

# Producción y caracterización de biopelículas nanoestructuradas basadas en gelatina

J. Solorza Feria<sup>1\*</sup>, I.G. Ruiz Martínez<sup>1</sup>, D. Rodríguez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional, CEPROBI. Km 6 Carretera Yautepec-Jojutla, Calle Ceprobi 8, Col. San Isidro. C.P. 62731. Yautepec, Morelos, México

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering and CERMA, Université Laval, Quebec City, QC, G1V 0A6, Canada.

\*jsolorza@ipn.mx

Área de participación: Ingeniería Química

## Resumen

Se prepararon películas por extrusión-calandrado tres formulaciones “óptimas” conteniendo ácido tánico, nanoarcillas (Cloisita de sodio), glicerol, agua y gelatina, así como tres “controles” sin ácido tánico ni nanoarcillas. Con las mismas tres formulaciones “óptimas” se produjeron películas por extrusión-soplado, dado que no se pudo obtener condiciones estables para los controles. Se caracterizaron el espesor y las propiedades mecánicas de las películas. Se encontró que además del método de procesamiento, el espesor también estaba controlado por el contenido de glicerol y agua, con valores más altos para películas óptimas (0.88 a 0.98 mm). Se obtuvieron mayores módulos elásticos (45.80 a 70.6 Mpa) y resistencias a la tracción (9.56 a 14.74 Mpa) para las películas hechas a partir de formulaciones óptimas obtenidas por cualquiera de los métodos, existió efecto reforzante del ácido tánico y las nanoarcillas, aunque esto condujo a una menor elongación máxima (75.14 a 109.83 %). En general, las formulaciones optimizadas produjeron mejores películas en términos de propiedades mecánicas.

**Palabras clave:** gelatina, ácido tánico, nanoarcillas, películas

## Abstract

Three “optimum” formulations with tannic acid, nanoclays (Cloisite-Na+), glycerol, water and gelatin, as well as three “controls” without tannic acid and nanoclays were prepared by extrusion-calendering. Furthermore, the three “optimum” formulations were also produced by extrusion film blowing only, since it was not possible to get stable processing conditions for the controls. Samples characterization was performed including thickness and mechanical properties. The results showed that besides the processing method, the thickness was also controlled by the glycerol and water content, with higher values for the optimum materials (0.88 to 0.98 mm). Higher elastic moduli (45.80 to 70.6 Mpa) and tensile strengths (9.56 to 14.74 Mpa) were obtained for the films from the optimum formulations made by either method because of the reinforcing effect of the tannic acid and nanoclays, but this led to lower strain at break (75.14 to 109.83 %). Overall, the optimized formulations not only produced better films in terms of mechanical properties, but were easier to process by both methods studied.

**Key words:** gelatin, tannic acid, nanoclays, films.

## Introducción

Existe una creciente demanda de productos ecológicos al promover el desarrollo de materiales biodegradables derivados de biopolímeros como los polisacáridos y proteínas. Estos se consideran buenas alternativas a los materiales plásticos no biodegradables hechos de derivados del petróleo, utilizando métodos adecuados para su obtención [Martucci y Ruseckaite, 2010]. La extrusión es un método comúnmente utilizado para producir materiales de embalaje convencionales debido a su alta velocidad, alto índice de producción y eficiencia energética. Requiere un mínimo de espacio en comparación con el método tradicional de vertido o vaciado en placa. Para producir materiales por extrusión-calandrado, la masa fundida que sale del extrusor pasa a través de un troquel estrecho y el extrudido se estira mediante dos rodillos cilíndricos directamente en frente de la

boquilla. En el procedimiento de extrusión por soplado de películas, el material fundido que sale del extrusor pasa a través de una matriz anular, generalmente montada verticalmente y se estira por el aire suministrado a un tubo, y se amolda por los rodillos a presión. La principal diferencia entre los sistemas es el tipo de deformación aplicada sobre el material fundido que sale del dado. La deformación es uniaxial en el calandrado mientras que es biaxial en el soplado [Giles y col., 2005]. Para mejorar la resistencia mecánica y la resistencia al agua de los materiales basados en proteínas, pueden hacerse necesarias modificaciones estructurales. La gelatina, un biopolímero soluble en agua, es una proteína producida por la hidrólisis del colágeno animal que se ha utilizado ampliamente en aplicaciones farmacéuticas, alimentarias y médicas debido a sus propiedades favorables [Yakimets y col., 2005]. Por otro lado, se sabe que los compuestos fenólicos naturales derivados de plantas son interactivos con las proteínas como la gelatina, lo que lleva a mejorar las propiedades estos materiales. Además, para mejorar las propiedades mecánicas de los biopolímeros, se ha demostrado que la adición de nanopartículas es efectiva [Zhang y col., 2010]. Los nanocompuestos son materiales poliméricos llenos de partículas dispersas con al menos una dimensión en el intervalo de nanómetros. Nanocompuestos comunes incluyen arcillas, nanotubos de carbono y grafeno. Las nanoarcillas como la montmorillonita (MMT) han atraído atención debido a su disponibilidad y bajo costo [Shin y col., 2014].

Este trabajo presenta como objetivo formulaciones conducentes a la producción de películas de gelatina aplicando la extrusión. En este trabajo se basa en un desarrollo previo mediante vaciado en placa de formulaciones optimizadas que involucran ácido tánico y montmorillonita (cloisita de sodio).

## Metodología

### Materiales

Los materiales utilizados para este estudio son: nanoarcillas (Cloisita de sodio, Southern Clay Products, EE. UU.), Gelatina bovina (Bertheleth, Canadá), ácido tánico (ACS, Alfa Aesar, EE. UU.) y glicerol (grado analítico, Sigma-Aldrich, EE. UU.) . Se usó agua destilada en todas las formulaciones.

### Producción de muestras de películas

La concentración de cada componente se basa principalmente en tres formulaciones óptimas desarrolladas en un trabajo anterior [Ortiz-Zarama y col., 2016], ajustando los contenidos de glicerol y agua como se enumeran en la Tabla 1. Las muestras M1, M2 y M3 se proponen como óptimas mientras que las muestras M4, M5 y M6 son sus controles correspondientes (sin ácido tánico ni nanoarcillas). Estas seis muestras fueron producidas por extrusión-calandrado. A continuación, las muestras M7, M8 y M9 son las formulaciones óptimas producidas por extrusión-soplado de película, ya que no fue posible producir los controles mediante esta técnica debido al procesamiento inestable. Por simplicidad, las muestras óptimas procesadas por calandrado se denominarán M1 a M3, los controles correspondientes se denominarán M4 a M6, y las muestras óptimas obtenidas por extrusión-soplado se denominarán M7 a M9.

Para cada formulación, se realizó una premezcla de todos los componentes con un peso total de 500 g. La preparación se realizó en dos pasos. En primer lugar, se utilizó un extrusor de doble husillo co-rotativo de 16 mm de diámetro Polylab OS (Thermo Haake Electron Corporation, Alemania) con una relación L/D de 25 y una velocidad de tornillo de 75 rpm para obtener compuestos homogéneos. El perfil de temperatura se fijó a 70, 80, 90, 90, 90 y 90 ° C (desde la alimentación hasta la salida) con un dado o troquel circular de 2.5 mm. El material se enfrió a temperatura ambiente y luego se granuló (Modelo SJ-100, Sanyuan, China). De estos gránulos, la mitad se usó para producir las películas o materiales por extrusión-calandrado y la otra mitad por extrusión-soplado. Para el calandrado, se utilizó un dado rectangular (100 mm de ancho y 2,5 mm de apertura). Para obtener las películas, los gránulos se alimentaron al mismo extrusor mencionado (velocidad del tornillo de 75 rpm) con un perfil de temperatura de 75, 80, 90, 90, 90, 90 y 95 ° C (desde la alimentación hasta el troquel), seguido de un sistema de calandrado de dos rodillos con un diámetro de 7 cm y un ancho de 25 cm.

**Tabla 1. Formulaciones (% p/p) usadas para las muestras producidas por extrusión-calandrado y extrusión-soplado\*.**

Muestra	Ácido Tánico	Cloisita	Glicerol	Agua	Gelatina
M1	5	10	15	10	60
M2	5	10	20	10	55
M3	5	10	15	15	55
M4	0	0	15	10	75
M5	0	0	20	10	70
M6	0	0	15	15	70
M7	5	10	15	10	60
M8	5	10	20	10	55
M9	5	10	15	15	55

**\*M1 - M6 procesadas por calandrado, M7 - M9 procesadas por soplado**

El material final salió del dado aproximadamente a 15 cm/min. Para el soplado de películas por extrusión, se usó el sistema mencionado anteriormente (extrusor de doble tornillo co-giratorios). Cada formulación se alimentó al extrusor a una velocidad de flujo de aproximadamente 20 g/min. El extrusor está acoplado con un troquel de película soplada Haake Polylab. Este dado o troquel está diseñado como una pieza anular vertical con un espacio de 0.8 mm entre el diámetro externo y el interno del anillo (diámetro externo de 25 mm y diámetro interno ajustable con un máximo de 24 mm), formando un tubo de material con paredes delgadas. Se introdujo aire a temperatura ambiente a través de un orificio para inflar el producto. Se diseñó un anillo de enfriamiento para enfriar las películas, mientras que los rodillos con una velocidad ajustable estiraban el material [Giles y col., 2005].

Antes de cualquier prueba, todas las muestras de película se mantuvieron en equilibrio durante al menos 7 días en un desecador a temperatura ambiente con una atmósfera de alrededor de 57% de humedad relativa (HR), suministrada por una solución saturada de NaBr.

### **Espesor**

El espesor se midió usando un micrómetro digital (Truper 14388, EE. UU.), tomando lecturas al azar en 10 ubicaciones. Las pruebas se realizaron por triplicado (n = 3) para cada muestra.

### **Propiedades mecánicas**

Las tres propiedades mecánicas se determinaron a cada película a temperatura ambiente siguiendo la técnica de la ASTM D882, para obtener el módulo de rigidez o elástico también denominado módulo de Young, la fuerza de tensión a la ruptura, y la elongación o deformación a la ruptura. Para las pruebas mecánicas se cortaron y midieron muestras rectangulares (100 mm x 10 mm). Las mediciones se realizaron en un texturómetro Instron modelo 5565 con una celda de carga de 500 N, a una velocidad de medición de 12.5 mm/min. La separación inicial entre pinzas (longitud efectiva de muestra) fue de aproximadamente 60 mm y se realizaron 10 ensayos para cada muestra (n=10)

### **Análisis estadístico**

Las determinaciones se compararon de forma independiente, mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa SigmaPlot versión 11.0 (Systat Software, 2008), el nivel de significancia (p) se fijó en

0.05, cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. La aplicación de la prueba consistió en evaluar la diferencia mínima significativa honesta, DMSH, la cual se comparaba entre todas las medias, si la diferencia entre dos medias era mayor que la señalaba por la prueba Tukey, había diferencia significativa. La  $DMSH = Q * \sqrt{(CME/n)}$ , donde Q es el valor de rangos estudentizados de tablas, CME es el cuadrado medio del error o del residual y n es el número de repeticiones

## Resultados y discusión

### Producción de gránulos (pellets) y películas de gelatina (calandrado y soplado).

La Figura 1 presenta el esquema general para la preparación de gránulos (pellets) y películas mediante extrusión-calandrado y extrusión-soplado.



Figura 1. Esquema general de la producción de películas

Seis formulaciones fueron procesadas por calandrado. Sin embargo, las formulaciones control no fueron posibles de producir por soplado debido a su alta viscosidad y adherencia, alcanzando el torque máximo del equipo (120 N), restando tres muestras óptimas procesadas por este método.

### Espesor

La aplicación del método de análisis de varianza a los datos de espesor de las nueve películas, con cuando menos 17 mediciones, dió como resultado diferencia significativa, con probabilidad  $p < 0.05$  (Tabla 2). Lo cual indicó variaciones en el espesor de las películas tanto en función de las formulaciones, como los métodos de procesamiento.

**Tabla 2. Análisis de varianza del espesor de las películas obtenidas por calandrado y soplado.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	p
Películas	8	3.116	0.39	35.664	< 0.05
Residual	145	1.584	0.0109		
Total	153	4.7			

Los espesores de las muestras se muestran en la Tabla 3. Es notorio que las películas producidas por soplado son más delgadas que las obtenidas por calandrado, lo que indica que la mayor etapa de deformación aplicada durante el soplado (biaxial) condujo a películas más delgadas. Se distinguen películas que no muestran diferencias significativas entre sus espesores ( $p > 0.05$ ) para las muestras extrudidas. Las películas se basan en las formulaciones óptimas con ácido tánico y cloisita de sodio (M1 y M2), que tenían el espesor mayor. A continuación la muestra control M4 con el mayor contenido de gelatina (Tabla 1), presentó con mayor espesor un comportamiento diferente entre las muestras M5 y M6 controles. Aún la muestra óptima M3 con ácido tánico y nanoarcilla, presentó en general un mayor espesor que las películas controles últimas mencionadas y que las óptimas procesadas por soplado (M7 a M9).

A continuación están compuestos por las formulaciones controles con 70 % de gelatina (M5 y M6) que no presentaron diferencias significativas, con espesores menores que las películas que las óptimas calandradas (M1 y M2). Finalmente, las siguientes películas óptimas procesadas por soplado (M7 y M8), mostraron valores de espesor aproximadamente 87% más bajos que las óptimas calandradas.

Los materiales M7 y M8 obtenidos por soplado con 10% de agua, que tienen 15 y 20% de glicerol respectivamente (Tabla 1), no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ellas, mientras que una disminución en glicerol junto con un aumento en el contenido de agua en la formulación óptima obtenida por el método soplado, redujo el espesor en aproximadamente un 49%, lo que condujo a la película más delgada (M9). Como era de esperarse, además del método de procesamiento aplicado, el espesor final también fue influenciado por los contenidos de glicerol y agua que actúan como plastificantes.

**Tabla 3. Espesor de muestras de película (mm) producidas por calandrado y soplado\*.**

Muestra	Espesor $\pm$ de (mm)
M1	0.97 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
M2	0.98 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
M3	0.88 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
M4	0.91 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
M5	0.74 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
M6	0.67 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
M7	0.56 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>
M8	0.48 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>
M9	0.35 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>
DMSH	0.0584

\* Media  $\pm$  de (desviación estándar), n = 30, valores con las mismas letras superíndices (a, b, c, d, e), indican que no hay diferencia entre medias, pues fueron menores entre cada dos medias que la diferencia mínima significativa honesta (DMSH) de la prueba Tukey; no presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos (p > 0.05). M1-M6 procesadas por extrusión-calandrado, M7-M9 procesadas por extrusión-soplado.

### Propiedades Mecánicas

La Tabla 4 presenta las propiedades mecánicas de las muestras de películas producidas. Las tres propiedades mecánicas analizadas independientes, presentaron diferencias significativas estadísticas (ANOVA), al nivel de probabilidad (p < 0,05). Los módulos elásticos o de Young son en general más altos en materiales de formulaciones óptimas (M1 y M2) que los de los controles (M5 y M6). Para las películas obtenidas por calandrado (M1 a M6), se pueden observar diferencias entre las muestras ya que las que contienen ácido tánico y nanoarcillas (M1 a M3) mostraron valores más altos que los controles (M4 a M6). También se observan diferencias entre las películas de las formulaciones óptimas calandradas: M3 con 15% de agua que tiene el módulo elástico más bajo; aumentó en 55% para M1 con 10% de agua con diferencia significativa. La adición de ácido tánico y nanoarcillas en M1 procesado por calandrado aumentó en un 42% el módulo de Young en comparación con su control (M4). De manera similar, se observan aumentos sustanciales de 153% y 121% para las formulaciones óptimas M2 y M3 con adición de ácido tánico y nanoarcillas, en comparación con sus controles correspondientes (M5 y M6 respectivamente). El ácido tánico puede formar enlaces cruzados con gelatina, mientras que las nanoarcillas se intercalan en la estructura de gelatina aumentando la resistencia del material [Shin y col., 2014]. El módulo de Young mayor de M1 obtenido por calandrado, no mostró diferencia estadística con respecto a M7 obtenido por soplado con la misma formulación (ver Tabla 4) señalada en la Tabla 1. Además, no se detectaron diferencias estadísticas entre M3 (calandrado) y M9 (soplado) con los mismos contenidos de glicerol y agua.

La resistencia y flexibilidad de las películas se pueden describir por su resistencia a la tracción o tensión máxima y la elongación a la ruptura. Como se esperaba, se observa para la resistencia a la tracción, una tendencia similar al módulo elástico (Tabla 4); es decir, las películas de las formulaciones óptimas producidas por calandrado (M1 a M3) tienen en general, valores de tensión máxima mayores que las formulaciones control (M4 a M6). Tal aumento de la resistencia a la tracción puede estar relacionado con un mayor nivel de reticulación causado por el ácido tánico que estabiliza el material, y el fortalecimiento de la matriz de la película de gelatina causada por las nanoarcillas [Martucci y Ruseckaite, 2010].

La deformación o elongación a la ruptura mostró el comportamiento opuesto al módulo elástico y la resistencia a la tracción para las películas obtenidas por calandrado (Tabla 4). La muestra M1 presenta la elongación a la ruptura más bajo entre las formulaciones óptimas, pero un aumento en el contenido de glicerol (Tabla 1), aumentó la elongación en la ruptura en un 89% (M2), mientras que un aumento en el agua de formulación aumentó este parámetro en solo un 46% (M3). Las muestras control (M4 a M6) no presentaron diferencias significativas entre su elongación a la ruptura, pero mostraron valores más altos que las formulaciones óptimas (M1 a M3), con diferencias estadísticas entre estas muestras. En cuanto a M4, la adición de ácido tánico

disminuyó la tensión en la ruptura en un 52% (M1), mientras que para M5 la reducción es solo del 16% (M2). Para M6 control, la adición de ácido tánico (y nanoarcillas) conformada por la M3, disminuyó la elongación a la ruptura en un 53%. El glicerol tuvo un efecto plastificante que probablemente contribuyó a aumentar la elongación a la ruptura como se observó para las formulaciones con 20% de glicerol de películas calandradas (M2 y M5, Tabla 1), modificando principalmente la formulación control (M5 con el valor más alto). Sin embargo, dicho aumento plastificante en la elongación, fue superado por el efecto decreciente causado por el ácido tánico. Esto está asociado a las propiedades moleculares del ácido tánico que contiene varios grupos hidroxilo que favorecen una unión más fuerte entre las proteínas [Zhang y col., 2010].

En este trabajo, las muestras obtenidas por soplado tuvieron la menor elongación a la ruptura, es decir los valores menores (Tabla 4), esto es consistente con la tendencia observada previamente con el espesor, donde estas muestras mostraron los valores más bajos (Tabla 3). Esta diferencia entre soplado y calandrado está relacionada con la orientación molecular. Durante el proceso por soplado, las formulaciones son extruidos en un tubo hueco y se estiran biaxialmente por la presión interna del aire y los rodillos a presión. Por otro lado en el calandrado, las muestras solo se estiran uniaxialmente por dos rodillos, lo que da como resultado películas con mayor espesor [Garbacz, 2011]. La comparación entre muestras hechas por soplado (M7, M8 y M9) respecto al calandrado con las mismas formulaciones, da valores más altos de elongación a la ruptura en un 59% (M1), 207% (M2) y 70% (M3) en sus formulaciones correspondientes (Tabla 3). Teniendo en cuenta todas las muestras obtenidas por calandrado, los resultados muestran que la adición de ácido tánico y nanoarcillas causó una reducción de la elongación a la ruptura (M4 vs M1, M5 vs M2 y M6 vs M3) donde la diferencia principal es la adición de ácido tánico y nanoarcillas. Esto también podría ser una indicación de que no solo las condiciones de procesamiento, sino también los diferentes componentes afectan las propiedades mecánicas de los materiales.

Para las películas de formulaciones óptimas obtenidas por soplado, las propiedades mecánicas (módulo elástico o de Young, resistencia a la tracción y elongación a la ruptura) fueron en general más bajas que sus muestras correspondientes obtenidas por calandrado. Así mismo, al aumentar la resistencia a la tracción para estas formulaciones, disminuyó sustancialmente la elongación a la ruptura respecto a las películas control (Tabla 4).

**Tabla 4. Propiedades mecánicas de las películas de gelatina extruidos por calandrado y por soplado de formulaciones óptimas y controles\***

Muestra	Módulo elástico (Mpa) ± de	Tensión máxima (Mpa) ± de	Elongación (%) ± de
M1	70.6±6.64 <sup>c</sup>	14.74±1.50 <sup>d</sup>	75.14±20.14 <sup>b</sup>
M2	58.50±11.51 <sup>b</sup>	12.01±1.72 <sup>d</sup>	142.10±23.47 <sup>c</sup>
M3	45.40 ±12.83 <sup>b</sup>	9.56 ±0.71 <sup>c</sup>	109.83 ±13.34 <sup>c</sup>
M4	49.63±13.61 <sup>b</sup>	6.17 ± 0.62 <sup>b</sup>	157.35 ± 20.16 <sup>cd</sup>
M5	23.12±6.61 <sup>a</sup>	2.41±0.60 <sup>a</sup>	168.74±22.66 <sup>d</sup>
M6	20.59±2.61 <sup>a</sup>	3.67±0.39 <sup>a</sup>	167.57±13.86 <sup>d</sup>
M7	64±13.36 <sup>c</sup>	10.75±1.39 <sup>b</sup>	47.33±11.30 <sup>a</sup>
M8	24.73±5.56 <sup>a</sup>	3.78±0.93 <sup>a</sup>	46.25±5.50 <sup>a</sup>
M9	35.13±4.21 <sup>b</sup>	13.48±1.48 <sup>c</sup>	64.67±6.54 <sup>b</sup>
p ANOVA	< 0.05	< 0.05	< 0.05
DMSH	4.40	3.76	18.42

\*Media ± de (desviación estándar), n = 7, valores en cada columna independientes con las mismas letras superíndices (a, b, c, d, cd), indican que no hay diferencia entre medias, pues fueron menores entre cada dos medias que la diferencia mínima significativa honesta (DMSH) de la prueba Tukey, por lo tanto no presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos (p > 0.05). M1-M6 procesadas por extrusión-calandrado, M7-M9 procesadas por extrusión- soplado.

## Trabajo a futuro

Aunque se obtuvieron algunos resultados interesantes en estas películas de biopolímeros, se necesita más investigación para optimizar sus propiedades y extender los resultados a otras matrices naturales (como el almidón) y refuerzos (como las fibras lignocelulósicas). Además, la aplicación en empaques de tales biopelículas debe ser el objetivo para futuros trabajos.

## Conclusiones

En este trabajo, las películas extruidas a base de gelatina se produjeron con éxito mediante calandrado (uniaxial) y soplado (biaxial), aunque esto último solo fue posible con solo una formulación optimizada que contenía ácido tánico (reticulante) y nanoarcillas (reforzante). Los resultados mostraron que el agua y el glicerol actuaron como plastificantes y agentes de expansión, ya que su concentración tuvo un efecto directo en el espesor final de la película. La adición de ácido tánico y nanoarcillas aumentó generalmente el módulo elástico o de Young y la resistencia a la tensión, pero disminuyó la elongación a la ruptura de las películas.

## Agradecimientos

Se agradece el apoyo del Instituto Politécnico Nacional en México (COFAA, EDI, SNI) a través de la SIP. Se reconoce al Sr. Yann Giroux su gran apoyo en el trabajo experimental.

## Referencias

1. ASTM D883-12e1. Standard terminology relating to plastics. *West Conshohocken, PA.* (2012).
2. Danganan K, Tomasula PM and Qi P. k (2009). Structure and function of protein-based edible films and coatings. In: Huber CK and Embuscado EM (ed) *Springer*, New York 25-56.
3. *Garbacz T. (2011) Properties of triple-layered PVC coatings synthesized in the micropore coextrusion method. Polimery 56, 129-134.*
4. Giles H, Wagner J and Mount E. (2005). *Extrusion: The Definitive Processing Guide and Handbook.* William Andrew, Inc., New York . 83-89.
5. Martucci JF and Ruseckaite RA. (2010) Biodegradable bovine gelatin/Na<sup>+</sup>-montmorillonite nanocomposite films. structure, barrier and dynamic mechanical properties. *Polymer-Plastics Technol Eng (49)*, 581-588.
6. Ortiz-Zarama MA, Jimenez-Aparicio A, and Solorza-Feria J. (2016) Obtainment and partial characterization of biodegradable gelatin films with tannic acid, bentonite and glycerol. *J Sci Food Agric 96*, 3424-3431.
7. Shin SH, Kim SJ, Lee SH, et al. (2014) Apple peel and carboxymethylcellulose-based nanocomposite films containing different nanoclays. *J Food Sci 79*, E342-E353.
8. Yakimets I, Wellner N, Smith AC, et al. (2005) Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer 46*, 12577-12585.
9. Zhang X, Do MD, Casey P, et al. (2010) Chemical modification of gelatin by a natural phenolic cross-linker, tannic acid. *J Agric Food Chem 58*, 6809-6815.