

Yeşil Sentez Yöntemi ile *Althaea officinalis* Kaynaklı Nanokompozitlerin Karakterizasyonu ve Hemolitik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Characterization of Nanocomposites Obtained from *Althaea officinalis* and Evaluation of Their Hemolytic Activities via Green Synthesis Method

Büşra ŞENSOY GÜN^{1,2}, Belgin TUNALI¹, Rafiq GURBANOV^{1,3}

¹ Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (BARUM), Bilecik, Türkiye

² Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Nanobilim ve Nanoteknoloji Bölümü, Burdur, Türkiye

³ Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bilecik, Türkiye

Article Info

Research Article

DOI: 10.29048/makufebed.1402681

Corresponding Author

Büşra ŞENSOY GÜN

Email: busra.sensoygun@bilecik.edu.tr

Article History

Received: 11.12.2023

Revised: 17.01.2024

Accepted: 18.01.2024

Available Online: 15.06.2024

To Cite

Şensoy, Gün, B., Tunali, B., & Gurbanov, R. (2024). Yeşil sentez yöntemi ile *Althaea officinalis* kaynaklı nanokompozitlerin karakterizasyonu ve hemolitik aktivitelerinin değerlendirilmesi. *The Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences of Mehmet Akif Ersoy University*, 15(1), 22-32. <https://doi.org/10.29048/makufebed.1402681>

Bu makale Büşra ŞENSOY GÜN'ün "Yeşil sentez ile sentezlenen ZnO@YK nanokompozitinin antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesi ve ZnO@YK nanokompoziti kullanılarak hazırlanan merhem in vivo deneylerle kapasitesinin in vivo deneylerle araştırılması" başlıklı doktora tezinden üretilmiştir.

Öz: Bu çalışmada toksik olmayan yeşil sentez yöntemi ile yumurta tozu kullanılarak metal oksit nanokompozitleri sentezlenmiştir. Burdur yöresinden toplanan *Althaea officinalis* (*A. officinalis*-hatmi) bitkisinin kırmızımsı-pembe çiçek kısımlarından farklı çözücülerle (etanol, metanol, aseton ve ultra saf su) bitki özütleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu bitki özütlerinin kuersetin ve gallik asit miktarları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizi ile tespit edilmiştir. HPLC analiz sonuçlarına göre seçilen bitki özütü ile toz hale getirilen ve temel inorganik bileşeni CaCO₃ olan yumurta kabuğu tozu metal çözeltilerine eklenerek nanokompozit yapılar sentezlenmiştir. Elde edilen nanokompozit yapıların Zayıflatılmış Toplam Yansıma- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR), X-ışını Difraksiyon Spektroskopisi (XRD) ve Enerji Dağılımlı X-Ray Dedektörlü Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-EDX) analizleri ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda MgO ve Al₂O nanopartikülleri (NP) içeren nanokompozitler sentezlenmiştir. Sentezlenen nanokompozitlerin hemoliz deneyleri sonucunda hemouyumlu oldukları tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yumurta kabuğu, nanokompozit, yeşil sentez, metal nanopartiküller, *Althaea officinalis*

ABSTRACT: In this study, metal oxide nanocomposites were synthesized using eggshell powder with a non-toxic green synthesis method. Plant extracts were prepared with different solvents (ethanol, methanol, acetone and ultrapure water) from the reddish-pink flower parts of the *Althaea officinalis* (*A. officinalis* - marshmallow) plant collected from the Burdur region. Quercetin and gallic acid amounts of these prepared plant extracts were determined by HPLC High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis. According to the HPLC analysis results, nanocomposite structures were synthesized by adding eggshell powder, the main inorganic component of which is CaCO₃, which was pulverized with the selected plant extract, to metal solutions. Characterization studies of the obtained nanocomposite structures were carried out by Attenuated Total Reflectance- Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray Diffraction Spectroscopy (XRD) and Scanning Electron Microscope with Energy-Dispersive X-ray Detector (SEM-EDX) analyses. As a result of the study, nanocomposites containing MgO and Al₂O nanoparticles (NP) were synthesized. It was determined that the synthesized nanocomposites were hemocompatible as a result of hemolysis experiments.

Keywords: Eggshell, nanocomposite, green synthesis, metal nanoparticles, *Althaea officinalis*

1. GİRİŞ

Giderek artan nüfusa bağlı olarak mevcut doğal kaynakların azalması ve artan çevre sorunlarına ilişkin endişeler çoğalmaktadır. Doğal kaynak atıklar kullanılarak biyotemelli malzemelerin üretimi bu sorunların önüne geçmek için iyi bir çözüm yöntemi olarak kabul edilmektedir. Düşük maliyetli doğal atıkların kullanılması maliyetlerin azalmasını da sağlamaktadır. Kalsiyum karbonat yaygın olarak kullanılan bir inorganik dolgu maddesidir. Son zamanlarda bu inorganik (kireç taşı gibi) dolgu maddeleri yerine yüksek kalsiyum karbonat içeriği bulunan tavuk yumurta kabukları gibi atık biyomateryaller tercih edilmektedir (Owuamanam ve Cree, 2020). Ayrıca, dünya çapında atık tavuk yumurtası kabukları, çevresel sorunlara neden olan çöplüklere atılmaktadır. Bu atıkların ayrışması amonyak, hidrojen sülfür ve kötü kokulara neden olan aminler üretmektedir. Bu kötü kokuya ise fare, sıçan, sinek ve böcek gibi canlılar gelerek *Escherichia coli* ve *Salmonella* gibi patojenlerin yayılmasında etkili olmaktadır (Bee ve Abdul, 2020; Owuamanam ve Cree, 2020). Bütün bunların yanında yumurta kabuğunun makro/mikro gözenek yapısına ve zar kısmının antimikrobiyal özelliğe sahip olması birçok alanda kullanılmasına avantaj sunmaktadır (Martel vd., 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalarda yumurta kabuğu kullanılarak sentezlenen nanokompozitler adsorban, katalizör, fotodegradasyon, doku iskelesi, antimikrobiyal özellikte nanomalzeme yapımında kullanılmıştır (Li vd., 2018; Ding vd., 2020; Huang vd., 2020a; Gupta vd., 2021; Türköz Altuğ, 2022; Kaya Kınaytürk vd., 2021; Kalaycı vd., 2023).

Son yıllarda ilgi gören disiplinler arası araştırma alanlarından biri olan nanoteknoloji, nano yapıların gelişmiş ve eşsiz özelliklere sahip olması, daha az malzeme ve enerji kullanımının yanında nanomalzemelerin sentez yöntemlerinin geliştirilmesiyle sayısız uygulama alanlarında kullanımı hızla ilerlemektedir. Bu nanoyapılardan biri de farklı boyut ve şekilde sentezlenebilen metalik nanopartiküllerdir. Metal nanopartiküller eşsiz optik, elektronik özelliklere ve daha büyük yüzey alan/hacim oranına sahip oldukları için görüntüleme teknikleri, tıp sektörü, ilaç salınımı, biyosensör ve biyomedikal malzemeler dahil birçok alanda kullanılmaktadır (Ijaz vd., 2020). Nanomalzemelerin çevresel olarak sürdürülebilir şekilde sentezlenmesi için yeşil kimyaya ihtiyaç duyulmuştur. Son zamanlarda giderek artan yeşil sentez, diğer nanomalzeme sentez yollarına göre toksik olmayan, güvenli, çevre dostu, sürdürülebilir, tekrar edilebilirliği yüksek, daha hızlı, büyük ölçekli üretim ve sıklıkla daha kararlı malzemelerle sonuçlandığı için daha çok tercih edilmektedir (El-Borady vd., 2021; Palithya vd., 2021; Oves vd., 2022). Kimyasal olarak sentezlenen materyallerin insan sağlığını olumsuz etkilemesi ve çevresel toksisitesi bulunduğu için sentezlenen nanomalzemelerin biyo-uyumluluğuna dikkat edilmelidir (Bindhu vd., 2020; Rohaizad vd., 2020; Renuka vd., 2020). Bitkiler, diğer biyolojik sentetik yöntemlere göre daha avantajlı olduğu için kullanılmaktadır. Çünkü bitkiler, nanopartikül sentezlemek için kullanılan mikroorganizmalara kıyasla

uzun süren bakteri/mantar kültür üretimini ve bu kültürlerin koruma ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. Ek olarak bitki ile nanopartikül sentezinde kontaminasyon riski de bulunmamaktadır (Barakat vd., 2020; Swilam ve Nematallah, 2020). Bitki özütlerinin kullanımının nanopartikül boyutunu, şeklini ve dağılımını düzenlemede daha seçici ve etkili olduğu bilinmektedir (Muthu ve Priya, 2017). Bitkilerin kök, yaprak, gövde ve meyve gibi kısımlarında hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak işlev gören flavonoidler, tanenler ve fenolik bileşikler gibi fitokimyasallar içerikler nanopartikül sentezlemek için kullanılmıştır (Maisa ve Awwad, 2021). Ayrıca nanopartiküllerin stabil kalması için antioksidan bileşiklerden yararlanılmıştır (Saribuğra, 2014). Yaygın bir flavonoid olan kuersetin ile fenolik bileşik olan gallik asit birçok çalışmada nanopartikül sentezinde önemli antioksidan bileşikler olarak belirtilmiştir. Gallik asit ve kuersetin birçok metal ile kolayca kompleks oluşturarak parçacığın oksitlenmesini engelleyerek stabilize ederken parçacığa antibakteriyel özellik de katmaktadır (Mittal vd., 2014; Lunkov vd., 2020).

Kompozit malzemeler birbirinden farklı özelliklerdeki iki veya daha fazla materyalin bir araya gelmesi ile üretilen hibrit materyallerdir. Nanokompozitler ise nano boyutta iki farklı materyalin birleşmesiyle oluşmaktadır. Genelde makro yüzeye sahip bir malzeme ile nano boyutta bir malzemenin hibritleşmesi ile meydana gelmektedir. Nanokompozitler tasarlanabilir eşsiz özellikleri ve değiştirilebilir fonksiyonları nedeniyle birçok endüstride kilit rol oynamaktadırlar (Adeosun vd., 2012). Çok sayıda nanokompozit üretim yöntemi bulunmaktadır. Fakat yapılan son çalışmalarda artık yeşil sentez ile nanokompozit tek bir basamakta üretilebilmektedir (Huang vd., 2020b).

Althaea officinalis bitkisi *Malvaceae* ailesine aittir ve dünya çapında yetiştirilmektedir. Çiçekler terminal ve aksiller yapıda olup; her biri bir, iki veya üç çiçek taşıyan kısa pediküllere sahiptir. Yapraklar soluk pembe, kırmızımsı pembe ve nadiren beyaz renklidir. Terapötik özelliğe sahip olan bu bitki geleneksel olarak ağız ve faringeal mukozanın (kuru öksürük ile ilişkili olan) tahrişinin tedavisi için, hafif gastrit, cilt yanıkları, böcek ısırıkları, gastrointestinal sistem, idrar yolu şikayetlerinde, iltihaplanma, ülser, apse, yanık, kabızlık ve ishal için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bitki antimikrobiyal, antienflamatuar, immünomodülatör etki gibi birçok farmakolojik etkiye sahiptir (Snafi, 2013). Yüksek oranda antioksidan bileşik içeriğine sahip bitkilerin nano partikül sentezi için en iyi adaylardan biri olduğu bilinmektedir. *A. officinalis* bitkisinin çiçek kısımlarının kırmızımsı pembe çiçekleri daha fazla antioksidan aktiviteye sahiptir ve antioksidan aktivitenin gücü kırmızımsı pembe> pembe> beyaz şeklindedir (Sadighara vd., 2012). *A. officinalis* bitkisi doğada kendiliğinden yetişen, maliyeti düşük ve çiçek kısımlarının antioksidan içeriği yüksek olduğu bilindiği için çalışmamızda tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, çevrede atık olarak bol miktarda bulunan bir inorganik dolgu malzemesi olan yumurta kabukları toz

haline getirilerek; *A. officinalis* bitkisinin çiçek kısımlarından hazırlanan bitki ekstraktı ve metal solüsyonları kullanılarak farklı nanokompozitler sentezlendi. Bitki özütlerindeki kuersetin ve gallik asit miktarları HPLC yöntemi ile belirlendi. Biyosentez yöntemi ile sentezlenen nanokompozitlerin karakterizasyon çalışmaları ATR-FTIR, XRD spektroskopisi ve SEM-EDX görüntüleme cihazları kullanılarak gerçekleştirildi. Öte yandan malzemelerin hemolitik aktiviteleri hemoliz testi ile biyokimyasal olarak belirlendi.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu çalışmada *A. officinalis* bitkisinin kırmızımsı pembe çiçek kısımları Burdur yöresinden toplanmıştır. Yumurta kabukları marketlerden temin edilmiştir. Etanol Indosaw, aseton, metanol Isolab marka kullanılmıştır. Bitki özütü ve çözeltiler Human Corporation, Zener 900 (UP:≤18,3MΩcm) cihazından alınan ultra saf su ile hazırlanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. *Althaea officinalis* bitkisinin kırmızımsı pembe çiçek kısımlarından farklı çözücülerle bitki özütü eldesi

Bitki özütleri Kiselev vd. (2007) metodunun modifiye edilmesi ile hazırlanmıştır. Burdur yöresinden toplanan *A. officinalis* (hatmi) bitkisinin kırmızımsı pembe çiçek kısımları ultra saf suda yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulup ince toz hale getirilen çiçek kısımlarından 0,5 gram tartılarak üzerlerine 2,5 ml etanol, metanol, aseton ve ultra saf su eklenmiştir. 2 dakika homojenizatörde karıştırıldıktan sonra, 1 gece 45°C'deki su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler 8 ml çözücüler eklenerek 2 dk homojenizatörde karıştırıldıktan sonra 4.500 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımları alınarak 45°C'deki etüvde çözücüler uçana kadar bekletildi. Elde edilen ekstraktlara HPLC analizi yapılmıştır (Kiselev vd., 2007).

2.2.2. HPLC analizi

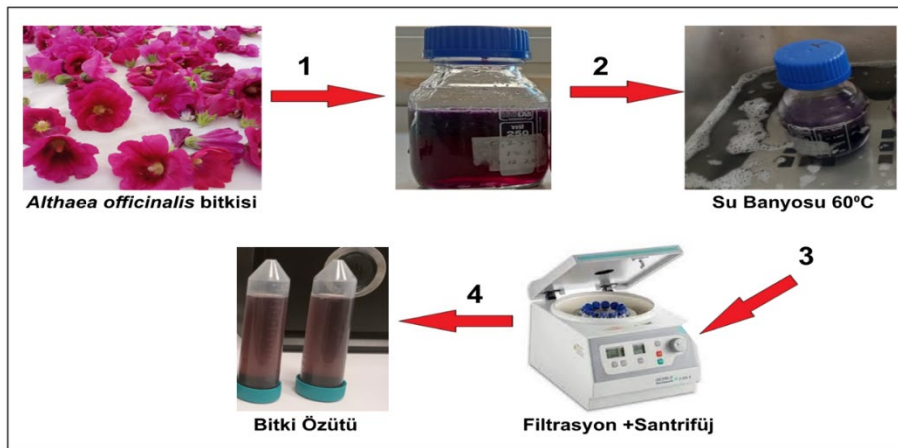
Hazırlanan bitki ekstraktlarındaki kuersetin ve gallik asit miktarlarına, HPLC kullanılarak, Gomes vd. (1999)'nun HPLC metodu modifiye edilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz Shimadzu Prominence Marka HPLC-DAD cihazı, LC20 AT pompası ve Zorbax C18 (250*4,6 mm, 5 mikron) kolonu ile yapılmıştır. Gradient programı: %93 A (3% Formik asit) + %7 B(metanol) 3 dakika, %72 A + %28 B 25 dakika, %67 A + %33 B 32 dakika, %58 A + %42 B 2 dakika, %50 A + %50 B 8 dakika, %30 A + %70 B 5 dakika, %93 A + %7 B 15 dakika olarak toplam 90 dakika sürmüştür. Elde edilen sonuçlara göre kuersetin ve gallik asit miktarlarının ortalama olarak en iyi olan örnek seçilerek devam edilmiştir. Bu yüzden nanokompozit sentezine ultra saf su ile hazırlanan bitki özütü ile devam edilmiştir.

2.2.3. *Althaea officinalis* bitkisinin kırmızımsı pembe çiçek kısımlarından bitki özütü eldesi

A. officinalis bitkisinin kırmızımsı pembe çiçek kısımları toplanıp ultra saf su ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurularak Şekil 1'de gösterildiği gibi bitki özütü sentezi gerçekleştirilmiştir. Agat havanda ince toz hale getirilen çiçek kısımlarından ikişer gram alınarak 200 ml ultra su içeren 250 ml'lik 2 ayrı şişeye aktarıldıktan sonra 60°C'lik bir su banyosunda 4 saat ısıtılmıştır. Oluşan bitki ekstraktları, Whatman 1 no.lu filtre kağıdı ile süzülükten sonra 4.000 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı ve 4°C'de nanokompozit sentezlemek için saklanmıştır (Abdallah vd., 2020).

2.2.4. Yumurta kabuğu tozunun hazırlanması

Marketlerden toplanan yumurta kabukları ilk olarak kir parçacıklarını temizlemek için musluk suyu altında yıkanmış ve ardından mikrobiyal kontaminasyonun giderilmesi için saf suda 120°C'de 3 saat sürekli karıştırılarak kaynatılmıştır. Kaynatılan yumurta kabukları bir gün süreyle kül fırınında (~150°C) kurutulmuştur. Kurutulan yumurta kabukları agat havan kullanılarak ince toz haline getirilmiştir (Choudhary vd., 2021).



Şekil 1. Burdur yöresinden toplanan *A. officinalis* bitkisinin kırmızımsı pembe çiçek kısımları kullanılarak hazırlanan bitki özütünün aşamaları

2.2.5. Nanokompozitlerin hazırlanması

Yeşil sentez yöntemi ile nanokompozitlerin elde edilmesi için ultra saf su ile hazırlanan 0,2 M'lık $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ve $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ çözeltilerinin içerisine 1'er gram yumurta kabuğu tozu eklenerek 6 saat boyunca karıştırıldıktan sonra çözeltilere bitki özütü ilave (1:1 v/v) edilmiştir (Sajadi vd., 2018; Honarmand vd., 2020). Elde edilen çözeltiler 12 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra 3.500 rpm 5 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant kısımları atılarak ultra saf su ile 4 defa yıkanan nanokompozitler gece boyunca 60°C'de etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan nanokompozitler Tablo 1'deki gibi adlandırılıp karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Huang vd., 2020b).

Tablo 1. Elde edilen nanokompozitlerin isimlendirilmesi

Yumurta kabuğu + $AlCl_3 \cdot 6H_2O$	Al/YK
Yumurta kabuğu + $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Mg/YK

2.2.6. Nanokompozitlerin karakterizasyonu

XRD analizi, karakteristik dalga boyu $\lambda = 1.54$ nm olan Cu Ka radyasyonlu Malvern panalytical empyrean cihazı kullanılarak yapılmış ve veriler $5^\circ < 2\theta < 90^\circ$ tarama aralığında elde edilmiştir. ATR-FTIR spektrumları, 4.000–400 cm^{-1} aralığında, 4,0 cm^{-1} çözünürlükte bir Spektrometre (Perkin Elmer Spectrum 100) cihazı ile ölçülmüştür. Nanokompozitler, ZEISS SUPRA 40VP GEMİNİ cihazı kullanılarak Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfoloji görüntüleri ve enerji dağılımlı X-ışını analizi (EDX) Bruker marka bir dedektör yoluyla elemental haritalamaları elde edilmeden önce platin püskürtmeyle QUORUM –Q ISORES cihazında kaplanmıştır.

2.2.7. Hemoliz testi

Nanokompozit numunelerinin hemolitik aktivitesini belirlemek için Choudhary vd. 2021 metodu optimize edilmiştir. Deneysel için insan kırmızı kan hücreleri (KKH) kullanılmıştır EDTA K3 tüpüne alınan kan örneğinden 1 ml alınarak üzerine 25 ml steril fosfat tamponlu salin (PBS) konulmuş ve 1.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ardından üç defa 5ml PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve 50 ml PBS te çözülmüştür. Nanokompozit numunelerinden 6 mg kadarları 1,5 ml KKH süspansiyonuna eklenerek ardından 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Karışım santrifüjlenerek ve süpernatantlar UV kuvetine aktararak hemoglobin salınımı, 540 nm'de absorbans (A) olarak UV spektrofotometri ile ölçülmüştür. Sırasıyla pozitif ve negatif kontroller olarak deiyonize su ve fosfat tamponlu salin (PBS) kullanılmıştır (Choudhary vd., 2021). Yüzde hemoliz oranları aşağıdaki denklem 1'e göre hesaplanmıştır;

$$\frac{(A)_{testsample} - (A)_{negativecontrol}}{(A)_{positivecontrol} - (A)_{negativecontrol}} \times 100 \% \quad (1)$$

2.2.8. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8,01 (GraphPad Software, San Diego, California) adlı yazılım kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki sayısal değişkenlerin istatistiksel anlamlılığını belirlemek için tek-tarafli bağımsız örneklem t testi uygulanmış ve sonuçlar, ortalama \pm ortalama standart sapma (SEM) değerleri olarak sunulmuştur. Anlamlılık düzeyi her zaman %95 güven aralığında, $p \leq 0,05$ olarak belirlendi.

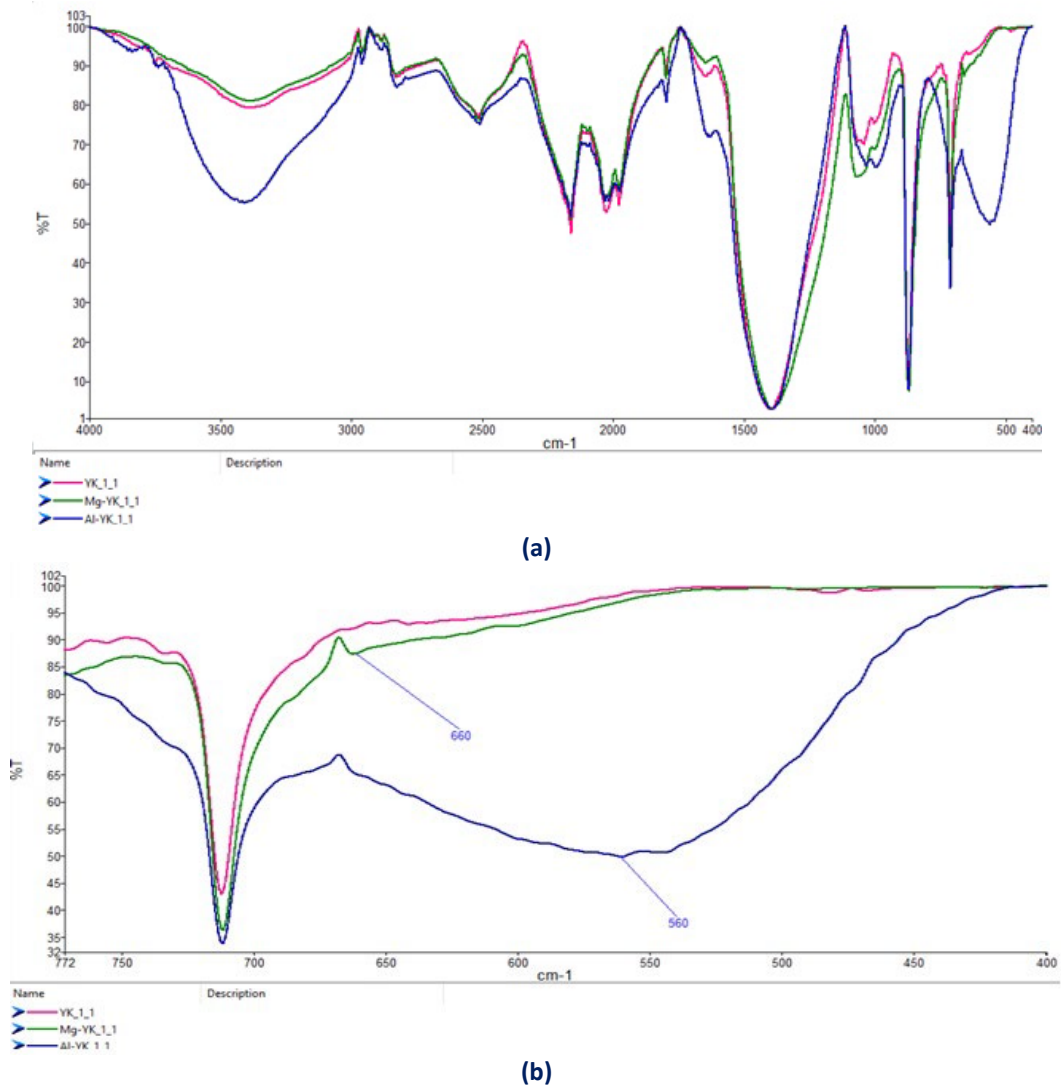
3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Nanokompozit sentezinde kullanılacak bitki özütü, HPLC analiz sonuçlarına göre farklı çözücülerle hazırlanan bitki özütlerindeki gallik asit ve kuersetin miktarlarına (Tablo 2) göre seçilmiştir.

Birçok çalışmada hem kuersetin hem de gallik asit ile sentezlenen nanopartiküllerin stabilite, antimikrobiyal, antikanser özelliklerinin daha fazla olduğu yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu tespit edilmiştir (Mittal vd., 2014; Sarıbuğra, 2014; Shah vd., 2017). HPLC analiz sonucuna göre iki bileşimde en uygun (optimal) miktarlarda bulunduğu ultra saf su çözücüsü nanokompozit sentezi için tercih edilmiştir.

Tablo 2. HPLC analizi sonrası bitki ekstraktlarındaki kuersetin ve gallik asit miktarları

Çözücü adı	Gallik asit (ppm)	Kuersetin (ppm)
Etanol	0,013	4,589
Metanol	0,203	4,502
Aseton	0,117	1,297
Ultra saf su	1,049	2,898



Şekil 2. Nanokompozitlerin FTIR spektrumları, **(a)** Nanokompozitlerin ve yumurta kabuğu tozunun 4.000-400 cm⁻¹ arası tüm kızılötesi spektrumları, **(b)** Mg/YK nanokompoziti ve Al/YK nanokompozitinin metal oksit (M-O) bant değerleri

Biyosentez yöntemi ile *A. officinalis* ekstraktı kullanılarak sentezlenmiş olan nanokompozitlerin 4.000-400 cm⁻¹ arası ATR-FTIR spektrumları Şekil 2a'da verilmiştir. Çalışmamızda yumurta kabuğu ve membranı ayrılmadan yumurta tozu elde edilmiştir. Buradaki amaç membran kısmında bulunan kollajen benzeri yapıların ve proteinlerin nanokompozit sentezi sırasında bozulmadan yapıya katılabilmesidir. Bu sayede, üretilen nanopartiküller sadece yumurta kabuğuna değil membran kısmındaki lifli yapılara da tutunması sağlanmıştır. Yumurta tozunun ATR-FTIR spektrumundaki bantlardan da görüldüğü üzere membran kısmındaki protein yapıları muhafaza edilmiştir. Yumurta tozu spektrumunda 1.393 cm⁻¹, 1.040 cm⁻¹, 872 cm⁻¹ ve 712 cm⁻¹ pozisyonlarında, yapıdaki kalsitle ilişkili sırasıyla asimetrik gerilme, düzlem dışı eğilme ve düzlem içi titreşimlere ait absorpsiyon bantları gözlemlenmiştir (Mittal vd., 2014; Tunali vd., 2021). Öte yandan, 3.402 cm⁻¹ ve 1.646 cm⁻¹'deki bantlar yumurta kabuğunun membran yapısındaki amid bağlarına karakteristiktir (Torres-Mansilla ve Delgado-Mejia, 2017; Chen vd., 2022). Bozulmamış membrandaki sisteinin tiyol bağlarını 2515 cm⁻¹'deki adsorpsiyon bandı göstermektedir (Bhagavatheswaran vd., 2019). Spektrumdaki 2.957 cm⁻¹

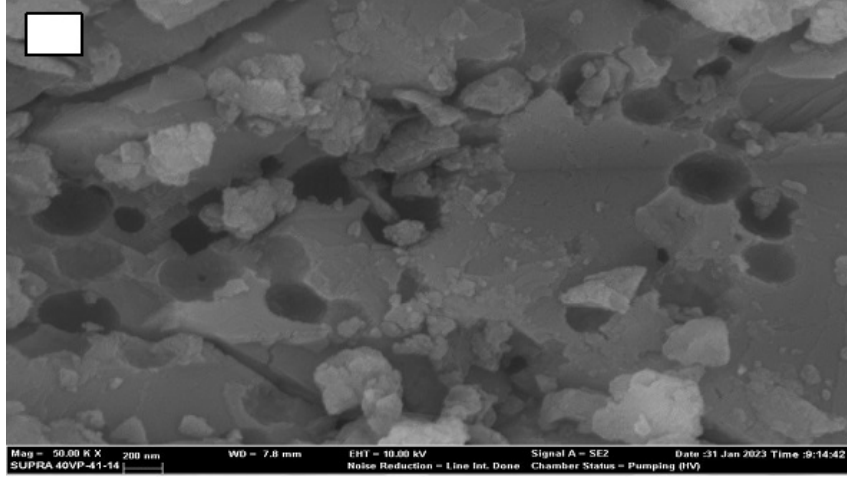
ve 2.828 cm⁻¹'deki bantlar ise hem kabuk kısmındaki minerallerden hem de membran yapısındaki protein ve lipitlerden kaynaklanan simetrik ve asimetrik karbon hidrojen bağlarından gelmektedir (Mittal vd., 2014; Torres-Mansilla ve Delgado-Mejia, 2017; Parvin vd., 2019). Spektrumlar incelendiğinde magnezyum oksit ve alüminyum oksit nanopartikülerinin yumurta tozuna immobilize olma durumu, yumurta kabuğunda bulunan kalsit ve membran yapıları ile ilişkili yukarıda bahsedilen absorpsiyon bantlarında zirve yoğunlukları dışında herhangi bir değişiklik olmadığından anlaşılmaktadır (Nasrollahzadeh vd., 2016; Yorseng vd., 2020). Ayrıca, Şekil 2b'de gösterilen 660 cm⁻¹ ve 560 cm⁻¹ civarındaki bantlar, M-O gerilme modunun dağılımına aittir (He vd., 2019; Ruhaimi ve Aziz, 2021).

Mg/YK ve Al/YK nanokompozitlerinin SEM görüntüleri Şekil 3'de gösterilmektedir. Şekil 3a'da yumurta kabuğunun SEM görüntüsünde yüzeyin makro gözenek yapısı açıkça gözükmektedir. Yumurta kabuğuna yapılan işlemler makro gözenek yapısını ortaya çıkarmıştır. Şekil 3b'de yumurta kabuğunun yüzeyinin ve gözeneklerinin alüminyum oksit nanopartikül ile kaplandığı görülmektedir. Fakat, yumurta

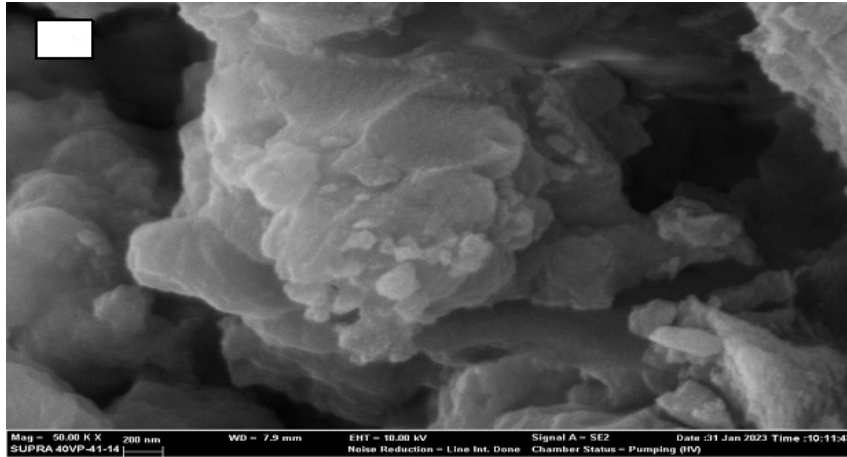
kabuğunun alüminyum oksit nanopartikülü ile çok miktarda yüklenmesi Şekil 3a'ya kıyasla SEM görüntüsünün bir ölçüde bozulmasına neden olmuştur. Şekil 3c'de magnezyum oksit nanopartiküllerinin yumurta kabuk yüzeyini ve gözenek yapılarını kapladığı görülmektedir. Magnezyum oksit'in bazı bölgelerde yığıntı şeklinde biriktiği görülmektedir. SEM görüntüleri metal nanopartiküllerin yumurta kabuğunun yüzeyi ve makro gözenekli yapısı ile konjuge olduğunu göstermektedir

(Huang vd., 2020a).

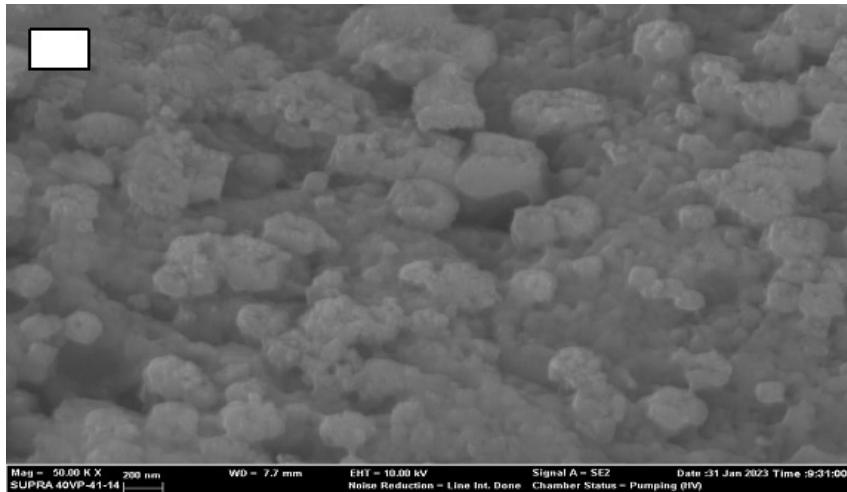
Mg/YK ve Al/YK nanokompozitlerinin yeşil sentezle elde edildiklerini daha fazla doğrulamak için elektron dağılımlı spektroskopi (EDX) analizi gerçekleştirildi. Yumurta kabuğunda bulunan elementlere oranla nanokompozitlerin içerdikleri elementel farklılıklar Şekil 4'te görülmektedir. EDX sonuçları nanokompozitlerin başarılı bir şekilde sentezlendiğini desteklemektedir.



(a)

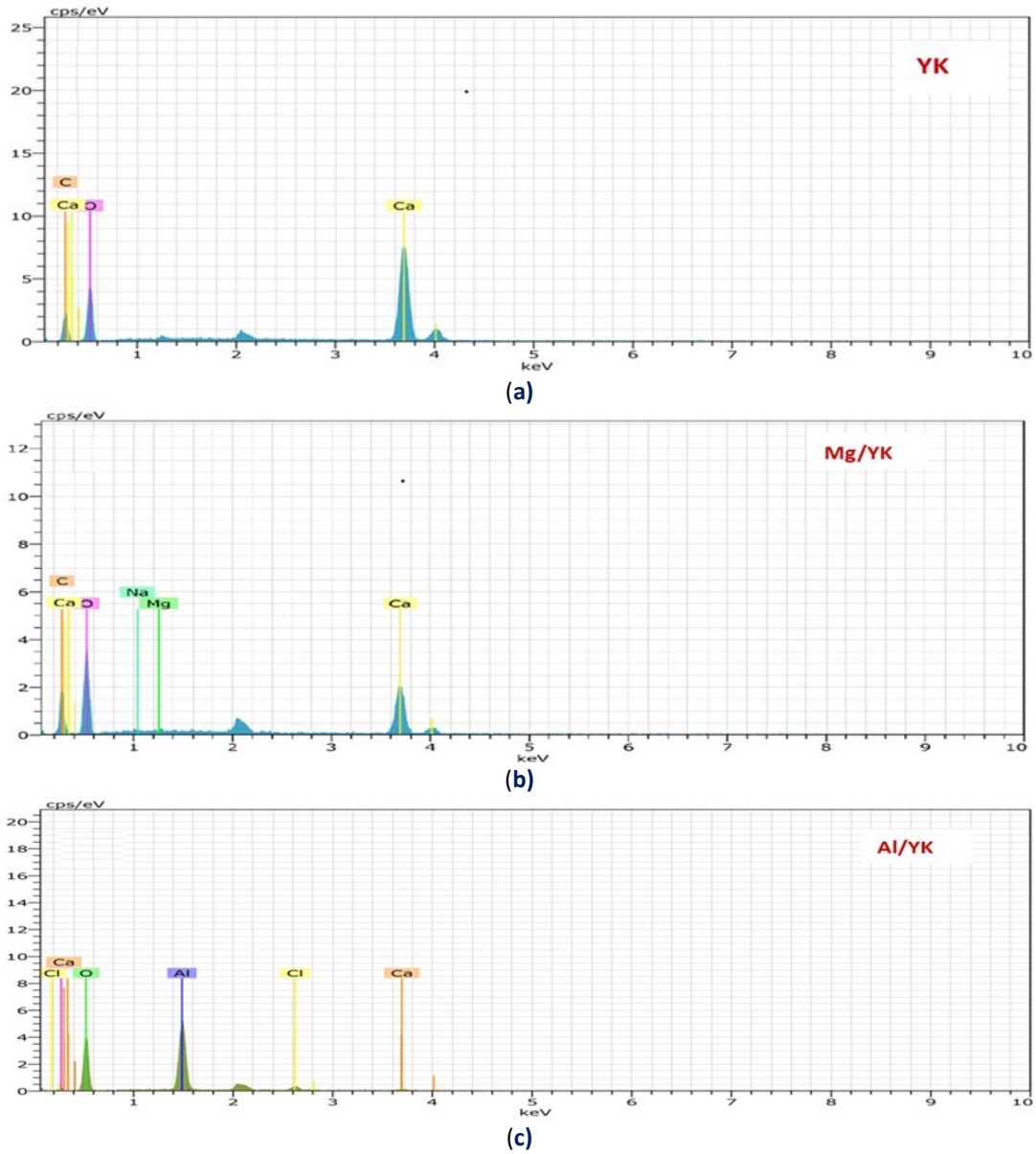


(b)



(c)

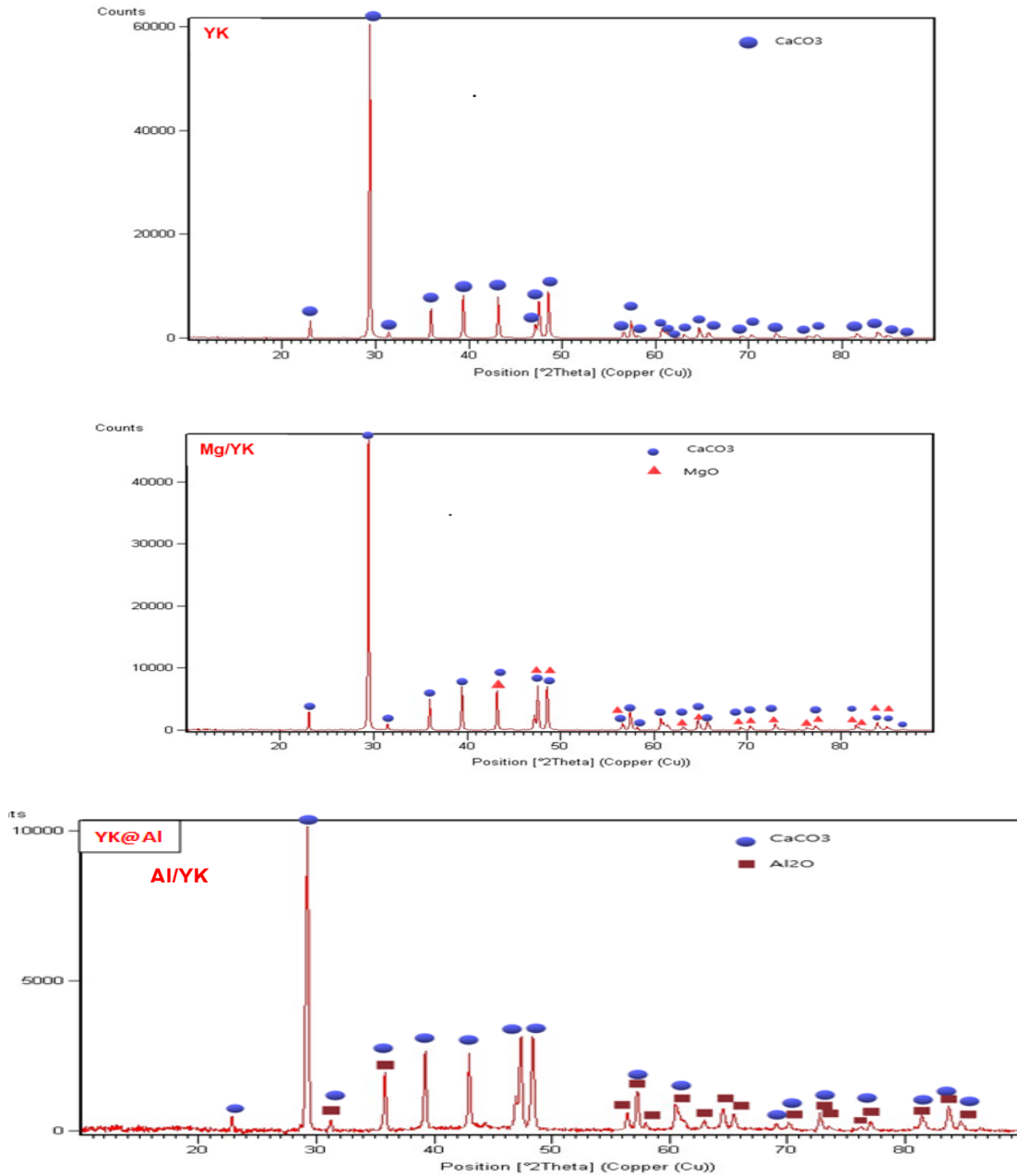
Şekil 3. Nanokompozitlerin SEM görüntüleri, (a) Yumurta kabuğu, (b) Al/YK nanokompoziti, (c) Mg/YK nanokompoziti



Şekil 4. Nanokompozitlerin EDX analizleri (a) Yumurta kabuğu, (b) Mg/YK nanokompoziti, (c) Al/YK nanokompoziti

Numunelerin kristal yapısını belirlemek için XRD ölçümleri yapılmıştır. Şekil 5'te yumurta kabuğunun $2\theta = 23,0, 29,3, 31,4, 35,9, 39,4, 43,1, 47,5, 48,5, 57,4$ ve $64,7$ CaCO_3 'ün karakteristik tepe noktalarını belirtir (CaCO_3 , kart no 96 702 0140). Mg/YK nanokompozitinin XRD kırınım deseninde $2\theta = 43,2, 47,3, 69,2$ MgO'nin tepe noktalarını, Al/YK nanokompozitinde $2\theta = 38,8, 56,2, 62,7$ Al_2O_3 'ün tepe noktalarını göstermektedir. Ayrıca, nanokompozitlerin XRD

modellerinde MgO, Al_2O_3 ve CaCO_3 'ün saf fazını gösteren ek kırınım tepe noktaları gözlenmemiştir. Nanokompozitlerin XRD desenlerinde bazı yerlerde yumurta kabuğunun XRD desenine göre farklılıklar gözlenmiştir. Sonuçlar, yeşil sentez sırasında oluşan MgO ve Al_2O_3 nanopartiküllerinin yumurta kabuğu yüzeyinde başarılı bir şekilde konjuge olduğunu göstermiştir.



Şekil 5. Yumurta kabuğu ve nanokompozitlerin XRD kırınım desenleri

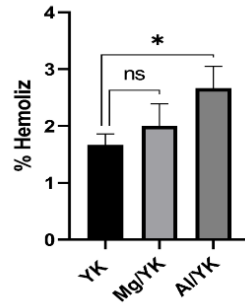
Tablo 3. Nanokompozitlerin ve yumurta kabuğunun hemoliz değerleri (Sonaçlar ortalama \pm ortalama standart hatası olarak gösterilmiştir)

Örnek	Hemoliz (%)
YK	1,66 \pm 0,19
Mg/YK	2,00 \pm 0,38
Al/YK	2,66 \pm 0,38

Tablo 3'te Mg/YK ve Al/YK nanokompozitlerinin ve yumurta kabuğunun hemoliz deneyi sonrası elde edilen hemoliz yüzdeleri verilmiştir.

Sentezlenen nanokompozitlerin insan kan dokusu ile uyumluluğu biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda biyomalzeme olarak kullanılabileceğini gösteren bir kriterdir. Şekil 6'da gösterildiği gibi, nanokompozitlerin kırmızı kan hücresi lizi %2,7'den azdır. Bu ölçümlere göre,

YK ve Mg/YK hemolitik özellik göstermeyen, Al/YK ise hafif hemolitik madde olarak ele alınabilir (Dobrovolskaia vd., 2008). Tüm örneklerin biyogüvenli malzemeler için belirlenen hemoliz oranını (%5) aşmaması ise hem uyumlu olduklarını göstermektedir (Xu vd., 2016). Bu hemoliz sonuçlarına göre, elde edilen nanokompozit malzemeler sağlık alanında kullanılabilir biyomalzeme potansiyeli taşımaktadır.



Şekil 6. Örneklerin hemoliz değerleri (Sonuçlar ortalama değer \pm ortalama standart hatası olarak gösterilmiştir. *:İstatistiksel anlamlılık derecesi ($p \leq 0.05$); ns İstatistiksel olarak anlamlı değil)

4. SONUÇLAR

Bu araştırmada, inorganik atık malzeme olan yumurta kabuğu kullanılarak *A. officinalis* bitkisinin kırmızımsı pembe çiçek kısımlarından ultra saf su kullanılarak hazırlanan bitki özütü ile nanokompozitler, yeşil sentez yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Bu sentez yöntemi, atık malzeme kullanımı ve toksik kimyasalların kullanılmadan sentezin gerçekleştirilmesi avantajlarına sahiptir. Yeşil sentez sonucunda elde edilen nanokompozitlerin karakterizasyon çalışmaları, nanopartiküllerin yumurta kabuğuna en iyi şekilde konjuge olanının sırasıyla magnezyum oksit ve alüminyum oksit olduğunu göstermiştir. Sentezlenen nanokompozit örneklerinin hemolitik aktiviteleri incelendiğinde, her iki nanokompozitin de hemouyumlu olduğu, ancak Mg/YK nanokompozitin en yüksek hemouyumluluğuna sahip olduğu belirlenmiştir. Yeşil sentez yöntemi ile elde edilen Mg/YK ve Al/YK nanokompozitlerinin hemouyumlu olmaları, sağlık alanında biyomalzeme olarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Teşekkür

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi 09-DR-23 no'lu BAP projesi kapsamında yürütülen bu çalışmaya destek sağlayan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne teşekkür ederiz.

Yazar Katkıları

Büşra ŞENSOY GÜN: (a) Fikir, (b) Çalışma Tasarısı, (c) Literatür Taraması, (i) Eleştirel İnceleme, (g) Analiz, Yorum, (h) Metin Yazma,

Belgin TUNALI: (a) Fikir, (b) Çalışma Tasarısı, (c) Literatür Taraması, (d) Danışmanlık, (e) Malzeme, Kaynak Sağlama, (f) Veri Toplama, (g) Analiz, Yorum, (h) Metin Yazma, (i) Eleştirel İnceleme

Rafiq QURBANOV: (d) Danışmanlık, (e) Malzeme, Kaynak Sağlama (g) Analiz, Yorum, (h) Metin Yazma, (i) Eleştirel İnceleme

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

- Türköz Altuğ, D., Kaya Kınaytürk, N., Kalaycı, T., & Tunalı, B. (2022). Heavy metal adsorption with eggshell of *Phasianus colchicus*. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 17(1), 228-238. <https://doi.org/10.29233/sdufeffd.1095952>
- Abdallah, Y., Liu, M., Ogunyemi, S.O., Ahmed, T., Fouad, H., Abdelazez, A., Yan, C., Yang, Y., Chen, J., & Li, B. (2020). Bioinspired green synthesis of chitosan and zinc oxide nanoparticles with strong antibacterial activity against rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Molecules*, 25(20), 4795. <https://doi:10.3390/molecules25204795>
- Adeosun, S.O., Lawal, G.I., Balogun, S.A., & Akpan, E.I. (2012). Review of green polymer nanocomposites. *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering*, 11(4), 385-416. <https://10.4236/jmmce.2012.114028>
- Barakat, M.A., Anjum, M., Kumar, R., Alafif, Z.O., Oves, M., & Ansari, M.O. (2020). Design of ternary Ni(OH)₂/graphene oxide/TiO₂ nanocomposite for enhanced photocatalytic degradation of organic, microbial contaminants, and aerobic digestion of dairy wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 258, 120588. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120588>
- Bee, S.L., & Abdul, H.Z.A. (2020). Hydroxyapatite derived from food industry bio-wastes: Syntheses, properties and its potential multifunctional applications. *Ceramics International*, 46, 17149-17175. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.04.103>
- Bhagavatheswaran, E.S., Das, A., Rastin, H., Saeidi, H.,

- Jafari, S.H., Vahabi, H., & Saeb, M.R. (2019). The taste of waste: the edge of eggshell over calcium carbonate in acrylonitrile butadiene rubber. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(11), 2478–2489. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01530-y>
- Bindhu, M.R., Umadevi, M., Esmail, G.A., Al-Dhabi, N.A., & Arasu, M.V. (2020). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Moringa oleifera* flower and assessment of antimicrobial and sensing properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 205, 111836. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111836>
- Chen J., Kuichang, Z., Yilin, L., Huang, X., Jiahui, H., Yang, Y., Wang, W., Chen, L., Jain, A., Verduzco, R., Li, X., & Li, O. (2022). Eggshell membrane derived nitrogen rich porous carbon for selective electrosorption of nitrate from water. *Water Research*, 216, 118351. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118351>
- Choudhary, R., Venkatraman, S.K., Bulygina, I., Senatov, F., Kaloshkin, S., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Knyeva, M., Kukui, D., & Swamiappan, S. (2021). Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk. *Materials Science and Engineering*, 118, 111456. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111456>
- Ding, Q., Kang, Z., Cao, L., Lin, M., Lin, H., & Yang, D.P. (2020). Conversion of waste eggshell into difunctional Au/CaCO₃ nanocomposite for 4-nitrophenol electrochemical detection and catalytic reduction. *Applied Surface Science*, 510, 145526. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.145526>
- Dobrovolskaia, M.A., Clogston, J.D., Neun, B.W., Hall, J.B., Patri, A.K., & McNeil, S.E. (2008). Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Letters*, 8(8), 2180–2187. <https://doi.org/10.1021/nl0805615>
- El-Borady, O.M., Fawzy, M., & Hosny, M. (2021). Antioxidant, anticancer and enhanced photocatalytic potentials of gold nanoparticles biosynthesized by common reed leaf extract. *Applied Nanoscience*, 13, 3149–3160. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01776-w>
- Gomes, T., Caponio, F., & Alloggio, V., (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: Influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64, 203–209. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00146-0)
- Gupta, P.K., Palanisamy, S., Gopal, T., Rajamani, R., Pandit, S., Sinha, S., & Thakur, V.K. (2021). Synthesis and characterization of novel Fe₃O₄/PVA/eggshell hybrid nanocomposite for photodegradation and antibacterial activity. *Journal of Composites Science*, 5(10), 267. <https://doi.org/10.3390/jcs5100267>
- He, X., Yang, D.P., Zhang, X., Liu, M., Kang, Z., Lin, C., & Luque, R. (2019). Waste eggshell membrane-templated CuO-ZnO nanocomposites with enhanced adsorption, catalysis and antibacterial properties for water purification. *Chemical Engineering Journal*, 369, 621–633. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.047>
- Honarmand, M., Mirzadeh, M., & Honarmand, M. (2020). Green synthesis of SnO₂-ZnO-eggshell nanocomposites and study of their application in removal of mercury (II) ions from aqueous solution. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18, 1581–1593. <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00576-8>
- Huang, Y., Ji, Y., Kang, Z., Li, F., Ge, S., Yang, D.-P., Ruan, J., & Fan, X. (2020a). Integrating eggshell-derived CaCO₃/MgO nanocomposites and chitosan into a biomimetic scaffold for bone regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 395, 125098. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125098>
- Huang, X., Chang, L., Lu, Y., Li, Z., Kang, Z., Zhang, X., Liu, M., & Yang, D. P. (2020b). Plant-mediated synthesis of dual-functional eggshell/Ag nanocomposites towards catalysis and antibacterial application. *Materials Science and Engineering*, 113, 111015. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111015>
- Ijaz, M., Aftab, M., Afsheen, S., & Iqbal, T. (2020). Novel Au nano-grating for detection of water in various electrolytes. *Applied Nanoscience*, 10(11), 4029–4036. <https://doi.org/10.1007/s13204-020-01520-w>
- Kalaycı, T., Tunalı, B., Türköz Altuğ, D., & Kaya Kinaytürk, N. (2023). Quantum Chemical calculations of m-toluidine and investigation of its adsorption on eggshells. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16(1), 169–183. <https://doi.org/10.18185/erzifbed.1210056>
- Kaya Kinaytürk, N., Tunalı, B., & Türköz Altuğ, D. (2021). Eggshell as a biomaterial can have a sorption capability on its surface: A spectroscopic research. *Royal Society of Chemistry*, 8, 210100. <https://doi.org/10.1098/rsos.210100>
- Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Veselova, M.V., Bulgakov, V. P., Fedoreyev, S.A., & Zhuravlev, Y.N. (2007). The rol-B gene-induced over production of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology*, 128, 681–692. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.11.008>
- Li, X., Ma, M., Ahn, D.U., & Huang, X. (2018). Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.215>
- Lunkov, A., Shagdarova, B., Konovalova, M., Zhuikova, Y., Drozd, N., Ilina, A., & Varlamov, V. (2020). Synthesis Of silver nanoparticles using gallic acid-conjugated chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 234, 115916, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115916>
- Maisa, W., & Awwad, A.M. (2021). A novel route for the synthesis of copper oxide nanoparticles using *Bougainvillea* plant flowers extract and antifungal activity evaluation. *Chemistry International*, 7(1), 71–78. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4042902>
- Martel, R.M., Du, J., & Hincke, M.T. (2012). Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. *Journal Proteomics*, 75, 2697–2706. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.019>
- Mittal, A.K., Kumar, S., & Banerjee, U.C. (2014). Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver

- and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *Journal of Colloid and Interface Science*, 431, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.06.030>
- Muthu, K., & Priya, S. (2017). Green synthesis, characterization and catalytic activity of silver nanoparticles using *Cassia auriculata* flower extract separated fraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 179, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.02.024>
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S.M., & Hatamifard, A. (2016). Waste chicken eggshell as a natural valuable resource and environmentally benign support for biosynthesis of catalytically active Cu/eggshell, Fe₃O₄/eggshell and Cu/Fe₃O₄/eggshell nanocomposites. *Applied Catalysis B: Environmental*, 191, 209–227. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.02.042>
- Oves, M., Rauf, M.A., Aslam, M., Qari, H.A., Sonbol, H., Ahmad, I., Zaman, G.S., & Saeed, M. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles by *Conocarpus Lancifolius* plant extract and their antimicrobial and anticancer activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.007>
- Owuamanam, S., & Cree, D. (2020). Progress of bio-calcium carbonate waste eggshell and seashell fillers in polymer composites: A review. *Journal of Composites Science*, 4(2), 70. <https://doi.org/10.3390/jcs4020070>
- Palithya, S., Gaddam, S.A., Kotakadi, V.S., Penchalani, J., Golla, N., Krishna, S.B.N., & Naidu, C.V. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using flower extracts of *Aerva lanata* and their biomedical applications. *Particulate Science and Technology*, 20, 84–96. <https://doi.org/10.1080/02726351.2021.1919259>
- Parvin, S., Biswas, B.K., Rahman, M.A., Rahman, M.H., Anik, M.S., & Uddin, M.R. (2019). Study on adsorption of Congo red onto chemically modified egg shell membrane. *Chemosphere*, 236, 124326. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.057>
- Renuka, R., Devi, K.R., Sivakami, M., Thilagavathi, T., Uthrakumar, R., & Kaviyarasu, K. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Phyllanthus emblica* fruit extract for antimicrobial application. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101567. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2020.101567>
- Ruhaimi, A.H., & Aziz, M.A. (2021). High-performance flake-like mesoporous magnesium oxide prepared by eggshell membrane template for carbon dioxide capture. *Journal of Solid State Chemistry*, 300, 122242. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2021.122242>
- Rohaizad, A., Shahabuddin, S., Shahid, M.M., Rashid, N.M., Hir, Z.A.M., Ramly, M.M., Awang, K., Siong, C.W., & Aspanut, Z. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles from *Catharanthus roseus* dried bark extract deposited on graphene oxide for effective adsorption of methylene blue dye. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(4), 103955. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103955>
- Sadighara, P., Gharibi, S., Jafari, A.M., Khaniki, G.J., & Salari, S. (2012). The antioxidant and flavonoids contents of *Althaea officinalis* L. flowers based on their color. *Avicenna Journal of Phytomedicine Received*, 2(3), 113–117.
- Sajadi, S.M., Kolo, K., Abdullah, S.M., Hamad, S.M., Khalid, H.S., & Yasin, A.T. (2018). Green synthesis of highly recyclable CuO/eggshell nanocomposite to efficient removal of aromatic containing compounds and reduction of 4-Nitrophenol at room temperature. *Surfaces and Interfaces*, 15, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.08.006>
- Sarıbuğra, S. (2014). *Manyetik nanopartiküllerin analitik incelenmesi* [Yayımlanmamış Doktora tezi]. İstanbul Üniversitesi.
- Shah, S.T., Yehya, W.A., Saad, O., Simarani, K., Chowdhury, Z., Alhadi, A.A., & Al-Ani, L.A. (2017). Surface functionalization of iron oxide nanoparticles with gallic acid as potential antioxidant and antimicrobial agents. *Nanomaterials*, 7(10), 306. <https://doi.org/10.3390/nano7100306>
- Snafi A.E. (2013). The pharmaceutical importance of *Althaea officinalis* and *Althaea rosea*: A review. *International Journal of PharmTech Research*, 5, 1378–1385.
- Swilam, N., & Nematallah, K.A. (2020). Polyphenols profile of pomegranate leaves and their role in green synthesis of silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71847-5>
- Torres-Mansilla, A.C., & Delgado-Mejia, E. (2017). Influence of separation techniques with acid solutions on the composition of eggshell membrane. *International Journal of Poultry Science*, 16(11), 451–456. <https://doi.org/10.3923/ijps.2017.451.456>
- Tunalı, B., Türköz Altuğ, D., Kaya Kınaytürk, N., & Tüzün, G.C. (2021). Removal of heavy metals (copper and lead) using waste eggshell with two different species and three different forms. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(1), 434–445. <https://doi.org/10.29048/makufebd.983222>
- Yorseng, K., Siengchin, S., Ashok, B., & Rajulu, A.V. (2020). Nanocomposite eggshell powder within situ generated silver nanoparticles using inherent collagen as reducing agent. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 5(2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.04.003>
- Xu, Y.-J., Dong, L., Lu, Y., Zhang, L.-C., An, D., Gao, H.-L., & Yu, S.-H. (2016). Magnetic hydroxyapatite nanoworms for magnetic resonance diagnosis of acute hepatic injury. *Nanoscale*, 8(3), 1684–1690. <https://doi.org/10.1039/c5nr07023f>