ba	29,58±1,5Bb	37,67±2,3Aab	36,62±0,3Aa
Elongação na ruptura (%)				
CONTROLE	74,61±6,1			
MC	73,80±6,3Ba	71,03±8,7Ba	56,61±8,1Aa	70,99±5,2Ba
UT	58,40±1,6Ab	58,77±3,2Aab	54,04±2,7Aa	63,42±9,6Aa
US	65,82±4,5Aab	59,48±2,2Aab	64,18±10,8Aa	62,48±8,6Aa
COMB	57,29±6,5Ab	53,28±3,4Ab	44,90±6,5Aa	60,49±8,5Aa
Módulo de elasticidade (MPa)				
CONTROLE	2,97±0,4			
MC	3,04±0,4Bb	3,21±0,2Bc	5,36±0,5Aa	3,93±0,3Bb
UT	4,22±0,3Ba	4,17±0,2Bb	6,89±1,8Aa	3,35±0,1Bb
US	3,98±0,3Aba	4,78±0,1Aa	4,33±0,8Aba	3,38±0,2Bb
COMB	3,82±0,2Bab	4,28±0,2ABb	6,43±1,5Aa	5,15±0,7Aba
Força na perfuração (N)				
CONTROLE	13,78±1,2			
MC	15,79±1,5Ab	16,72±0,8Ab	17,67±1,6Aa	17,58±0,6Aa
UT	16,10±0,7Bb	18,14±0,5ABb	19,72±1,0Aa	16,98±0,9Ba
US	21,15±0,9Aa	21,27±0,7Aa	19,44±0,6Aba	18,25±0,5Ba
COMB	16,50±1,8Ab	17,63±0,1Ab	19,29±0,6Aa	19,46±1,8Aa
Deformação na perfuração (%)				
CONTROLE	4,77±0,4			
MC	4,80±0,4Aba	5,22±0,2ABa	4,45±0,4Bab	5,48±0,4Aa
UT	4,91±0,2Ba	4,98±0,1Ba	5,04±0,1Ba	5,90±0,1Aa
US	4,79±0,3Ba	4,87±0,3Ba	4,98±0,3Ba	5,98±0,1Aa
COMB	4,30±0,1Ba	4,89±0,1Aa	3,89±0,1Bb	4,10±0,3Bb

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente. Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente. MC: Moího Coloidal; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; COMB: Ultraturrax+Ultrassom.

Dentre as concentrações de montemorilhonita, os filmes com 5 g de MMT/100 g de gelatina apresentaram, de forma geral, valores superiores de tensão na ruptura e módulo de elasticidade. Também foi possível observar que nas propriedades de tensão máxima, módulo de elasticidade e força na perfuração o aumento da concentração de nanopartículas para 7 g de MMT/100 g de gelatina levou a uma leve redução no valor desses atributos. Enquanto que não foi apreciada uma diferença clara entre os métodos usados para dispersar a nanopartícula, embora os tratamentos de UT e Combinado tenham apresentado, no geral, os maiores valores médios. O aumento nessas propriedades de mecânicas dos filmes nanocompósitos é devido ao aumento da interação superficial entre a matriz de polímero e as nanopartículas com elevada área superficial, assim como a formação de ligações de hidrogênio entre as mesmas (RHIM, 2011). Também, a ação de reticulação física do MMT entre as moléculas de gelatina deve ser um dos contribuintes para induzir a alta resistência à tração (MU et al. 2012a,b).

Tunc et al. (2007), Luecha, Sozer e Kokini, (2010) e Giménez et al. (2012), em estudos sobre o efeito de reforços de montemorilhonita e sepiolita (outra nanoargila) em filmes de glúten de trigo, zeína e clara de ovo, respectivamente, reportaram que o Módulo de elasticidade aumentou conforme se aumentou a concentração de nanoargila no filme, similarmente ao observado neste trabalho. Os valores médios de módulo de elasticidade alcançaram o máximo quando a concentração de montemorilhonita nos filmes foi de 5 g de MMT/100 g de gelatina.

A montemorilhonita também afetou a deformação dos filmes, sendo que esta diminuiu ($p < 0,05$), no teste de tração e aumento ligeiramente no teste de perfuração (Tabela 4). Assim, esses comportamentos das propriedades mecânicas em função da presença da MMT podem ser atribuídos à diminuição de tamanho das partículas e aglomerados e à boa dispersão das partículas de montemorilhonita na matriz de gelatina.

5.3.3. Cor, opacidade e brilho a 60°

Em relação a cor dos filmes, observou-se que os filmes nanocompósitos foram mais ($p < 0,05$) coloridos do que os filmes de gelatina, especialmente quando as concentrações de montemorilhonita foram maiores; mas, observou-se também que este efeito nos parâmetros de cor, e sobretudo que o aumento da diferença total de cor, que foi no máximo de 0,28 para 2,26, também é muito pequeno, em termos tecnológicos. Esses comportamentos foram contrários ao observado por Sothornvit et al. (2010), que trabalharam com filmes de isolado protéico de soro com montemorilhonita modificada, e perceberam importantes mudanças na coloração dos filmes devida à presença da MMT. Neste trabalho o método de dispersão usado para dispersar a montemorilhonita também não teve um efeito relevante na cor dos filmes (Tabela 5).

Por outro lado, o aumento na concentração de MMT aumentou a opacidade dos filmes em quase 5 vezes, apesar de ainda baixa do ponto de vista tecnológico, ou seja, esses filmes ainda não podem constituir barreira à luz. Entretanto, ocorreram diferenças significativas na opacidade do filme devido ao método de dispersão da nanopartícula, sendo que no geral, os filmes nanocompósitos foram mais ($p < 0,05$) opacos quando as dispersões foram processadas com Moinho Coloidal. O efeito da MMT na opacidade do material deve ter sido consequência da barreira que essa argila provoca em relação à luz, alterando a difração da luz através do material.

Outra propriedade ótica estudada foi o brilho, determinados a 60° (Tabela 6). Os filmes de gelatina foram mais ($p < 0,05$) brilhantes do que os filmes nanocompósitos. Observou-se que a presença da MMT na matriz biopolimérica alterou a textura superficial do material, aumentando sua rugosidade e, portanto, diminuindo o seu brilho. Desta forma, o brilho dos filmes nanocompósitos diminuiu gradualmente com o aumento na concentração de montemorilhonita no filme. Esta diminuição, até 40-50%, no brilho das superfícies foi maior ao observado por Xu et al. (2011) e Landry, Blanchet e Riedl (2010), que trabalhando com outras matrizes, observaram diminuição do brilho em 16 e 11%, respectivamente, com o aumento da concentração de montemorilhonita.

Tabela 5. Valores dos parâmetros de cor dos filmes.

C_{MMT} (g/100 g gelatina)	1	3	5	7
Parâmetro L*				
CONTROLE	90,39±0,1			
MC	90,39±0,0Ba	90,50±0,0ABa	90,66±0,1Aa	90,45±0,0Ba
UT	90,39±0,0Aa	90,41±0,1Aa	88,16±1,3Bb	90,42±0,1Aa
US	90,32±0,0Ab	90,11±0,0Bb	88,95±0,1Cab	89,98±0,1Bb
COMB	89,50±0,0Bc	89,84±0,1ABc	90,09±0,0Aa	89,09±0,3Cc
Parâmetro a*				
CONTROLE	-1,05±0,0			
MC	-1,05±0,0Aa	-1,08±0,0Ab	-1,02±0,0Ab	-1,03±0,0Ab
UT	-1,08±0,0Ba	-1,08±0,0Bb	-0,96±0,0Aa	-1,10±0,0Bc
US	-1,06±0,0Ba	-1,08±0,0Bb	-0,94±0,0Aa	-1,07±0,0Bbc
COMB	-1,05±0,0Ca	-0,94±0,0Aa	-0,97±0,0Bab	-0,99±0,0Ba
Parâmetro b*				
CONTROLE	2,06±0,2			
MC	2,11±0,1Cc	2,51±0,1BCa	2,94±0,2ABa	3,18±0,3Ab
UT	2,25±0,1Dbc	2,53±0,1Ca	3,03±0,1Ba	3,48±0,1Aab
US	2,35±0,0Cb	2,53±0,2Ca	2,94±0,1Ba	3,32±0,1Aab
COMB	3,30±0,1Ba	2,53±0,0Ca	2,09±0,1Db	3,75±0,1Aa
Diferença Cor (%)				
CONTROLE	0,28±0,1			
MC	0,27±0,0Bb	0,58±0,1Ba	1,04±0,2Aab	1,16±0,3Ab
UT	0,32±0,0Bb	0,54±0,1Ba	2,26±1,1Aa	1,46±0,1ABb
US	0,34±0,0Bb	0,47±0,2Ba	1,48±0,1Aab	1,27±0,1Ab
COMB	1,39±0,1Ba	0,57±0,1Ca	0,11±0,0Db	1,99±0,2Aa
Opacidade (%)				
CONTROLE	0,82±0,2			
MC	1,93±1,1Aa	2,17±0,1Aa	3,35±0,2Aa	3,42±0,0Aa
UT	1,35±0,3Ca	2,12±0,3Ba	1,70±0,1BCb	3,45±0,1Aa
US	0,85±0,2Ca	1,60±0,0Bb	0,99±0,1Cc	2,58±0,2Ab
COMB	1,17±0,1Ba	0,98±0,1Bc	0,52±0,1Cd	1,60±0,1Ac

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente. Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente. MC: Moinho Coloidal; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; COMB: Ultraturrax+Ultrassom.

Por outro lado, o método de dispersão da nanopartícula que gerou menor redução no brilho dos filmes, ainda na maior concentração de montemorilhonita usada foi o processador ultrassônico (Tabela 6). Foram avaliadas as duas faces do filme, sendo que o comportamento foi bastante similar com a característica que a face em contato com a placa foi ligeiramente mais brilhante do que a face em contato com o ar de secagem; muito provavelmente devido à uniformidade da superfície da placa.

Tabela 6. Brilho das duas faces dos filmes observados a 60°.

C_{MMT} (g/100 g gelatina)	1	3	5	7
Brilho na superfície de secagem (U.B.)				
CONTROLE	155,08±4,9			
	1	3	5	7
MC	132,18±5,1Aab	104,18±2,2Bc	83,61±0,8Cc	74,68±4,8Cb
UT	130,51±1,1Aab	103,52±0,4Bc	81,48±2,4Cc	75,32±0,5Db
US	143,85±2,3Aa	130,51±0,7Ba	125,23±3,2Ba	114,51±1,1Ca
COMB	117,60±13,1Ab	120,59±4,7Ab	111,54±1,5Ab	109,00±1,1Aa
Brilho na superfície em contato com a placa (U.B.)				
CONTROLE	154,98±3,4			
MC	130,12±5,6Aab	109,68±3,0Ba	99,32±1,6BCc	96,68±6,6Cb
UT	129,32±2,2Aab	109,20±0,8Ba	96,22±2,7Cc	96,49±1,9Cb
US	141,08±2,3Aa	126,34±1,3Ba	121,06±4,8BCa	114,04±1,2Ca
COMB	115,08±11,3Ab	116,43±13,5Aa	112,95±0,6Ab	109,44±0,2Aa

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente. Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente. MC: Moinho Coloidal; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; COMB: Ultraturrax+Ultrassom.

5.3.4. Microestrutura por Microscopia MEV e AFM

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes tanto de controle quanto os nanocompósitos estão apresentadas nas Figuras 9-11. Foi possível perceber que os filmes de controle de gelatina apresentaram superfícies regulares com poucos ressaltos. De igual forma a seção transversal após a criofratura também foi uma superfície suavizada não se observando presença de partículas nem de agregados (Figura 9).

Figura 9. Micrografias (MEV) da superfície (a) e criofratura transversal (b) do filme de controle de gelatina.

O efeito do aumento da concentração de MMT nos filmes nanocompósitos pode ser observado nas Figuras 10 e 11. Foi possível observar que a montemorilhonita modificou a aparência da superfície dos filmes, sendo que quanto maior a concentração, maior a irregularidade da superfície (Figura 10). Este comportamento foi similar para as imagens da seção transversal após a criofratura (Figura 11).

Quanto ao efeito do método de dispersão da montemorilhonita, os filmes nanocompósitos produzidos pelo tratamento US pareceram ter uma morfologia similar à do filme controle, com a superfície limpa e seção transversal suavizada, apresentando pequenas partículas altamente dispersas e pouca aglomeração (Figura 9 e 10). Não foram observadas diferenças importantes

nas microestruturas da seção criofraturada dos filmes processados pelos outros métodos.

A topografia da superfície dos filmes foi observada a partir de micrografias obtidas por microscopia de força atômica (AFM) (Figura 12). Os filmes de controle mostraram uma superfície lisa com rugosidade de 3,7 nm, um pouco inferior a 7 nm relatado por Farris et al. (2011) para filmes de gelatina. Os filmes nanocompósitos apresentaram uma rugosidade de 64,3, 46,3, 71,6 e 54 nm, para UT, US, MC e COMB, respectivamente, resultados que coincidem com o reportado por Rhim (2011). Ou seja, a presença da montemorilhonita aumentou a rugosidade na superfície dos filmes nanocompósitos em maior ou menor grau, independente do método de dispersão usado. Essa modificação na textura da superfície pode ter ocorrido devido à formação de aglomerados por interações próprias dos componente, ou também por causa do processo de secagem com ar quente que deslocaria as partículas à superfície.

Figura 10. Micrografias MEV da superfície dos filmes nanocompósitos agrupados por método de dispersão e concentração de MMT

Figura 11. Micrografias MEV da seção transversal (após criofratura) dos filmes nanocompósitos, agrupados por método de dispersão e concentração de MMT

Figura 12. Micrografias AFM da superfície 2D e 3D dos filmes nanocompósitos com 5 g MMT/100 g gelatina e de controle.

5.3.5. Difração de Raios-X

Os espectros de difração de montemorilhonita antes e após dispersão estão apresentados na Figura 13. Foi possível se observar que a montemorilhonita não tratada apresentou vários picos atribuídos a diversos tipos de cristais, sendo destacados os picos nas posições $2\theta = 7^\circ$ e 20° . O processo de dispersão ocasionou desaparecimento do pico em $2\theta = 20^\circ$ e vários picos menores, ou seja, uma perda de cristalinidade que pode estar relacionada com a degradação da estrutura (PERRIN-SARAZIN et al., 2009). Além disso, o processo de dispersão gerou a diminuição na intensidade do pico em $2\theta = 7^\circ$, o que pode ser atribuído a mudanças estruturais na MMT, redução de tamanho da partícula e, possivelmente, delaminação (LEE et al., 2007). Por outro lado, o espectro da gelatina de pele suína apresentou uma única banda larga centrada em $2\theta = 20^\circ$ (resultado não apresentado) (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010).

Figura 13. Espectros de difração da MMT antes e após processamento com Ultraturrax+ Ultrassom.

Espectros de difração dos filmes de controle e nanocompósitos com diferentes concentrações de MMT estão apresentados na Figura 14. Foi possível observar que o filme controle apresentou duas bandas, a primeira centrada em

$2\theta = 7^\circ$, atribuída à reconstituição das estruturas de tripla hélice formadas possivelmente na secagem (YAKIMETS et al., 2005); e a segunda centrada em $2\theta = 20^\circ$ característica da fase amorfa (PEREDA et al., 2011). A presença da montemorilhonita, independente da concentração, provocou diminuição na intensidade da banda $2\theta = 20^\circ$, fazendo-a mais larga na região $2\theta = 30^\circ$.

No entanto, o principal efeito da MMT pode ser apreciado em $2\theta = 7^\circ$, onde com o aumento na concentração, o pico foi deslocado gradualmente para ângulos menores até finalmente virar um ombro ou desaparecer. Este comportamento foi observado nos filmes de todos os métodos de dispersão usados (Figura 15), sendo mais notório nos filmes processados com Ultrassom, similar ao observado por Martucci, Vázquez e Ruseckaite (2007). Segundo Zheng et al. (2005), este comportamento pode indicar a formação de estruturas intercaladas o esfoliadas.

Figura 14. Espectros de difração dos filmes nanocompósitos processados com Ultraturrax.

Figura 15. Espectros de difração dos filmes nanocompósitos processados com os diferentes equipamentos. Concentração fixa de 7 g MMT/100 g gelatina.

5.3.6. Propriedades térmicas – DSC

Os filmes de controle e nanocompósitos foram analisados por calorimetria diferencial de varredura (DSC) para verificar o efeito da montemorilhonita em diferentes concentrações e do método de dispersão sobre as transições de fase. Foi possível observar no termograma (Figura 16a) que a MMT não alterou o comportamento das curvas; as temperaturas de fusão aumentaram ligeiramente com a concentração de MMT, de 91°C no controle para 97°C para a máxima concentração usada. Por outro lado, as entalpias de fusão não foram influenciadas pelo aumento na quantidade de MMT ficando em torno de 23 J/g. comportamento similar foi observado na temperatura de transição vítrea que permaneceram na faixa de 52-58°C (Figura 16b).

Figura 16. Curvas de DSC dos filmes controle e nanocompósitos com diferentes concentrações de montemorilhonita (a) e detalhe de transições vítreas (entre 40 e 80 °C) (b).

Por outro lado, o método de dispersão combinado foi o único que incrementou ($p < 0.05$) a temperatura de fusão nos filmes nanocompósitos, até 104°C (Figura 17a). A entalpia de fusão registrou o valor mais baixo nos filmes processados por US, 19 J/g, enquanto que os filmes processados pelo método combinado apresentaram os maiores valores de 26 J/g. A temperatura de transição vítrea manteve-se invariável com os tratamentos (Figura 17b).

Figura 17. Curvas de DSC dos filmes controle e nanocompósitos processados com os diferentes equipamentos com concentração de 5 g MMT/100 g gelatina (a) e detalhe de transições vítreas (entre 40 e 80 °C) (b).

5.3.7. Espectroscopia de Infravermelho

Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da gelatina em pó, montemorilhonita e o glicerol estão apresentados na Figura 18. Observaram-se diversas bandas, sendo localizadas para a gelatina em 3283 cm^{-1} , região da amida-A representa o estiramento NH- juntamente com ligações de hidrogênio, 1629 cm^{-1} na região da amida III relacionada com as vibrações no plano de grupos C-N e N-H da ligação amida ou vibrações de grupos CH_2 de glicina, 1523 cm^{-1} na região da amida II representando a vibração de flexão de grupos N-H e as vibrações de alongamento de grupos C-N; e em 1235 cm^{-1}

para a amida I representando o alongamento C=O e ligações de hidrogênio junto com COO.

Figura 18. Espectros de Infravermelho dos constituintes dos filmes.

Para o glicerol foram observadas bandas principalmente na região de 3475-3240 cm^{-1} , relacionadas com o alongamento dos grupos OH, e na região de 1100-800 cm^{-1} , associada com as interações entre carbono e hidroxilas. E para a montemorilhonita a bandas em 3630 e 3440 cm^{-1} , associadas com o alongamento dos grupos Si-OH e -OH da água intercalada; uma banda em 1630 cm^{-1} , atribuídos à flexão do -OH da água; bandas em 1120 e 1050 cm^{-1} que corresponde à flexão e alongamento do Si-O; e bandas em 530 e 470 cm^{-1} correspondentes ao estiramento de Al-O Mg-O, respectivamente, segundo Ramadan, Esawi e Abdel (2010).

Figura 19. a) Espectros de infravermelho dos filmes de controle e nanocompósitos processados com Ultrassom e diferentes concentrações de MMT. b) Detalhe do efeito do aumento na concentração de MMT nos espectros de infravermelho.

Também foi possível observar que os espectros dos filmes com e sem montemorilhonita são similares entre si, e similares com o espectro da gelatina, apesar de ter deslocamento das bandas (Figura 19a). Este deslocamento das bandas indica a forte interação entre a matriz de gelatina e a MMT através de ligações de hidrogênio (KANMANI; RHIM, 2014; MU et al. 2012b.). Dessa forma, uma melhor dispersão da MMT pode promover a formação de mais interações de ligação de hidrogênio (MU et al. 2012a).

Além disso, uma ampliação dos espectros na região de 1200-600 cm^{-1} permitiu observar o efeito do incremento na concentração de MMT (Figura 19b). As mudanças observadas foram a sobreposição de dois picos na região de 1105-1060 cm^{-1} para formar um único ombro; e o alargamento de um pico em 1040 cm^{-1} devido à interposição de dois picos menores em 990 cm^{-1} e 960 cm^{-1} , indicando a vibração de estiramento da banda Si-O das camadas tetraédricas da MMT (KANMANI; RHIM, 2014). A banda acentuada em 1035 cm^{-1} do filme pode ser atribuído em grande parte às interações que surgirem entre o plastificante (estiramento C-O do glicerol) e a estrutura do filme (BERGO; SOBRAL, 2007)

O método de dispersão da montemorilhonita não influenciou a resposta dos filmes nos espectros de FTIR (Figura 20a). Foi possível observar que esses

tratamentos não modificaram o comportamento das curvas, conservando a posição das bandas (Figura 20b).

Figura 20. a) Espectros de infravermelho dos filmes de controle e nanocompósitos processados com os diferentes equipamentos e 7 g MMT/100 g gelatina. b) Detalhe do efeito do método de dispersão de MMT nos espectros de infravermelho com 7 g MMT/100 g gelatina.

5.3.8. Ângulo de Contato

Os resultados de ângulo de contato de uma gota de água aplicada nas superfícies dos filmes estão apresentados na Tabela 7. Esse ângulo mede, de certa forma, a hidrofobicidade do material, sendo que se considera o material como hidrofóbico quando o ângulo de contato for maior que 65° , e hidrofílico, quando o ângulo for menor ou igual a 65° , segundo a classificação proposta por Vogler (1998).

Tabela 7. Ângulo de contato na superfície dos filmes de controle e nanocompósitos com várias concentrações de MMT.

C_{MMT} (g/100 g gelatina)	1	3	5	7
Ângulo (°)				
CONTROLE	95,42±2,3			
MC	91,23±3,8Aab	85,30±4,3Aab	83,37±5,4Aab	92,44±1,6Aa
UT	92,47±3,3ABab	94,74±5,8Aa	84,57±3,6ABab	84,53±1,9Ba
US	85,88±2,1Ab	79,75±3,5ABb	76,32±3,3Bb	89,41±2,7ABa
COMB	96,54±2,7Aa	95,16±3,0Aa	93,13±4,0Aa	100,43±6,5Aa

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente. Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente. MC: Moinho Coloidal; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; COMB: Ultraturrax+Ultrassom.

No geral, pode-se observar que a presença da montemorilhonita no filme afetou ($p < 0,05$) o ângulo de contato, provavelmente devido à modificação na textura da superfície como comprovado na análise de microscopia. No entanto, quando se comparam as concentrações usadas, o aumento da concentração de MMT não variou o ângulo de contato ($p > 0,05$), embora a tendência parecesse ser a redução quando a concentração de MMT foi até 5 g MMT/100 g gelatina e se recuperar com 7 g MMT/100 g gelatina. O efeito do método de dispersão e da concentração de montemorilhonita sobre o ângulo de contato está apresentado de forma gráfica, na Figura 21. Apesar do ângulo de contato ter diminuído nos filmes nanocompósitos, estes ainda estão maiores que 65°, podendo ser consideradas as suas superfícies como hidrofóbicas (FARRIS et al., 2011). Estes resultados diferem dos obtidos por Tunc et al. (2007) e Coronado Jorge (2012), que observaram que o aumento da concentração da nanoargila em filmes de glúten de trigo e gelatina, respectivamente, tornou mais hidrofílicas as superfícies dos filmes. Por outro lado, Rhim et al. (2006) observaram que em filmes de quitosana reforçados com montemorilhonita, a presença desta última aumentou a hidrofobicidade, quando comparada com filmes sem MMT.

Figura 21. Efeito do método de dispersão e concentração de MMT sobre o ângulo de contato em filmes de gelatina. MC: Moinho Coloidal; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; COMB: Ultraturrax+Ultrassom.

6. CONCLUSÕES

A concentração de montemorilhonita não afetou a dispersão das nanopartículas em água, nas concentrações estabelecidas neste trabalho usando Ultraturrax.

O aumento no tempo de processamento das dispersões de montemorilhonita em água provocou desintegração de aglomerados e diminuição de tamanho das partículas, para os tratamentos propostos Moinho Coloidal, Ultraturrax, Ultrassom e a sua combinação. Contudo, não foi atingido o tamanho nominal considerado como ideal (<100 nm) para a elaboração dos nanocompósitos.

A estabilidade das dispersões de montemorilhonita em água, avaliada em termos de potencial Zeta, não foi afetada pela concentração da MMT, nem ainda pelo tempo de processamento. No entanto, o equipamento usado para dispersá-la comprometeu essa estabilidade, sendo que o cisalhamento provocado pelo Ultraturrax gerou maior estabilidade.

As partículas de montemorilhonita atuaram como reforço nas propriedades mecânicas dos filmes nanocompósitos a base de gelatina, melhorando a sua resistência. As propriedades óticas e funcionais estudadas dos filmes nanocompósitos apresentaram variação, que embora significativa estatisticamente, podem ser considerados desprezíveis do ponto de vista tecnológico. Assim, no geral, pode-se concluir que as nanopartículas reforçaram o material, sem causar prejuízo nas outras características estudadas.

A concentração ótima de montemorilhonita nos filmes nanocompósitos foi de 5 g MMT/100 g gelatina, em função das melhoras oferecidas na maioria das propriedades avaliadas.

O método de dispersão das partículas de montemorilhonita em água teve um leve impacto nas propriedades dos filmes resultantes. O homogeneizador mecânico ultraturrax e o método combinado exibiram as maiores propriedades mecânicas, porém, em detrimento das características óticas e de superfície. O

processador ultrassônico demonstrou ser um método eficaz para aumentar a dispersão e reduzir o tamanho das partículas, melhorando as propriedades mecânicas, com um baixo impacto sobre as propriedades de superfície dos filmes nanocompósitos.

7. REFERÊNCIAS

- AMIRI, A.; ØYE, G.; SJÖBLOM, J. Temperature and pressure effects on stability and gelation properties of silica suspensions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 378, n. 1-3, p. 14-21, 2011. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.01.048.
- ANDREUCCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca schidigera* as the surfactant. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 6, p. 1710-1718, 2010. doi:10.1016/j.foodres.2010.05.013.
- ANGELLIER, H.; MOLINA-BOISSEAU, S.; DOLE, P.; DUFRESNE, A. Thermoplastic starch-waxy maize starch nanocrystals nanocomposites. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 2, p. 531-539, 2006. doi:10.1021/bm050797s
- ANGELLIER-COUSSY, H.; TORRES-GINER, S.; MOREL, M.-H.; GONTARD, N.; GASTALDI, E. Functional Properties of Thermoformed Wheat Gluten / Montmorillonite Materials with Respect to Formulation and Processing Conditions. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 107, p. 487-496, 2008. doi:10.1002/app.27108.
- ARVANITOYANNIS, I. Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. In: GENNADIOS, A. (Ed.). **Protein-based films and coatings**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2002.
- ASHTON, H. C. The Incorporation of Nanomaterials into Polymer Media. In: GUPTA, R. K.; KENNEL, E.; KIM, K.-J. (Eds.). **Polymer nanocomposites handbook**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. p. 21-44.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). **D2244/11**. Standard Practice for Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates. 1, 1–12. doi:10.1520/D2244-11.2
- American Society for Testing and Materials (ASTM). **D2457/13**. Specular Gloss of Plastic Films and Solid Plastics. 1, 1–6. doi:10.1520/D2457-13.2
- American Society for Testing and Materials (ASTM). **D3418/12**. Standard Test Method for Transition Temperatures and Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning. 1, 1–7. doi:10.1520/D3418-12E01.2
- American Society for Testing and Materials (ASTM). **7334/08**. Standard Practice for Surface Wettability of Coatings , Substrates and Pigments by Advancing Contact Angle Measurement. 1, 1–3. doi:10.1520/D7334-08.2

- American Society for Testing and Materials (ASTM). **D882/12**. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. 1, 1-12. doi:10.1520/D0882-12.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). **E96/12**. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. 1, 1–12. doi:10.1520/E0096
- American Society for Testing and Materials (ASTM). **F1306/90**. Standard Test Method for Slow Rate Penetration Resistance of Flexible Barrier Films. doi:10.1520/F1306-90R08E01.2
- BAE, H. J., PARK, H. J., HONG, S. I., BYUN, Y. J., DARBY, D. O., KIMMEL, R. M.; WHITESIDE, W. S. Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 42, n. 6, p. 1179-1186, 2009. doi:10.1016/j.lwt.2008.12.016.
- BERGO, P.; SOBRAL, P.J.A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.21, n.8, p.1285-1289, 2007.
- CADENE, A.; DURAND-VIDAL, S.; TURQ, P.; BRENDLE, J. Study of individual Na-montmorillonite particles size , morphology , and apparent charge. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 285, p. 719-730, 2005. doi:10.1016/j.jcis.2004.12.016.
- CAO, T.; FASULO, P. D.; RODGERS, W. R. Investigation of the shear stress effect on montmorillonite platelet aspect ratio by atomic force microscopy. **Applied Clay Science**, v. 49, n. 1-2, p. 21-28, 2010. doi:10.1016/j.clay.2010.03.018.
- CHEN, P.; ZHANG, L. Interaction and properties of highly exfoliated soy protein/montmorillonite nanocomposites. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 6, p. 1700-6, 2006. doi:10.1021/bm050924k.
- CORONADO JORGE, M. F. Caracterização de filmes nanocompósitos biodegradáveis a base de gelatina produzidos com um aplicador automático de filmes. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2012.
- CYRAS, V. P.; MANFREDI, L. B.; TON-THAT, M.-T.; VÁZQUEZ, A. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 73, n. 1, p. 55-63, 2008. doi:10.1016/j.carbpol.2007.11.014.
- DEIBER, J. A.; PEIROTTI, M. B.; OTTONE, M. L. Rheological characterization of edible films made from collagen colloidal particle suspensions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1382-1392, 2011. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.01.002.

- DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; AÑÓN; M. C.; SOBRAL, P.J.A.; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F.C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, Westport, v. 90, n. 3, p. 341-349, 2009. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.07.001.
- FARRIS, S.; INTROZZI, L.; BIAGIONI, P.; HOLZ, T.; SCHIRALDI, A.; PIERGIOVANNI, L. Wetting of biopolymer coatings: contact angle kinetics and image analysis investigation. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 27, n. 12, p. 7563-74, 2011. doi:10.1021/la2017006.
- GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-ESTACA, J.; MONTERO, P. Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin–egg white films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, 27(2), 475–486, 2012. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.09.003
- GÓMEZ-GUILLÉN, M.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1813-1827, 2011. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.007.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.-L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 1, p. 190-195, 1992. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x.
- Gontard, N.; Ring, S. Edible Wheat Gluten Film : Influence of Water Content on Glass. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 44, 3474–3478, 1996.
- GURGEL, M.; VIEIRA, A.; ALTENHOFEN, M.; OLIVEIRA, L.; BEPPU, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films : A review. **European Polymer Journal**, New York, v. 47, n. 3, p. 254-263, 2011. doi:10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011.
- HEDENQVIST, M. S.; BACKMAN, A.; GÄLLSTEDT, M.; BOYD, R. H.; GEDDE, U. W. Morphology and diffusion properties of whey/montmorillonite nanocomposites. **Composites Science and Technology**, Barking, v. 66, n. 13, p. 2350-2359, 2006. doi:10.1016/j.compscitech.2005.11.026.
- JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; PRODPRAN, T.; TANAKA, M. Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 492-501, 2006. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.04.007.
- KANMANI, P.; RHIM, J.-W. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. **Food Hydrocolloids**, Oxford, 35, 644–652, 2014. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.08.011
- KOLMAN, K.; STEFFEN, W.; BUGLA-PŁOSKONSKA, G.; SKWARA, A.; PIĞŁOWSKI, J.; BUTT, H.; KIERSNOWSKI, A. Exfoliation of montmorillonite in protein solutions. **Journal of Colloid and Interface**

- Science**, Amsterdam, v. 374, p. 135-140, 2012.
doi:10.1016/j.jcis.2012.02.009.
- LAGARÓN, J. M.; CABEDO, L.; CAVA, D.; FEIJOO, J. L.; GAVARA, R.; GIMENEZ, E. Improving packaged food quality and safety. Part 2: nanocomposites. **Food additives and contaminants**, London, v. 22, n. 10, p. 994-8, 2005. doi:10.1080/02652030500239656.
- LANDRY, V.; BLANCHET, P.; RIEDL, B. Mechanical and optical properties of clay-based nanocomposites coatings for wood flooring. **Progress in Organic Coatings**, v. 67, n. 4, p. 381-388, 2010.
doi:10.1016/j.porgcoat.2009.12.011.
- LEE, Y.-C.; KUO, C.-L.; WEN, S.-B.; LIN, C.-P. Changes of organo-montmorillonite by ball-milling in water and kerosene. **Applied Clay Science**, 36(4), 265–270, 2007. doi:10.1016/j.clay.2006.09.013
- LI, P.; ZHENG, J. P.; MA, Y. L.; YAO, K. De. Gelatin/Montmorillonite Hybrid Nanocomposite. II. Swelling Behavior. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 88, p. 322-326, 2003.
- LU, Y.; WENG, L.; CAO, X. Morphological, thermal and mechanical properties of ramie crystallites—reinforced plasticized starch biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Barking, 63(2), 198–204, 2006.
doi:10.1016/j.carbpol.2005.08.027
- LUCKHAM, P.; ROSSI, S. The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, 82(1-3), 43–92, 1999. doi:10.1016/S0001-8686(99)00005-6
- LUECHA, J.; SOZER, N.; KOKINI, J. L. Synthesis and properties of corn zein/montmorillonite nanocomposite films. **Journal of Materials Science**, Norwell, v. 45, n. 13, p. 3529-3537, 2010. doi:10.1007/s10853-010-4395-6.
- MARTUCCI, J. F.; VÁZQUEZ, A.; RUSECKAITE, R. A. Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite: morphological and thermal studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 89, n. 1, p. 117-122, 2007.
- MEKHAMER, W. K. The colloidal stability of raw bentonite deformed mechanically by ultrasound. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 301-306, 2010. doi:10.1016/j.jscs.2010.04.013.
- MU, C.; LI, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, H.; WANG, L.; LI, D. Freezing/thawing effects on the exfoliation of montmorillonite in gelatin-based bionanocomposite. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, p. n/a-n/a, 2012a. doi:10.1002/app.38511.
- MU, C.; LI, X.; GUO, J.; BI, C.; LI, D. Effects of montmorillonite on the structure and properties of gelatin-polyethylene glycol composite fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, n/a–n/a. 2012b.
doi:10.1002/app.38808

- PAVLIDOU, S.; PAPASPYRIDES, C. D. A review on polymer-layered silicate nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 33, n. 12, p. 1119-1198, 2008. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.07.008.
- PEREDA, M.; PONCE, A.; MARCOVICH, N.; RUSECKATIE, R.; MARTUCCI, J. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.25, n.5, p.1372-1381, 2011.
- PERRIN-SARAZIN, F.; SEPEHR, M.; BOUARICHA, S.; DENAULT, J. Potential of ball milling to improve clay dispersion in nanocomposites. **Polymer engineering and science**, 651–665, 2009. doi:10.1002/pen
- POLI, A. L.; BATISTA, T.; SCHMITT, C. C.; GESSNER, F.; NEUMANN, M. G. Effect of sonication on the particle size of montmorillonite clays. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 325, p. 386-390, 2008. doi:10.1016/j.jcis.2008.06.016.
- RAMADAN, A. R.; ESAWI, A. M. K.; ABDEL, A. Applied Clay Science Effect of ball milling on the structure of Na + -montmorillonite and organo-montmorillonite (Cloisite 30B). **Applied Clay Science**, 47(3-4), 196–202, 2010. doi:10.1016/j.clay.2009.10.002
- RAO, Y. Gelatine-clay nanocomposites of improved properties. **Polymer**, Leics, v. 48, p. 5369-5375, 2007. doi:10.1016/j.polymer.2007.06.068.
- RHIM, J.W.; HONG, S.I.; PARK H.M.; NG, P.K.W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 16, p.5814-5822, 2006.
- RHIM, J.W. Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar- based nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 86, n. 2, p. 691-699, 2011.
- RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 11(2), 369–375, 2010. doi:10.1016/j.ifset.2009.07.005
- SOBRAL, P.J.A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.
- SOBRAL, P.J.A.; HABITANTE, A.M.Q.B. Phase transitions of pigskin gelatine. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 4-6, p. 377-382, 2001.
- SOBRAL, P J A; MENEGALLI, F C; HUBINGER, M. D.; ROQUES, M. A. Mechanical , water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible Films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, p. 423-432, 2001.
- SOTHORNVIT, R.; HONG, S.-I.; AN, D. J.; RHIM, J.-W. Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-

- clay composite films. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 279-284, 2010. doi:10.1016/j.lwt.2009.08.010.
- TANTRA, R.; SCHULZE, P.; QUINCEY, P. Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility. **Particuology**, v. 8, n. 3, p. 279-285, 2010. doi:10.1016/j.partic.2010.01.003.
- THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P.J.A. Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 3, p. 172-176, 2005.
- TOMBÁČZ, E.; SZEKERES, M. Colloidal behavior of aqueous montmorillonite suspensions: the specific role of pH in the presence of indifferent electrolytes. **Applied Clay Science**, 27(1-2), 75–94, 2004. doi:10.1016/j.clay.2004.01.001
- TOMBÁČZ, E.; SZEKERES, M. Surface charge heterogeneity of kaolinite in aqueous suspension in comparison with montmorillonite. **Applied Clay Science**, v. 34, n. 1-4, p. 105-124, 2006. doi:10.1016/j.clay.2006.05.009.
- TRAN, A. T. T.; JAMES, B. J. A study the interaction forces between the bovine serum albumin protein and montmorillonite surface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, 414, 104–114, 2012. doi:10.1016/j.colsurfa.2012.08.066
- TUNÇ, S.; DUMAN, O. The effect of different molecular weight of poly (ethylene glycol) on the electrokinetic and rheological properties of Na-bentonite suspensions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, Amsterdam, 317, 93–99, 2008. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.09.039
- TUNC, S.; ANGELLIER, H.; CAHYANA, Y.; CHALIER, P.; GONTARD, N.; GASTALDI, E. Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 289, n. 1-2, p. 159-168, 2007. doi:10.1016/j.memsci.2006.11.050.
- ÜNLÜ, C. H.; GÜNİSTER, E.; ATICI, O. Effect of acidity on xylan-montmorillonite bionanocomposites. **Materials Chemistry and Physics**, v. 136, n. 2-3, p. 653-660, 2012. doi:10.1016/j.matchemphys.2012.07.038.
- VANIN, F.M.; SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; CARVALHO, R.A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 899-907, 2005. doi:10.1016/j.foodhyd.2004.12.003.
- VICENTINI, N. M.; DUPUY, N.; LEITZELMAN, M.; CEREDA, M. P.; SOBRAL, P. J. A. Prediction of Cassava Starch Edible Film Properties by Chemometric Analysis of Infrared Spectra. **Spectroscopy Letters**, New York, v. 38, n. 6, p. 749-767, 2005. doi:10.1080/00387010500316080.

- VILLALOBOS, R.; CHANONA, J.; HERNÁNDEZ, P.; GUTIÉRREZ, G.; CHIRALT, A. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 53-61, 2005. doi:10.1016/j.foodhyd.2004.04.014.
- VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, 74, 69–117, 1998.
- WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, D. J. Functional Materials in Food Nanotechnology. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 9, p. R107-R116, 2006. doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x.
- XU, S. W.; ZHENG, J. P.; TONG, L.; YAO, K. De. Interaction of functional groups of gelatin and montmorillonite in nanocomposite. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 101, n. 3, p. 1556-1561, 2006. doi:10.1002/app.23435.
- XU, Y.; CHEN, Q.; BAI, W.; LIN, J. Preparation and properties of raw lacquer/multihydroxyl polyacrylate/organophilic montmorillonite nanocomposites. **Polymer Bulletin**, v. 68, n. 4, p. 983-992, 2011. doi:10.1007/s00289-011-0593-x.
- YAKIMETS, I.; WELLNER.; SMITH, A.C.; WILSON, R.H.; FARHAT, I.; MITCHELL, J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, Leics, v. 46, n. 26, p. 12577-12585, 2005.
- ZARZYCKI, P.; SZABELSKI, P.; PIASECKI, W. Modelling of z-potential of the montmorillonite / electrolyte solution interface. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 5791-5796, 2007. doi:10.1016/j.apsusc.2006.12.060.
- ZHENG, J. P.; LI, P.; MA, Y. L.; YAO, K. D. Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 86, n. 5, p. 1189-1194, 2002. doi:10.1002/app.11062.