

ÖZET

SAĞLIK UYGULAMALARI, ÇEVRESEL VE ENDÜSTRİYEL ALANLARDA KULLANILMAK ÜZERE BİR BİYOKOMPOZİT VE BUNUN ÜRETİM YÖNTEMİ

5

Buluş, yumurta kabuğu ve çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri içeren biyouyumlu nanokompozitlerin tek aşamalı yeşil sentez yöntemiyle üretimi ile ilgilidir. Üretim sürecinde *Althaea officinalis* bitkisinin yüksek kuersetin içerikli çiçeklerinden hazırlanan bitki özütü ve yumurta kabuğunun toz haline getirilmiş hali, çinko nitrat 10 çözeltisi ile birleştirilerek nanokompozit elde edilmiştir. Bu yenilikçi üretim yöntemiyle elde edilen malzeme; tıbbi cihazlar, implantlar, yara örtüleri, gıda ambalajları ve çevresel uygulamalarda geniş kullanım potansiyeline sahiptir.

İSTEMLER

1. Yüksek biyouyumluluk, mekanik dayanıklılık, hücre proliferasyonunu ve antimikrobiyal özellikli bir nanokompozit biyomalzemenin üretim yöntemi olup

5 özelliği;

a. *Althaea officinalis* bitkisinin pembe çiçek kısımlarının kurutulup toz hale getirilmesi,

b. ardından, toz haldeki çiçek yapraklarının 60°C'de 12 saat su banyosunda bekletilerek bitki özütünün elde edilmesi,

10 c. oda sıcaklığında soğutulan bitki özütünün no 1 filtre kağıdı ile filtre edilmesi,

d. membranından ayrılmamış yumurta kabuklarının yıkanıp kirden arındırıldıktan sonra saf su ile 4 saat kaynatılarak sterilize edilmesi,

e. ardından sterilize edilen yumurta kabukları ve yumurta membranlarının sudan uzaklaştırılması ve kül fırınında 150°C'de kurutulması,

15 f. kurutulan yumurta kabukları ve yumurta membranının havanda toz hale getirilmesi,

g. 0,149 - 1,49 gram çinko nitrat hekzahidrat ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) tartılması ve balon jojeye konularak ultra saf su ile hacimce 500 mL'e tamamlanması ile 0,001M - 0,01M $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ çözeltisinin hazırlanması,

20 h. hacimce 4:1 – 9:1 oranında çinko nitrat: bitki özütü karışımının 200 rpm'de karıştırılarak hazırlanması,

i. hazırlanan çinko nitrat: bitki özütü karışımına 2 gram toz hale getirilen yumurta kabuklarının eklenmesi ve elde edilen çözeltinin 4500 rpm'de santrifüjlenmesi,

25 j. elde edilen parçacıklarındistile su ile durulanması ve 50°C'de etüvde kurutulması

işlem adımlarını içermesidir.

30 2. İstem 1'e göre bir yöntemle elde edilen bir nanokompozit biyomalzeme olup özelliği;

a. toz hale getirilmiş yumurta kabuğu ve yumurta membranı,

b. çinko nitrat hekzahidrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve *Althaea officinalis* bitkisi özütü ile yeşil sentez yöntemi kullanılarak elde edilen 30-50 nm çapında çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri ve 24-50 nm çapında nanoçubuklar içermesidir.

TARİFNAME

SAĞLIK UYGULAMALARI, ÇEVRESEL VE ENDÜSTRİYEL ALANLARDA KULLANILMAK ÜZERE BİR BİYOKOMPOZİT VE BUNUN ÜRETİM YÖNTEMİ

5

Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan

Buluş, membranı ayrılmamış yumurta kabuğu ve toksik olmayan yeşil sentez yöntemiyle elde edilen ZnO (çinko oksit) içeren nanokompozit biyomalzeme ve bunun üretim yöntemi ile ilgilidir. Bu biyomalzeme, antimikrobiyal ve biyouyumlu özellikler göstermekte olup tıbbi cihaz kaplamaları, yara örtüleri, implant yüzeyleri gibi sağlık uygulamalarında ve ayrıca çevresel ve endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Yumurta kabuğunun geri dönüştürülerek düşük maliyetli ve sürdürülebilir bir kaynak olarak değerlendirilmesi, buluşa çevresel ve ekonomik avantajlar kazandırmaktadır. Ayrıca yapılan kapsamlı karakterizasyon ve biyolojik testlerle, bu nanokompozitlerin biyofilm inhibisyonu gibi enfeksiyon önleyici etkileri de kanıtlanmıştır.

Tekniğin Bilinen Durumu

Son yıllarda nanoteknoloji ve malzeme bilimi alanındaki ilerlemeler, biyouyumlu ve antimikrobiyal özelliklere sahip yeni nesil malzemelerin geliştirilmesine olan ilgiyi artırmıştır. Özellikle metal oksit nanopartikülleri, yüzey genişliği, reaktivite ve mikrobiyal hücrelerle etkileşim kapasitesi gibi özellikleri sayesinde tıbbi, çevresel ve endüstriyel uygulamalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu bağlamda çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri, antimikrobiyal aktivitesi, UV koruma yeteneği ve biyouyumluluğu nedeniyle dikkat çeken materyaller arasında yer almaktadır. Ancak, ZnO nanopartiküllerinin üretiminde kullanılan geleneksel kimyasal yöntemler, genellikle toksik çözücüler, yüksek sıcaklık ve enerji tüketimi gerektirmekte, bu da hem çevresel hem de ekonomik açıdan önemli dezavantajlar yaratmaktadır.

Tıbbi ve biyomedikal malzemelerin üretildiği kaynakların maddi açıdan maliyetli ve sentez aşamalarının uzun olması ürün fiyatlarına yansımaktadır. İhtiyaç dahilinde elde edilmesini ve üretim aşamalarına geçilmesini zorlaştırmaktadır.

Ayrıca, geleneksel sentez tekniklerinin getirdiği bir diğer önemli sorun da çevreye zararlı yan ürünlerin oluşmasıdır. Bu süreçler, özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanılacak materyaller için ek saflaştırma adımları gerektirdiğinden maliyetli ve zaman alıcı olabilmektedir. Ayrıca, sentezde kullanılan kimyasalların kalıntıları, nihai ürünün biyouyumluluğunu olumsuz etkileyebilmekte ve tıbbi uygulamalarda kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, çevre dostu, sürdürülebilir ve toksik olmayan alternatif sentez yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik arayışlar artmaktadır. Son dönemde özellikle bitki özleri kullanılarak gerçekleştirilen "yeşil sentez" yöntemleri, bu tür problemlere çözüm sunmak amacıyla ön plana çıkmıştır.

- 10 Yeşil sentez yöntemleriyle ilgili mevcut literatürde pek çok çalışma bulunmakta olup, bu çalışmalar genellikle metal oksit nanopartiküllerinin sentetik polimer matrisler veya çeşitli organik yapılarla birleştirilmesi üzerine yoğunlaşmaktadır. Ancak bu yaklaşımlarda çoğu zaman kullanılan biyolojik matrislerin temin ve işleme süreçleri karmaşık ve maliyetlidir. Örneğin; bazı çalışmalarda, yumurta kabuğu membranı gibi biyolojik atıklar kullanılsa da bu membranların kabuk yapısından ayrıştırılması işlemi fazladan iş yükü ve enerji tüketimi oluşturmaktadır [1,2]. Ayrıca, bu tür materyallerin yalnızca belirli kısımlarının kullanılması, geri dönüşüm potansiyelini sınırlamakta ve malzemenin çevresel sürdürülebilirliğine zarar vermektedir.

- Mevcut uygulamalarda karşılaşılan bir diğer sınırlama ise, biyolojik testlerin sınırlı düzeyde yapılmasıdır. Nanokompozitlerin üretildiği pek çok çalışmada, yalnızca temel antimikrobiyal testlerle yetinilmekte ve biyouyumluluk, biyofilm inhibisyonu, hemoliz gibi parametreler çoğunlukla göz ardı edilmektedir. Bu çalışmalara CN103566921A numaralı patent başvurusu örnek olarak verilebilir. Bu durum, geliştirilen malzemelerin gerçek dünya uygulamalarında karşılaşılabileceği biyolojik etkilere dair yeterli bilgi sunmamakta ve klinik ya da endüstriyel kullanımı kısıtlamaktadır. Ayrıca, tek basamaklı ve düşük maliyetli üretim süreçlerine uygunluğu test edilmemiş sistemlerin, sanayi ölçekli üretime entegrasyonu da çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Dolayısıyla, biyomalzeme geliştirme alanında halen aşılması gereken teknik ve pratik zorluklar bulunmaktadır.

- 30 Mevcut teknikteki çözümlerin kısıtlılıkları ve yetersizlikleri, geleneksel sentez yöntemlerinde kullanılan toksik kimyasalların ürünlerin biyouyumluluğunu azaltması, üretim süreçlerinin yüksek enerji tüketimi ve maliyetli olması, çevreye zararlı yan ürünlerin oluşarak ek saflaştırma işlemlerini gerekli kılması, kullanılan biyolojik

matrislerin temin ve işlenme aşamalarının karmaşık ve ekonomik olmaması, malzemelerin geri dönüşüm potansiyellerinin sınırlandırılması, biyomalzemelerin yalnızca temel düzeyde biyolojik testlere tabi tutulması ve düşük maliyetli üretim süreçlerine uygun sistemlerin geliştirilmemesi gibi sebepler dolayısıyla nanokompozit biyomalzeme alanında bir geliştirme yapılması gerekli kılınmıştır.

Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları

Buluş, yumurta kabuğu ve membranının birlikte toz hale getirilerek, çinko nitrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) ve *Althaea officinalis* bitkisi özütü ile yeşil sentez yöntemi kullanılarak çinko oksit (ZnO) nanopartiküller içeren biyoyumlu bir nanokompozit malzeme elde edilmesi ile ilgilidir. Yumurta kabuğu doğal matris yüzeyi sağlarken, çinko nitrat, ZnO oluşumu için gerekli metal kaynağını, bitki özütü ise indirgeme ajanı olarak görev yapmaktadır. Bu sayede antimikrobiyal ve biyoyumlu özelliklere sahip, toksik olmayan ve sürdürülebilir bir biyomalzeme geliştirilmiştir.

Buluşun bir amacı, atık geri dönüşümünü destekleyen bir nanokompozit elde etmektir. Buluşta, çevrede bolca bulunan ve çoğunlukla atık olarak değerlendirilen yumurta kabukları, membranıyla birlikte ayrıştırma gerektirmeden kullanarak değerli bir biyomalzeme elde edilmektedir. Böylece hem atık yönetimine katkı sağlanmakta hem de düşük maliyetli, sürdürülebilir bir hammadde kaynağı elde edilmektedir.

Buluşun başka bir amacı, yeşil sentez yöntemiyle toksik olmayan nanokompozit elde etmektir. Kimyasal sentez süreçlerinde kullanılan toksik maddelerin çevreye ve biyolojik sistemlere olan zararlarını ortadan kaldırmak amacıyla, bitki özütü kullanılarak yeşil sentezle nanokompozit üretilmesi hedeflenmiştir. Bu yöntemle çevre dostu, güvenli ve biyoyumlu malzemeler elde edilerek hem sağlık hem de çevresel uygulamalarda kullanılabilecek nitelikte bir ürün haline getirilebilmektedir.

Ek olarak buluşta biyoyumlu ve antimikrobiyal özelliklere sahip bir nanokompozitin elde edilmesi amaçlanmaktadır. Buluş kapsamında üretilen ZnO katkılı nanokompozitler, antimikrobiyal özellik göstermesi ve biyolojik sistemlerle uyumlu olması sağlanarak, bu malzemelerin tıbbi cihaz kaplamaları, yara örtüleri ve implant yüzeyleri gibi uygulamalarda kullanılabilir hale getirilmektedir. Bu sayede enfeksiyon risklerinin azaltılması ve biyomalzeme performansının artırılması sağlanmaktadır.

Buluşun başka bir amacı, düşük üretim maliyeti ve sürecine sahip bir nanokompozit elde etmektir. Buluş, yumurta kabuğu ve membranının ayrılmadan tek adımda kullanılmasıyla, üretim sürecini kısaltmakta ve iş yükünü azaltmaktadır. Bu da sanayiye uygun, ekonomik, hızlı ve büyük ölçekli üretime elverişli bir sistemin oluşturulmasına imkân tanımaktadır.

Ek olarak, buluşun başka bir amacı çok yönlü kullanım potansiyeline sahip bir nanokompozit elde etmektir. Yapılan kapsamlı karakterizasyon, biyolojik uyumluluk ve antimikrobiyal testlerle, geliştirilen nanomalzemenin yalnızca tıbbi değil, aynı zamanda gıda ambalajı, su arıtımı ve çevresel sensörlerde de kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu durum, buluşun çok disiplinli alanlarda katma değer yaratmasını ve geniş uygulama alanlarına hitap etmesini sağlamaktadır.

Şekillerin Açıklaması

Şekil 1. Yeşil sentez sırasında oluşan çinko nitrat (ZnO) nanoyapıların UV-Vis absorbands değeri (ZnO@YK1; hacimce 4:1 oranında 0.001 M Çinko Nitrat Hekzahidrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): bitki özütü içeren, ZnO@YK2; hacimce 4:1 oranında 0.01 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: bitki özütü içeren, ZnO@YK3; hacimce 9:1 oranında 0.001 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: bitki özütü içeren, ZnO@YK4 hacimce 9:1 oranında 0.01 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: bitki özütü içeren nanokompozit)

Şekil 2. a) ZnO@YK1, b) ZnO@YK2, c) ZnO@YK3, ve d) ZnO@YK4 nanokompozit numunelerinin TEM görüntüleri

Şekil 3. Boş yumurta kabuğu ve nanokompozitlerin biyofilm inhibisyon sonuçları (YK; boş yumurta kabuğu)

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Buluş, yüksek biyoyumluluk, mekanik dayanıklılık, hücre proliferasyonunu ve antimikrobiyal özellikli bir nanokompozit biyomalzeme ve bunun üretim yöntemi ile ilgilidir. Buluşa konu nanokompozit biyomalzemenin üretim yöntemi şu işlem adımlarını içermektedir;

- a. *Althaea officinalis* bitkisinin pembe çiçek kısımlarının kurutulup toz hale getirilmesi,

- b. ardından, toz haldeki çiçek yapraklarının 60°C'de 12 saat su banyosunda bekletilerek bitki özütünün elde edilmesi,
- c. oda sıcaklığında soğutulan bitki özütünün no 1 filtre kağıdı ile filtre edilmesi,
- d. membranından ayrılmamış yumurta kabuklarının yıkanıp kirden arındırıldıktan sonra saf su ile 4 saat kaynatılarak sterilize edilmesi,
- 5 e. ardından sterilize edilen yumurta kabukları ve yumurta membranlarının sudan uzaklaştırılması ve kül fırınında 150°C'de kurutulması,
- f. kurutulan yumurta kabukları ve yumurta membranının havanda toz hale getirilmesi,
- 10 g. 0,149 - 1,49 gram çinko nitrat hekzahidrat ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) tartılması ve balon jojeye konularak ultra saf su ile hacimce 500 mL'e tamamlanması ile 0,001M - 0,01M $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ çözeltisinin hazırlanması,
- h. hacimce 4:1 – 9:1 oranında çinko nitrat: bitki özütü karışımının 200 rpm'de karıştırılarak hazırlanması,
- 15 i. hazırlanan çinko nitrat: bitki özütü karışımına 2 gram toz hale getirilen yumurta kabuklarının eklenmesi ve elde edilen çözeltinin 4500 rpm'de santrifüjlenmesi,
- j. elde edilen parçacıklarındistile su ile durulanması ve 50°C'de etüvde kurutulması.
- 20 **Buluşa konu nanokompozit biyomalzeme;**
- a. toz hale getirilmiş yumurta kabuğu ve yumurta membranı,
- b. çinko nitrat hekzahidrat ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) ve *Althaea officinalis* bitkisi özütü ile yeşil sentez yöntemi kullanılarak elde edilen 30-50 nm çapında çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri ve 24-50 nm çapında nanoçubuklar
- 25 içermektedir.

Althaea officinalis bitkisinin çiçek kısımlarının (pembe, kırmızımsı pembe ve beyaz) HPLC-DAD cihazı ile kuersetin içeriğini belirlenmiştir. En yüksek kuersetin içeriğine sahip olan pembe çiçek kısımları sentez içeriği için tercih edilmiştir . (Tablo 1).

30

Tablo 1. *Althaea officinalis*'ten elde edilen bitki özlerindeki kuersetin miktarları

Bitki Ektraktı	Ret. time	Pik Alan	Pik Yükseklik	Kuersetin konsantrasyonu (ppm)
Kırmızımsı Pembe	4.052	2467723	175976	62.799

Beyaz	4.039	297679	230412	82.225
Pembe	4.034	2835548	247863	88.452

Buluştta gerçekleştirilen analizler için hazırlanan nanokompozit numunelerinin içeriği Tablo 2’de gösterilmektedir. Burada ZnO@YK1, ZnO@YK2, ZnO@YK3, ZnO@YK4 şeklinde kodlanan karışımlar, hazırlanan nanokompozitlerin içerdiği çinko nitrat hekzahidrat molaritesi ve çinko nitrat: bitki özütü oranına göre değişiklik göstermektedir.

Tablo 2. Sentezlenen nanokompozitlerin içerikleri

Sentezlenen nanokompozitler	Çinko Nitrat Hekzahidrat (Molarite-M)	Yumurta Kabuğu (gram-g)	Çinko nitrat: bitki özütü (v/v-hacim/hacim)
ZnO@YK1	0.001	2	4/1
ZnO@YK2	0.01	2	4/1
ZnO@YK3	0.001	2	9/1
ZnO@YK4	0.01	2	9/1

Sentez sonrası elde edilen nanokompozitler çinko oksit nanopartiküllerinin varlığı UV-spektral analizi ile doğrulanmış ve sentez, kolloidal çözeltinin renk değişimiyle gözlemlenmiştir. Nanokompozitlerin UV spektral analizi 300-400 nm aralığında yapılmıştır. Sentez sürecinde gözlenen pembe renkten sarıya, ardından yeşilimsi açık kahverengiye dönüşen renk değişimi, ZnO nanoparçacıklarının oluşumuna işaret etmektedir. Şekil 1’de verilen UV-Vis spektroskopisi ile yapılan analizde 384 nm’de belirgin bir absorbans zirvesi gözlemlenmiş, bu da ZnO nanoparçacıklarının başarıyla sentezlendiğini teknik olarak doğrulamıştır.

XRD analizi, Cu K α radyasyonu ile 10°–90° 2 θ aralığında gerçekleştirilmiştir. ATR-FTIR spektrumları 4000–400 cm⁻¹ aralığında ölçülmüştür. SEM ve EDX analizleri için numuneler platin kaplanarak morfoloji ve elementel haritalama yapılmıştır.

Ayrıca, ZnO nanoyapılar TEM ile incelenmiştir. TEM analiz sonuçları, ZnO@YK nanokompozitlerinin morfolojik yapılarının daha iyi karakterize edilmesi amacıyla Şekil 2’de sunulmuştur. Analizler, yumurta kabuğu tozu üzerinde oluşan belirgin çinko oksit

yapılarının varlığını ortaya koymuştur. Özellikle nanokompozit yapıda nanorod (çubuk şeklinde) yapıların bulunduğu belirlenmiş, ayrıca nanoparçacık ve küçük çaplı nanorod yapılar gözlemlenmiştir. Bu yapılar, SEM görüntüleriyle de uyum göstermektedir. *Althaea officinalis* bitkisinin pembe çiçeklerinden elde edilen özütün biyomoleküler içeriği, bu özel nanoparçacık morfolojilerinin oluşumunda önemli rol oynamıştır. Geleneksel yöntemlerde kullanılan kuvvetli bazlar veya yüzey aktif maddelere ihtiyaç duyulmadan, çevre dostu ve toksik olmayan bir yeşil sentez yöntemiyle çinko oksit nanorodların üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir.

10 Nanokompozitlerin minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) deneyi (Resazurin boyası ile) ve antimikrobiyal agar kuyu difüzyon testleri *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri suşları ve *C. albicans* ATCC 10239 mantarlarına karşı gerçekleştirilmiştir. MİK testinde Mueller-Hinton Buyyon (MHB) besiyerine ekilen patojenler 1 gece 37°C'de inkübasyonun ardından belirli konsantrasyonlara seyreltilerek 96 kuyucuklu plakalara aktarılıp ardından belirli konsantrasyonlarda eklenen nanokompozit numuneleri ile inkübasyonun ardından kuyucuklara resazurin boyası eklenerek hem kalorimetrik hem de bakteri optik yoğunlukları (OD) ölçülerek antimikrobiyal aktiviteleri gözlemlenmiştir. MİK aktiviteleri gözlemlenen mikroorganizmalara agar kuyu difüzyon tekniği uygulanarak nanokompozitin besiyerinde oluşturduğu inhibisyon zon bölgesi tespit edilmiştir (Tablo 3). *P. aeruginosa* ve *E. coli* gibi patojen bakteriler, yüzeylerde biyofilm oluşturarak antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilir ve bağışıklık sisteminden kaçabilirler. *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri, farklı konsantrasyonlardaki (2, 1 ve 0.5 mg/ml) yumurta kabuğu tozu, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitleri kullanılarak değerlendirildi. Yumurta kabuğu tozu biyofilm oluşumunu anlamlı şekilde engellemezken, ZnO@YK2 ve özellikle ZnO@YK4 nanokompozitleri 2 mg/ml konsantrasyonunda *E. coli* biyofilm oluşumunu sırasıyla %25 ve %27 oranında azaltmıştır. *P. aeruginosa*'ya karşı ise ZnO@YK4, aynı konsantrasyonda %30 biyofilm inhibisyonu sağlamıştır. Sonuç olarak ZnO@YK4 nanokompoziti her iki bakteri türüne karşı biyofilm oluşumunu engellemede daha etkili bulunmuştur.

Tablo 3. Mikroorganizmalara karşı yapılan agar kuyu difüzyon testinin zon çapları (mm)

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Candida albicans</i> ATCC 10239
Chlorhexidine	17	13	16	13
YK	-	-	-	-
ZnO@YK2	14	10	-	9
ZnO@YK4	14	9	8	-

Elde edilen nanokompozitlerin insan kırmızı kan hücreleri ve fosfat tamponlu salin (PBS) kullanılarak hemoliz oranları belirlenmiştir. Kan örneğinin PBS ile yıkanması ve santrifüjü sonrası elde edilen kırmızı kan hücrelerine belirli oranlarda nanokompozit numuneleri eklenip 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası santrifüj edilen örneklerin süpernatantları UV kuvetine aktararak hemoglobin salınımı, 540 nm'de absorbans (A) olarak UV spektrofotometri ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar hemoliz denklemi eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır.

$$Hemoliz\% = \frac{(A)_{\text{örnek}} - (A)_{\text{negatif kontrol}}}{(A)_{\text{pozitif kontrol}} - (A)_{\text{negatif kontrol}}} \times 100$$

Eşitlik 1

Tablo 4. Yumurta kabuğu tozunun ve sentezlenen nanokompozitlerin hemoliz değerleri. (Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalama standart hatası olarak gösterimiştir.)

Örnek	Hemoliz (%)
YK	1.66 $\pm$ 0.19
ZnO@YK1	0.88 $\pm$ 0.22
ZnO@YK2	2.66 $\pm$ 0.19
ZnO@YK3	4.00 $\pm$ 0.50
ZnO@YK4	3.44 $\pm$ 0.44

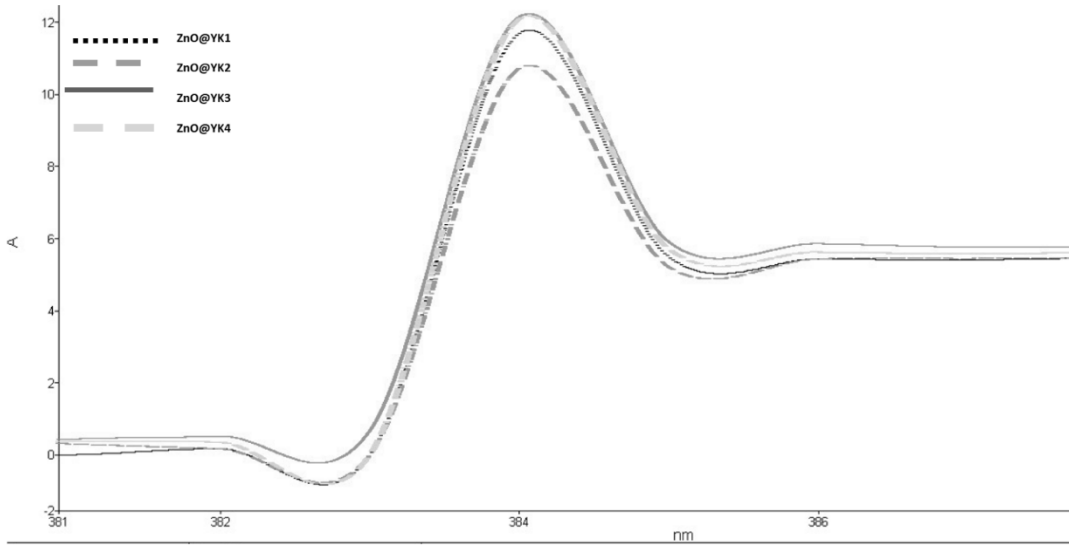
Nanokompozitlerin biyoyumluluğu, L929 hücrelerinde MTT indirgeme testi ile değerlendirilmiştir. Hücreler %10 fetal sıgır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren ortamda, 37 °C'de %5 karbondioksit (CO₂) koşulunda kültürlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlardaki yumurta kabuğu ve nanokompozit örnekleri hücrelere

uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından MTT eklenip 3 saat daha inkübasyon yapıldı ve 570 nm'de ölçüm alınarak hücre canlılıkları belirlenmiştir.

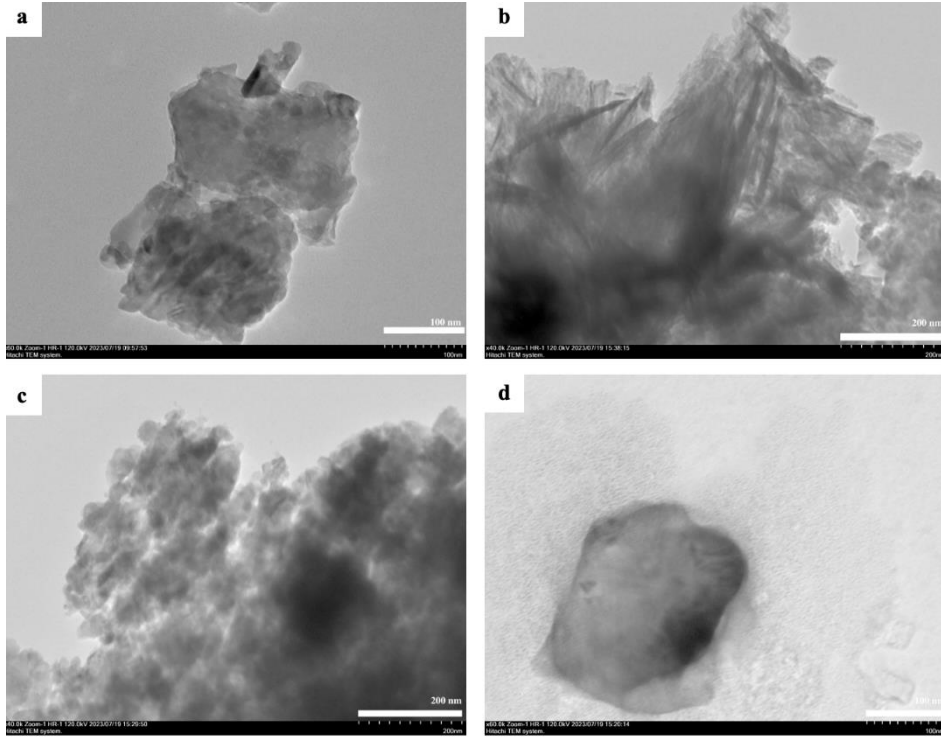
5 Buluşta toksik olmayan yeşil sentez yöntemi ile tek aşamada başarılı bir şekilde nanokompozit malzeme üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu durum hem maliyeti azaltıp üretim sürecini kısaltmış hem de toksik olmayan bir sentez yönteminin avantajlarını sunmuştur. Ayrıca doğal ve atık olarak çevrede kirlilik yaratan yumurta kabuklarının eşsiz özelliklerini (biyoyumlu, antimikrobiyal proteinler, makro-mikro gözenekler gibi) fırsata çevirerek sürdürülebilir bir yaklaşım ile atık malzemenin geri dönüştürülmesi 10 sağlanmıştır. Yumurta kabuğu ile sentezlenen nanokompozit malzemelere yapılan sınırlı in vitro testler buluşta genişletilerek potansiyel biyomalzeme özellikleri ön plana çıkarılmıştır. Yapılan antimikrobiyal ve biyofilm inhibisyon deneyleri sonucunda nanokompozitlerin antimikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumda antimikrobiyal özelliğe sahip nanokompozit malzememizin biyofilm inhibisyonu, 15 mikroorganizmaların yüzeylerde koloni oluşturmalarını engelleyerek enfeksiyon riskini azaltmaktadır. Bu, özellikle tıbbi cihazlar ve implantlarda mikrobiyal direnç gelişimini önleyerek tedavi etkinliğini artırmaktadır. Ayrıca, endüstriyel ve çevresel uygulamalarda yüzey korozyonu ve biyolojik kirlenmeyi minimize etmektedir.

Referanslar

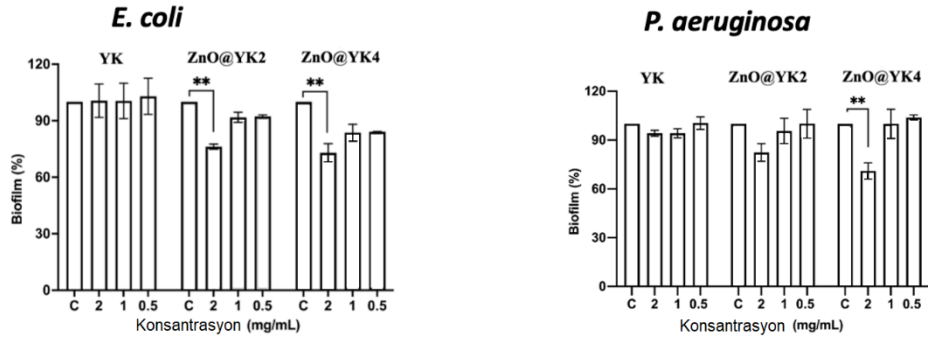
1. Elsayed, M. S., Ahmed, I. A., Bader, D. M., & Hassan, A. F. (2021). Green synthesis of Nano Zinc oxide/nanohydroxyapatite composites using date palm pits extract and eggshells: Adsorption and photocatalytic degradation of methylene blue. *Nanomaterials*, 12(1), 49. <https://doi.org/10.3390/nano12010049>
2. Tollu, G., Yabalak, E., Özdemir, S., Işık, Z., & Dizge, N. (2024). Synthesis of Cao-FE and Cao-AG nanocomposites using raw and hydrolyzed waste chicken eggshell and investigation of their antimicrobial, biofilm inhibition activity, DNA cleavage ability, and antioxidant activity properties. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(3), 4449–4463. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05271-4>



Şekil – 1



Şekil – 2



Şekil – 3