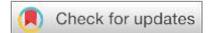


Relazioni scientifiche



APERTO

Inattivazione di diverse varianti di SARS-CoV-2 mediante fotocatalizzatori a base di TiO₂ sensibili alla luce da interni

Ryuichi Nakano¹✉, Akira Yamaguchi², Kayano Sunada³, Takeshi Nagai³, Akiyo Nakano¹, Yuki Suzuki¹, Hisakazu Yano¹, Hitoshi Ishiguro³✉ e Masahiro Miyachi²✉

I fotocatalizzatori sono materiali promettenti per i rivestimenti antivirali allo stato solido destinati a proteggere dalla diffusione della malattia pandemica provocata dal coronavirus (COVID-19). Questo articolo riferisce che i nanocluster di ossido di rame innestati con biossido di titanio (Cu_xO/TiO₂) hanno inattivato il virus della sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2 (SARS-CoV-2), compresa la sua variante Delta, anche in condizioni di oscurità e lo hanno ulteriormente inattivato sotto l'illuminazione di una lampadina fluorescente bianca. Per studiarne il meccanismo di inattivazione, la denaturazione delle proteine spike del SARS-CoV-2 è stata esaminata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE) e saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA). Oltre alle proteine spike, la frammentazione degli acidi ribonucleici nel SARS-CoV-2 è stata analizzata mediante la reazione a catena della polimerasi quantitativa con trascrizione inversa in tempo reale (RT-qPCR). Di conseguenza, sia le proteine che gli RNA del virus SARS-CoV-2 sono stati danneggiati dal fotocatalizzatore Cu_xO/TiO₂ anche in condizioni di oscurità e sono stati ulteriormente danneggiati con l'illuminazione di una lampada fluorescente bianca. Sulla base dell'attuale meccanismo antivirale, il fotocatalizzatore Cu_xO/TiO₂ sarà efficace nell'inattivare altri potenziali ceppi mutanti del SARS-CoV-2. Il fotocatalizzatore Cu_xO/TiO₂ può quindi essere utilizzato per ridurre il rischio di infezione da COVID-19 in un ambiente interno, dove l'illuminazione viene accesa durante il giorno e spenta durante la notte.

La nuova malattia da coronavirus (COVID-19) è scoppiata nel 2019^{1,2}. Questa malattia di dimensioni pandemiche è causata dall'infezione del virus della sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2), principalmente attraverso la trasmissione per via aerea di goccioline e/o aerosol prodotti da persone infette³. Oltre al rischio di contatto tra persone, il virus SARS-CoV-2 è stato rilevato anche sulle superfici di oggetti in luoghi pubblici come gli ospedali⁴. Pertanto, le sostanze chimiche e/o i materiali antivirali sono utili per proteggere dalla diffusione della SARS-CoV-2. Infatti, l'alcol⁵, il perossido di idrogeno⁶ e l'acido ipocloroso⁷ sono stati ampiamente utilizzati per inattivare i batteri e/o i virus sulle superfici di vari oggetti, come tavoli, pavimenti, corrimano, pannelli a sfioramento/ pulsanti e mobili. Queste sostanze chimiche inattivano i virus denaturando le loro proteine⁸ tuttavia, il loro effetto antivirale non si mantiene a lungo termine a causa della loro evaporazione e/o dissipazione. Al contrario, i composti antivirali allo stato solido sono utili per la loro robustezza e per la possibilità di essere utilizzati come materiali di rivestimento⁹. Ad esempio, Ito et al.¹⁰ hanno riportato l'inattivazione della SARS-CoV-2 da parte di nanoparticelle di molibdato di cerio. Tra questi vari materiali antibatterici e antivirali allo stato solido, i fotocatalizzatori a base di biossido di titanio (TiO₂) sono promettenti per le loro proprietà non tossiche, economiche (abbondanti), chimicamente e/o termicamente stabili¹¹⁻¹³ e il loro effetto antivirale può essere mantenuto in modo continuo con l'illuminazione della luce ultravioletta (UV)¹⁴⁻¹⁶. I fotogenerati nella banda di valenza del TiO₂ hanno un forte potere ossidante per la decomposizione delle molecole organiche; pertanto, i componenti virali come le proteine di superficie possono essere ossidati tramite l'irradiazione UV, con conseguente inattivazione del virus. Recentemente è stato riportato che il TiO₂ è in grado di inattivare la SARS-CoV-2 attraverso un processo fotocatalitico^{17,18} tuttavia, il TiO₂ può funzionare solo in presenza di luce UV, difficilmente contenuta in un normale apparecchio per illuminazione. Poiché le infezioni virali si verificano principalmente in ambienti chiusi dove si riuniscono molte persone, è necessario utilizzare un fotocatalizzatore antivirale sensibile alla luce visibile. Si noti anche che l'illuminazione viene solitamente spenta durante la notte; pertanto, la proprietà antivirale prolungata dei fotocatalizzatori in condizioni di oscurità è un requisito importante per il loro utilizzo pratico.

¹Department of Microbiology and Infectious Diseases, Nara Medical University, Kashihara, Nara 634-8521, Giappone. ²Department of Materials Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology, Meguro, Tokyo 152-8552, Giappone. ³Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology (KISTEC), Kawasaki, Kanagawa 210-0821, Giappone. ✉email: rnakano@naramed-u.ac.jp; pg-ishiguro@newkast.or.jp; mmiyauchi@ceram.titech.ac.jp

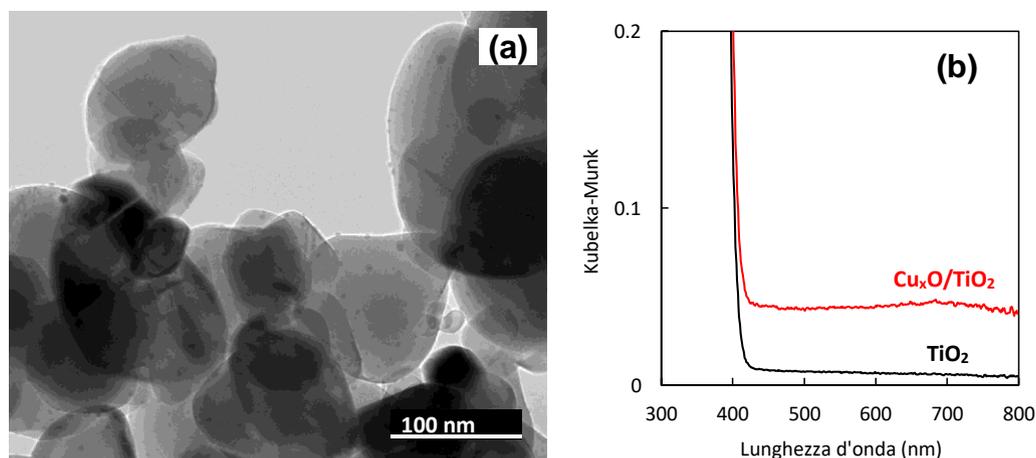


Figura 1. Caratterizzazione di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$. **(a)** Immagine TEM di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ e **(b)** spettri UV-Vis di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ (linea rossa) e TiO_2 originario (linea nera). Come asse verticale degli spettri di assorbimento è stata utilizzata la funzione Kubelka-Munk, basata sui dati grezzi degli spettri di riflettanza diffusa.

Nel presente studio, ci siamo concentrati sulla combinazione di TiO_2 e ossido di rame come composto antivirale, anche se entrambi non sono cataliticamente attivi sotto l'irradiazione oscura o della luce visibile¹⁹⁻²¹. Secondo i precedenti studi sperimentali, sia il TiO_2 che il CuO non inattivano bene i batteri in condizioni di oscurità^{19,20}. Sotto l'irradiazione di luce UV, il TiO_2 può inattivare virus e/o batteri²⁰ mentre il CuO non è fotocataliticamente attivo a causa della sua banda di valenza poco profonda²¹. In altre parole, né il TiO_2 né il CuO funzionano bene sotto l'irradiazione oscura e/o visibile. Nel presente studio, tuttavia, ci sono due punti chiave per lo sviluppo di un materiale antivirale attivo in ambienti chiusi. In primo luogo, combiniamo il TiO_2 con il CuO per ottenere una sensibilità alla luce visibile grazie al meccanismo di trasferimento di carica interfacciale^{22,23}. In secondo luogo, abbiamo introdotto specie Cu(I) nei nanocluster CuO risultanti in Cu_xO per ottenere un'efficace proprietà antivirale anche in condizioni di oscurità, poiché le specie Cu(I) funzionano come siti attivi per le funzioni antibatteriche e antivirali^{20,24,25}. Recentemente, il nostro gruppo ha sviluppato un fotocatalizzatore antivirale/antibatterico sensibile alla luce visibile basato su TiO_2 innestato su nanocluster di ossido di rame (Cu_xO , $1 < x < 2$)²⁵⁻²⁷. I nanocluster Cu_xO sono composti da un ossido a valenza mista, in cui sono presenti specie Cu(I) e Cu(II) . La specie Cu(II) nel Cu_xO contribuisce alla reazione di fotocatalisi guidata dalla luce visibile, mentre la specie Cu(I) svolge un ruolo cruciale nella denaturazione delle proteine del virus, causandone l'inattivazione in condizioni di oscurità. Tuttavia, questi studi precedenti hanno esaminato le loro proprietà antivirali utilizzando il batteriofago $\text{Q}\beta$ senza involucro, che è una struttura diversa da quella del SARS-CoV-2 (con involucro). Vale la pena di studiare la proprietà fotocatalitica antivirale non solo contro il ceppo wild-type ma anche contro diversi tipi di varianti del SARS-CoV-2 con uno studio approfondito del meccanismo antivirale. Ad esempio, la variante Delta del SARS-CoV-2 si diffonde più velocemente rispetto al ceppo wild-type²⁸ e la variante mutata Omicron è emersa di recente con una maggiore trasmissibilità^{29,30}.

Qui riportiamo l'inattivazione del virus SARS-CoV-2 da parte del fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ anche in condizioni di oscurità; inoltre, le sue efficienti prestazioni anti-SARS-CoV-2 sono state raggiunte sotto una lampadina fluorescente bianca filtrata con un filtro UV. Il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ ha inattivato non solo il ceppo wild-type ma anche le varianti Alpha, Beta, Gamma e Delta. Poiché le proteine spike svolgono un ruolo importante nell'infezione da SARS-CoV-2, il presente studio esamina attentamente la denaturazione delle proteine spike nel virus SARS-CoV-2 mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE) e saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA)³¹. Il virus SARS-CoV-2 ha un involucro esterno, che comprende proteine spike disposte in modo disordinato che sono fondamentali per la fusione con le cellule umane³². Oltre alle proteine, gli acidi ribonucleici (RNA) dei virus sono essenziali per generare loro copie nelle cellule umane³³. Pertanto, il presente studio analizza anche la deframmentazione degli RNA del SARS-CoV-2 da parte del fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ utilizzando una tecnica di reazione a catena della polimerasi quantitativa di trascrizione inversa in tempo reale (RT-qPCR). Discutiamo attentamente il meccanismo di inattivazione del SARS-CoV-2 da parte del fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ in condizioni di luce e oscurità.

Risultati

Caratterizzazione e attività fotocatalitica di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$. I nanocluster di Cu_xO sono stati facilmente innestati sulla polvere di TiO_2 con un semplice metodo di impregnazione basato su una precedente relazione²⁵. In breve, la polvere di TiO_2 di rutilo è stata dispersa in una soluzione acquosa di cloruro di rame (CuCl_2) sotto agitazione a 90°C , quindi sono stati aggiunti idrossido di sodio e glucosio per ridurre le specie Cu(II) a Cu(I) . Dopo il lavaggio, la filtrazione e l'essiccazione, si è ottenuta una polvere di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$. Per la valutazione antivirale, la polvere di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ è stata rivestita su un substrato di vetro.

La figura 1a mostra un'immagine di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$. La dimensione della polvere di TiO_2 variava da circa 100 a 200 nm, e su questa sono stati innestati piccoli nanocluster di Cu_xO di pochi nanometri.

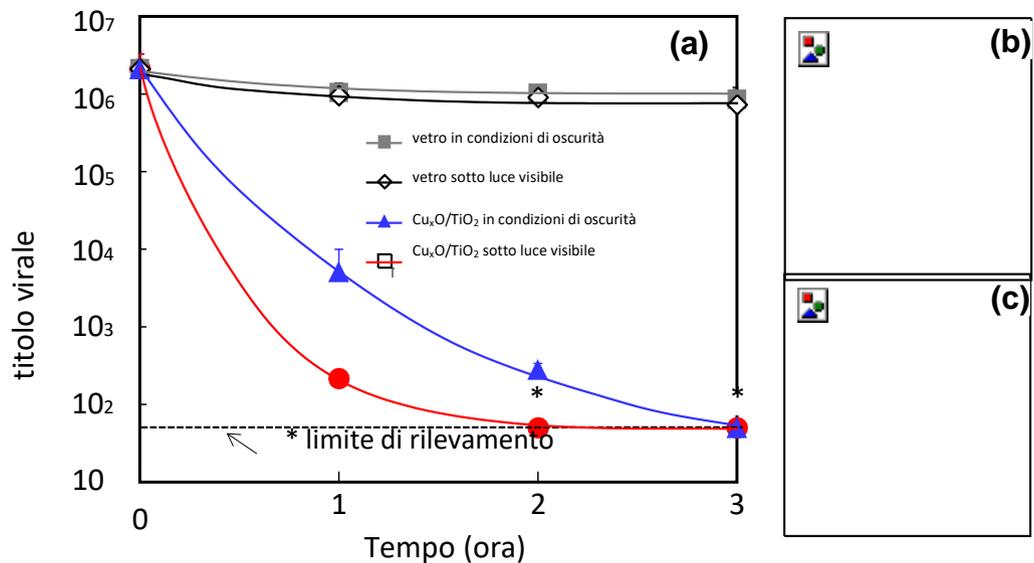


Figura 2. Inattivazione del ceppo wild-type di SARS-CoV-2 mediante fotocatalizzatore. **(a)** variazioni del titolo virale di SARS-CoV-2 (ceppo wild-type, 2019-nCoV JPN/TY/WK-521) per ogni condizione, **(b)** fotografia delle placche virali infettate da SARS-CoV-2 su un substrato di vetro semplice sotto irradiazione di luce visibile e **(c)** fotografia delle placche virali infettate da SARS-CoV-2 su fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ sotto irradiazione di luce visibile. Le macchie bianche nelle foto indicano il virus SARS-CoV-2 attivo. L'irradiazione con luce visibile è stata effettuata utilizzando una lampada a fluorescenza bianca la cui luce è stata fatta passare attraverso un filtro UV con un'intensità luminosa di 1000 lx. I segni di asterisco (*) e la linea tratteggiata nel pannello **(a)** indicano il limite di rilevamento del virus.

Il nostro spettrometro a raggi X a dispersione di energia (EDS) dotato di un'apparecchiatura TEM, l'immagine da un microscopio elettronico a scansione (SEM) con la relativa mappatura EDS e il modello di diffrazione a raggi X (XRD) hanno indicato che i piccoli nanocluster innestati erano composti da ossido di rame amorfo (vedi Fig. 1-3 supplementare).

La figura 1b mostra gli spettri di assorbimento ultravioletto-visibile (UV-Vis) di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ e TiO_2 semplice. Il TiO_2 semplice assorbe la luce UV al di sotto dei 400 nm, il che è attribuito alla transizione da banda a banda del TiO_2 . D'altra parte, il $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ presenta un'ampia banda di luce visibile. La banda di assorbimento nell'intervallo 400-500 nm è assegnata al trasferimento di carica interfacciale (IFCT) dalla banda di valenza del TiO_2 all'orbitale non occupato della specie $\text{Cu}(\text{II})^{22,23}$, il che è stato confermato dalla nostra analisi di risonanza di spin elettronico (ESR) in situ sotto irradiazione luminosa (vedi Fig. 4 aggiuntiva). Inoltre, l'assorbimento nell'intervallo 500-600 nm deriva dalla transizione da banda a banda nel Cu_xO , mentre l'assorbimento oltre i 650 nm è assegnato alla transizione d-d della specie $\text{Cu}(\text{II})^{34}$. Secondo una precedente relazione, la transizione IFCT indotta dall'irradiazione con luce blu (circa 400-500 nm) ha contribuito solo all'attività di ossidazione fotocatalitica tra le bande di assorbimento della luce visibile osservate²⁵. Infatti, l'attuale $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ ha mostrato un'attività fotocatalitica alla luce blu, mentre il TiO_2 incontaminato non ha mostrato alcuna attività alla stessa luce blu (vedi Fig. 5a supplementare). Il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ è stato in grado di ossidare completamente le molecole gassose di 2-propanolo in anidride carbonica sotto l'irradiazione con luce visibile (Fig. 5b supplementare). Grazie al suo forte potere ossidante, il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ dovrebbe avere un'elevata funzione antivirale. Inoltre, la sua attività antivirale in condizioni di oscurità è stata esaminata e discussa di seguito.

Inattivazione del SARS-CoV-2. L'attività fotocatalitica antivirale di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ contro il virus SARS-CoV-2 è stata valutata con il metodo riportato nel nostro precedente studio¹⁵. La figura 2a mostra le proprietà di inattivazione del virus SARS-CoV-2 del ceppo wild-type in condizioni di irradiazione al buio e con luce visibile. L'irradiazione con luce visibile è stata effettuata utilizzando una lampadina a fluorescenza bianca commerciale (vedere lo spettro nella Fig. 6 supplementare), solitamente utilizzata come apparecchio di illuminazione per interni. Per l'irradiazione luminosa, la regione UV è stata filtrata con un filtro ottico e l'intensità della luce è stata impostata a 1000 lx. Abbiamo analizzato le proprietà antivirali del substrato di vetro senza fotocatalizzatore come gruppo di controllo e abbiamo scoperto che il titolo virale sul vetro non diminuiva in condizioni di irradiazione al buio e alla luce visibile. Al contrario, il titolo virale sul fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ è diminuito drasticamente anche in condizioni di oscurità. Dopo 3 ore di esposizione a $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ in condizioni di oscurità, il titolo virale è diminuito fino al limite di rilevamento. Inoltre, la proprietà antivirale del fotocatalizzatore è stata migliorata sotto irradiazione di luce visibile e il titolo virale è sceso al limite di rilevamento dopo sole 2 ore. In altre parole, quattro ordini di grandezza del virus sono stati inattivati dal fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ anche dopo 2 ore di normale illuminazione interna. Le figure 2b e c mostrano le fotografie delle placche di SARS-CoV-2 per il substrato di vetro e il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ sotto irradiazione di luce visibile, dove i punti bianchi indicano il virus SARS-CoV-2 attivi. Queste foto dimostrano anche le efficienti proprietà fotocatalitiche antivirali del nostro fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$.

Oltre al ceppo wild-type di SARS-CoV-2, abbiamo studiato le proprietà di inattivazione di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ rispetto alle varianti Alfa (α), Beta (β), Gamma (γ) e Delta (δ). La figura 3a mostra il titolo virale delle varianti Alfa, Beta e Gamma su vetro semplice e su campione rivestito di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$. Il titolo virale è stato esaminato prima dell'irradiazione luminosa (in condizioni di oscurità) e dopo l'irradiazione con luce visibile per 2 ore.

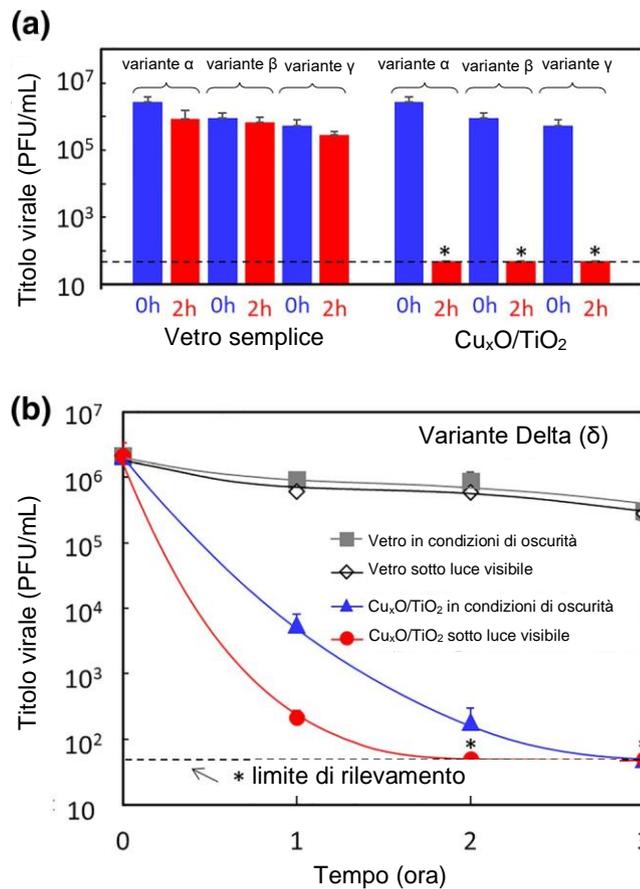


Figura 3. Inattivazione di vari tipi di varianti. **(a)** variazioni del titolo virale delle varianti Alfa (α), Beta (β) e Gamma (γ) in caso di irradiazione con luce visibile per 0 e 2 ore e **(b)** variazioni del titolo virale della variante Delta (δ). L'irradiazione con luce visibile è stata effettuata utilizzando una lampada a fluorescenza bianca la cui luce è stata fatta passare attraverso un filtro UV con un'intensità luminosa di 1000 lx. I segni di asterisco (*) e le linee tratteggiate nei pannelli indicano il limite di rilevamento dei virus.

Analogamente al ceppo wild-type di SARS-CoV-2 mostrato nella Fig 2, il $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ ha disinfettato quattro ordini di diverse varianti sotto irradiazione di luce visibile. La figura 3b mostra la disinfezione della variante Delta, che di recente sta causando picchi critici in vari paesi²⁸. È da notare che il titolo virale della variante Delta è diminuito fino al limite di rilevazione solo dopo 2 ore di esposizione al fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ sotto irradiazione di luce visibile e dopo 3 ore di esposizione in condizioni di oscurità. In precedenza, Uema et al. hanno riportato le proprietà anti-SARS-CoV-2 di un fotocatalizzatore a base di triossido di tungsteno (WO_3)³⁵, che però non ha funzionato bene in condizioni di oscurità. In questa relazione, il titolo virale si è ridotto di soli due ordini di grandezza dopo 3 ore di irradiazione con luce bianca a 3000 lx, molto più forte delle attuali condizioni di illuminazione. Il fotocatalizzatore a base di TiO_2 utilizzato in questo studio presenta un vantaggio rispetto a questi studi precedenti grazie alle sue proprietà anti-SARS-CoV-2 più efficienti sotto irradiazione di luce visibile. Inoltre, il nostro materiale a base di TiO_2 è chimicamente più stabile in condizioni alcaline e acide ed è più economico dei fotocatalizzatori a base di WO_3 . Inoltre, il presente $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ mostra un'efficiente attività antivirale anche in condizioni di oscurità, mentre la maggior parte dei fotocatalizzatori riportati non funziona in condizioni di oscurità. In precedenza abbiamo studiato il meccanismo antivirale di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ utilizzando come virus il batteriofago Q β senza involucro. È noto che le sostanze organiche contenute nel batteriofago Q β vengono ossidate in anidride carbonica, causando l'inattivazione dei virus sotto irradiazione di luce visibile. Inoltre, le specie di Cu(I) nei nanocluster di Cu_xO causano la denaturazione delle proteine anche in condizioni di oscurità, grazie al forte adsorbimento tra le proteine e il Cu_xO ²⁷. Sunada et al.^{20,24} hanno studiato il meccanismo antivirale degli ossidi di rame e hanno scoperto che la proprietà di inattivazione delle specie Cu(I) è dovuta alla loro proprietà allo stato solido di adsorbire fortemente le proteine, piuttosto che alla generazione di specie reattive dell'ossigeno o di ioni di rame lisciviati. Questi studi precedenti hanno utilizzato il batteriofago Q β senza involucro per i loro studi sul meccanismo; pertanto, abbiamo analizzato attentamente la denaturazione sia delle proteine spike che degli acidi ribonucleici (RNA) nel SARS-CoV-2 utilizzando analisi SDS-PAGE, ELISA e RT-qPCR, come presentato nella prossima sezione.

Danno delle proteine spike e degli RNA nei virus SARS-CoV-2. Studi precedenti hanno riportato che le glicoproteine S (Spike) del coronavirus promuovono l'ingresso nelle cellule e sono il principale bersaglio degli anticorpi³¹. Le Figure 4a e b mostrano i risultati dell'analisi SDS-PAGE per il $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ e il vetro semplice in condizioni di oscurità (a) e sotto irradiazione di luce visibile (b).

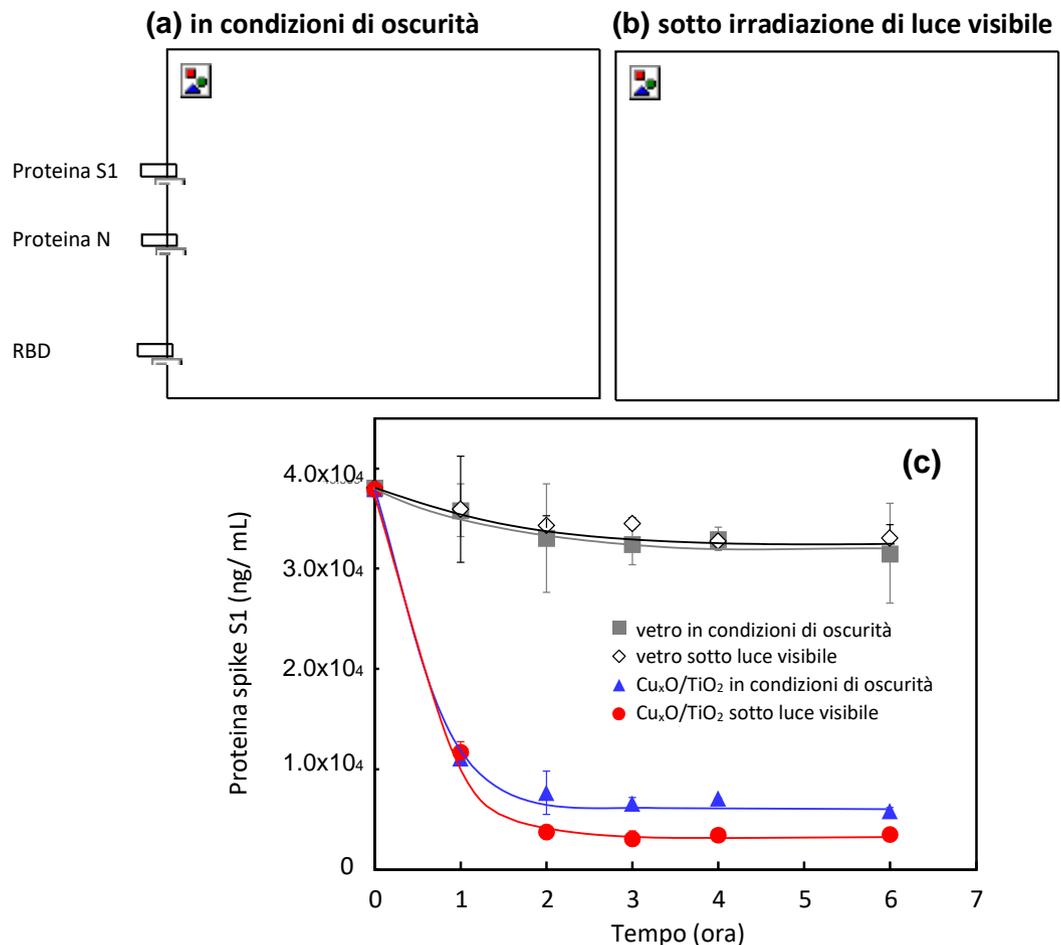


Figura 4. Analisi delle proteine del SARS-CoV-2 mediante SDS-PAGE ed ELISA. Le proteine del SARS-CoV-2 (a) in condizioni di oscurità e (b) irradiazione di luce visibile per il substrato di vetro e il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ sono state separate mediante SDS-PAGE. Le corsie 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h e 8 h corrispondevano rispettivamente al tempo successivo alla reazione. Risultati del test ELISA (c) sulla concentrazione della proteina SARS-CoV-2 spike S1 in condizioni di oscurità e di irradiazione di luce visibile per il substrato di vetro e il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$. L'irradiazione con luce visibile è stata effettuata utilizzando una lampada a fluorescenza bianca la cui luce è stata fatta passare attraverso un filtro UV con un'intensità luminosa di 1000 lx.

È da notare che il segnale di banda delle proteine S1 e il dominio di legame del recettore (RBD) delle proteine S1 sono diminuiti in modo evidente dopo l'esposizione al catalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ sia in condizioni di oscurità che sotto irradiazione di luce visibile. Poiché l'RBD riconosce l'ACE2, un recettore sulla superficie delle cellule ospiti^{36,37}, la scomparsa del segnale di RBD suggerisce una diminuzione dell'infettività del virus. Abbiamo anche valutato quantitativamente la denaturazione delle proteine spike S1 con il metodo ELISA e i risultati sono mostrati nella Fig 4c. Le proteine spike non sono state denaturate su un substrato di vetro di controllo in condizioni di luce e buio. D'altra parte, le proteine spike sono state denaturate sul fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ anche in condizioni di oscurità e la sua proprietà di denaturazione è stata ulteriormente potenziata dall'irradiazione sotto luce visibile. Questi risultati indicano che il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ denaturalizza le proteine spike S1, che svolgono un ruolo essenziale nell'ingresso nelle cellule polmonari, anche in condizioni di oscurità e sotto irradiazione di luce visibile. In precedenza, proprietà di denaturazione simili a quelle dell'albumina, dell'emoagglutinina e della neuraminidasi sono state osservate dalle specie di Cu(I) negli ossidi di rame^{20,24}. Secondo questi studi precedenti, la forte capacità antivirale della specie Cu(I) è dovuta alla sua forte capacità di adsorbimento verso le proteine, piuttosto che agli effetti delle specie reattive dell'ossigeno o degli ioni di rame lisciviati. Pertanto, l'efficiente attività antivirale del fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ anche in condizioni di oscurità è attribuita alla sua forte proprietà di adsorbimento che produce la denaturazione delle proteine. Le molecole di proteine sono state ulteriormente ossidate dal fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ sotto l'illuminazione della luce visibile, poiché i fori fotogenerati nella banda di valenza del TiO_2 , generati attraverso il trasferimento di carica interfacciale, hanno un forte potere ossidativo per la completa decomposizione in molecole di anidride carbonica, come mostrato nelle Informazioni supplementari (Fig 5).

Oltre alla denaturazione delle proteine spike, abbiamo anche analizzato la frammentazione dell'RNA del virus SARS-CoV-2 in seguito all'esposizione al nostro catalizzatore. La figura 5 mostra i cambiamenti nelle copie di RNA del SARS-CoV-2. Analogamente all'andamento del titolo virale e delle proteine spike mostrato in precedenza, anche le copie di RNA sono diminuite con l'esposizione al catalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$, anche in condizioni di oscurità. Inoltre, l'irradiazione con luce visibile del fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ ha migliorato la frammentazione degli RNA nel SARS-CoV-2. Sulla base di questi risultati, la frammentazione dell'RNA da parte del presente fotocatalizzatore contribuisce anche alla sua efficiente attività antivirale.

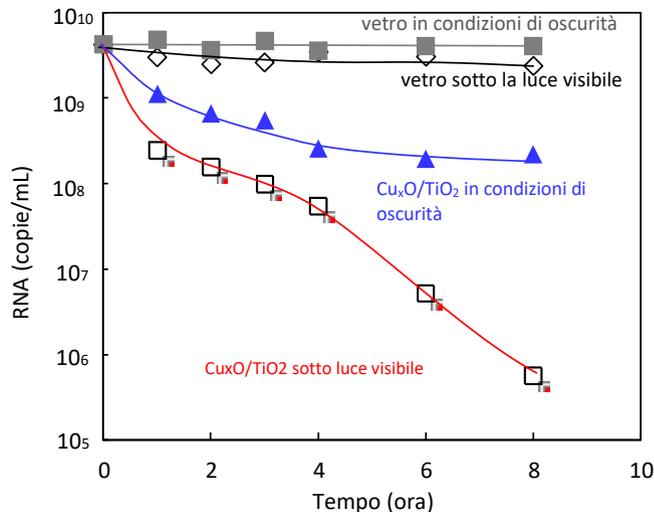


Figura 5. Analisi RT-qPCR per il gene N della SARS-CoV-2. Cambiamenti nelle copie di RNA su vetro e fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ sotto irradiazione di luce visibile o in condizioni di oscurità. L'irradiazione con luce visibile è stata effettuata utilizzando una lampada a fluorescenza bianca la cui luce è stata fatta passare attraverso un filtro UV con un'intensità luminosa di 1000 lx.

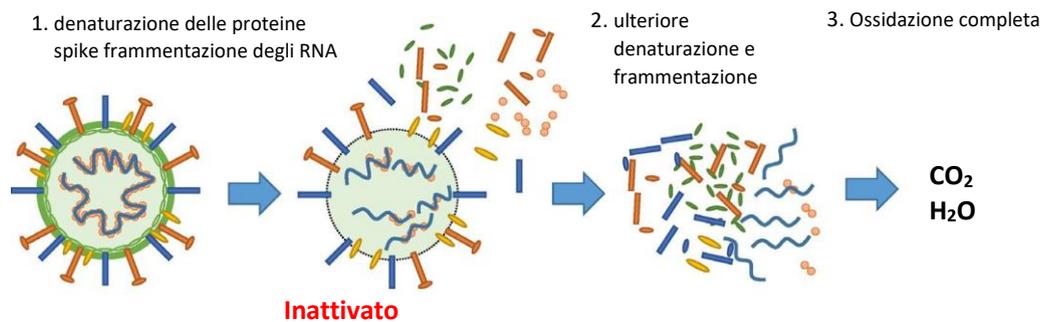


Figura 6. Meccanismo antivirale ipotizzato di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$.

Il presente fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ danneggia sia le proteine spike che gli RNA della SARS-CoV-2, producendo un'efficiente inattivazione sia in condizioni di oscurità che di illuminazione interna. La variazione del numero di copie di RNA sul fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ sotto irradiazione di luce visibile ha mostrato un andamento di riduzione in due fasi (Fig. 5). La fase iniziale di riduzione (0-4 ore) procederebbe con una frammentazione simile degli RNA in condizioni di oscurità. In precedenza, Qiu et al. hanno studiato la degradazione del DNA plasmidico pBR322 superavvolto dalle specie $\text{Cu}(\text{I})$ presenti in Cu_xO e hanno scoperto che il passaggio del DNA plasmidico dalla forma superavvolta a quella circolare aperta è stato chiaramente osservato dall'esposizione alle specie $\text{Cu}(\text{I})$ in Cu_xO anche in condizioni di oscurità²⁵. Pertanto, ipotizziamo che la forte capacità di adsorbimento delle specie di $\text{Cu}(\text{I})$ provochi la frammentazione degli RNA anche in condizioni di oscurità. D'altra parte, la seconda fase di riduzione (4-8 ore) sarebbe ulteriormente guidata dal processo di ossidazione fotocatalitica, che è in grado di ossidare le molecole organiche in molecole di acqua e anidride carbonica. Tuttavia, vorremmo sottolineare che l'ossidazione completa non è necessaria per inattivare il virus SARS-CoV-2 fino al limite di rilevamento. Come mostrato nelle Fig. 2 e 3, un tempo di esposizione di 3 ore è stato sufficiente a $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ per inattivare il SARS-CoV-2 al di sotto del limite di rilevazione, anche in condizioni di oscurità. Questi risultati indicano che l'esposizione di 3 ore a $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ denaturalizza le proteine spike e causa anche la frammentazione dell'RNA, come dimostrato dalle nostre analisi SDS-PAGE, ELISA e RT-qPCR.

La figura 6 mostra il meccanismo antivirale del fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$. La specie $\text{Cu}(\text{I})$ in Cu_xO denaturalizza le proteine spike e provoca anche la frammentazione dell'RNA del SARS-CoV-2, anche in condizioni di oscurità, producendo un'inattivazione al di sotto del limite di rilevazione dopo sole 3 ore. Inoltre, l'irradiazione della luce causa l'ossidazione fotocatalitica delle molecole organiche del SARS-CoV-2. Sulla base di questo meccanismo antivirale, che prevede la denaturazione delle proteine, la frammentazione degli RNA e l'ossidazione delle sostanze organiche tramite fotocatalisi, il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ non è limitato a una specifica variante del virus. Sarà efficace inattivare altri tipi di ceppi mutanti di SARS-CoV-2, come il ceppo Omicron²⁹. Si noti che nel caso di vaccini e/o farmaci orali, esiste la possibilità che in futuro emergano mutanti resistenti. A differenza dei vaccini o dei farmaci, il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ è molto utile perché ha una potenziale efficacia contro vari mutanti in senso lato.

Il presente studio si è concentrato principalmente sull'inattivazione del SARS-CoV-2, che consiste in una membrana dell'involucro.

Abbiamo anche studiato le proprietà antivirali del calicivirus felino (FCV), che non ha un involucro esterno, a differenza del SARS-CoV-2 (vedi Fig. 7 supplementare). In particolare, il presente catalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ ha inattivato gli FCV anche in condizioni di oscurità e le sue prestazioni sono state ulteriormente migliorate con l'irradiazione sotto luce visibile. I nostri studi precedenti hanno anche rivelato che il batteriofago $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ ha inattivato il batteriofago Q β , che non ha una membrana dell'involucro^{25,27}. Questi risultati indicano fortemente che il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ è efficace per l'inattivazione di vari tipi di virus grazie alla sua capacità di denaturazione e/o forte ossidazione. Inoltre, il $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ ha mostrato un significativo effetto antibatterico su *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, nonché sui virus²⁵. Pertanto, il $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ sarà uno dei preziosi materiali anti-microorganismi ad ampio spettro.

È importante discutere la tossicità dell'attuale $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ per il suo utilizzo pratico. È stato riportato il rischio citotossico delle nanoparticelle di TiO_2 e CuO nei confronti delle cellule di pesce zebra e del colon³⁸⁻⁴⁰. D'altra parte, gli studi precedenti hanno esaminato direttamente l'influenza delle particelle di TiO_2 e CuO sulla pelle umana^{41,42}. Questi documenti hanno concluso che il TiO_2 e il CuO presentano un rischio estremamente basso per la pelle umana. Nel presente studio, abbiamo condotto il test di Ames⁴³ sul $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ per valutare il suo rischio genotossico (Materiale supplementare, Tabelle 1 e 2). I risultati del test indicano un rischio estremamente basso. Supponiamo che le attuali particelle antivirali vengano applicate principalmente come materiale di rivestimento allo stato solido su un substrato. In queste applicazioni, le particelle concentrate non sono esposte all'uomo a lungo termine. Pertanto, riteniamo che il nostro materiale antivirale possa essere utilizzato in modo sicuro per diverse applicazioni di rivestimento.

Conclusioni

Il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ ha inattivato il SARS-CoV-2 anche in condizioni di oscurità e le sue prestazioni antivirali sono state migliorate con l'illuminazione a luce bianca, che di solito viene utilizzata come illuminazione interna. In questo modo, la funzione antivirale del fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ può essere mantenuta in un ambiente interno, dove l'illuminazione viene accesa durante il giorno e spenta durante la notte, senza alcuna manutenzione, come la spruzzatura di un liquido antivirale o le procedure di pulizia. Il presente fotocatalizzatore denaturalizza le proteine spike e provoca anche la frammentazione degli RNA del virus SARS-CoV-2, come dimostrato dalle analisi SDS-PAGES, ELISA e RT-qPCR. Il fotocatalizzatore $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ è già stato commercializzato (NAKA CORPORATION, Tokyo Giappone) e si prevede che verrà applicato a vari articoli industriali antivirali in ambienti chiusi, come ospedali, aeroporti, stazioni della metropolitana e scuole, come materiale di rivestimento per filtri dell'aria, maschere respiratorie e tessuti antimicrobici per prevenire la diffusione del COVID-19.

Metodi

Sintesi di polvere e pellicola di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ I nanocluster di Cu_xO sono stati innestati sulla polvere di TiO_2 rutilo utilizzando una tecnica di impregnazione. In una preparazione tipica, un grammo di TiO_2 è stato disperso in 10 mL di soluzione acquosa di CuCl_2 in un reattore a fiala. La frazione di peso del Cu rispetto al TiO_2 era dello 0,25%. Durante l'agitazione, la temperatura della soluzione acquosa è stata mantenuta a 90 °C per 1 h. Poi, alla soluzione sono stati aggiunti idrossido di sodio (NaOH) e glucosio (rapporto molare NaOH/glucosio/ CuCl_2 = 8/4/1) alla stessa temperatura per innestare i nanocluster di Cu_xO sulle particelle di TiO_2 ²⁵.

La polvere di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ è stata sospesa in etanolo al 99% a una concentrazione di 1 mg/ml. Quindi, 0,6 ml di sospensione sono stati caricati in modo uniforme su un substrato di vetro soda-calce (50 mm × 50 mm) ed essiccati a 100 °C per 15 minuti. Ripetendo questa operazione due volte, il substrato di vetro è stato rivestito con polvere di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ (1,2 mg).

Caratterizzazione del fotocatalizzatore. Le immagini di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) sono state ottenute con un TEM/STEM JEM-2100F (JEOL, Giappone) funzionante con una tensione di accelerazione del fascio elettronico di 200 kV. Le immagini di microscopia elettronica a scansione a emissione di campo (FE-SEM) e l'analisi a raggi X a dispersione di energia (EDS) sono state eseguite con un S4700 (Hitachi High-Tech, Giappone). I modelli di diffrazione dei raggi X (XRD) sono stati registrati con un diffrattometro SmartLab (Rigaku, Giappone) con radiazione $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Come substrato è stata utilizzata una lastra di Si non riflettente. Gli spettri di riflettanza diffusa UV-visibile (UV-Vis) sono stati registrati con uno spettrofotometro (V-670, JASCO, Giappone) dotato di un'unità di sfera di integrazione. Gli spettri di assorbimento ottico sono stati ottenuti utilizzando la funzione Kubelka-Munk⁴⁴ calcolati dai dati di riflessione grezzi, in cui una lastra di BaSO_4 bianco è stata utilizzata come standard di riflettanza. Gli spettri di risonanza di spin elettronico (ESR) sono stati registrati con un sistema ESR in situ sotto irradiazione luminosa (EMX Nano, Bruker). Per le misurazioni ESR, la polvere di fotocatalizzatore è stata posta in un tubo di quarzo riempito di azoto gassoso a 90 K con una frequenza di microonde (banda X) compresa tra 9,629 GHz e 9,633 GHz.

Test dell'attività di ossidazione fotocatalitica. L'attività di ossidazione fotocatalitica è stata valutata monitorando l'ossidazione del 2-propanolo gassoso in acetone e anidride carbonica sotto irradiazione di luce visibile, in quanto il percorso di ossidazione è stato ben studiato in un precedente articolo⁴⁵. Un campione di $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$ di 100 mg è stato distribuito uniformemente su una piastra di vetro (5,5 cm²). Prima di ogni test di fotocatalisi, è stata eseguita una pre-irradiazione durante la notte in un recipiente di reazione da 500 mL riempito con aria sintetica fresca per eliminare i contaminanti organici sulla superficie del campione. Successivamente, il gas all'interno del reattore è stato sostituito con aria sintetica fresca e sono stati iniettati 4,1 μmol di 2-propanolo gassoso nel reattore. Prima dell'irradiazione della luce, il sistema è stato tenuto in condizioni di oscurità per 1 ora per consentire al gas 2-propanolo di raggiungere l'equilibrio di assorbimento. L'irradiazione di luce visibile è stata effettuata con un diodo a emissione di luce blu (LED) con un'intensità di 20 mW/cm² misurata con uno spettrometro (USR-40D, Ushio, Giappone), in grado di guidare il trasferimento di carica interfacciale (IFCT) in $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$. Inoltre, è stata utilizzata una fonte di luce visibile di intensità relativamente più elevata (85 mW/cm² da una lampada Xe da 150 W con un filtro UV cutoff inferiore a 420 nm) per verificare se il nostro fotocatalizzatore è in grado di ossidare completamente le molecole di 2-propanolo in anidride carbonica. Le concentrazioni di 2-propanolo e dei gas prodotti di acetone e anidride carbonica sono state misurate con un monitor fotoacustico multigas (1412i, INNOVA).

Ceppo virale. I ceppi di riferimento del virus SARS-CoV-2 utilizzati in questo studio sono stati il ceppo wild-type 2019-nCoV JPN/TY/WK-521 e le varianti di interesse (VOC), tra cui la variante Alpha (B.1.1.7) del ceppo hCoV-19/Japan/QHN001/2020, la variante Beta (B.1.351) del ceppo hCoV-19/Japan/TY8-612/2021, la variante Gamma (B.1.617.2) del ceppo hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 e della variante Delta (P.1) del ceppo hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021, isolati e forniti dal National Institute of Infectious Disease di Tokyo, Giappone, per valutare l'attività antivirale della fotocatalisi. Queste varianti sono state propagate in cellule epiteliali di rene di scimmia verde africana (Vero E6/TMPRSS2, acquistate dalla Japanese Collection of Research Biosources Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation) che sono state coltivate in terreno Eagle modificato di Dulbecco (DMEM, Gibco, USA) integrato con il 10% di siero bovino fetale (FBS) a 37 °C. Il titolo virale è stato determinato con la tecnica del saggio delle placche su strati confluenti di colture cellulari Vero E6/TMPRSS2 cresciute in piastre di coltura a 12 pozzetti, come descritto in precedenza^{46,47}. Le placche sono state quantificate e registrate come unità formanti placche (PFU)/mL. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte e il titolo medio è stato determinato; il test delle placche è stato duplicato in ogni prova. Tutti gli esperimenti di infezione sono stati eseguiti in un laboratorio con livello di biosicurezza 3 (BLS-3).

Analisi dell'inattivazione di CuxO/TiO₂ del virus SARS-CoV-2. L'attività fotocatalitica antivirale di CuxO/TiO₂ contro il virus SARS-CoV-2 è stata determinata in base alla norma ISO 18071:2016 (Fine Ceramics [Advanced Ceramics, Advanced Technical Ceramics]-Determinazione dell'attività antivirale dei materiali fotocatalitici semiconduttori in ambiente di illuminazione interna - Metodo di prova usando batteriofago Q beta) e alla norma JIS R 1756 con lievi modifiche rispetto al nostro studio precedente¹⁵. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in una scatola a tenuta di luce per evitare l'influenza della luce interna e della luce solare. La sospensione virale (100 µL) è stata lasciata cadere su una lastra di vetro rivestita di CuxO/ TiO₂ (50 mm × 50 mm) o su un vetro non rivestito come controllo ed è stata distribuita coprendo con una pellicola adesiva (40 mm × 40 mm). Il campione è stato poi illuminato con irradiazione di luce visibile o in condizioni di oscurità. L'illuminazione dall'alto con luce visibile è stata fornita da una lampada fluorescente tubolare bianca (FL20SSW/18; Toshiba, Giappone) con un filtro UV di cutoff inferiore a 400 nm. L'intensità della luce che raggiungeva la superficie al centro del recipiente di reazione in vetro è stata regolata a 1000 lx modificando la distanza orizzontale tra i campioni e la lampada con un illuminometro digitale IM-5 (TOPCON, Giappone). Dopo il tempo di reazione, il virus è stato raccolto con 5 mL di tampone fosfato salino (PBS; Sigma-Aldrich Corp., USA) e il titolo virale è stato determinato mediante il test delle placche.

Analisi della proteina SARS-CoV-2 sul catalizzatore CuxO/TiO₂ (SDS-PAGE ed ELISA). Dopo essere stati illuminati con il vetro rivestito di CuxO/TiO₂ o con il vetro di controllo per un certo periodo (0-8 h), tutti i campioni sono stati raccolti e le alterazioni quantitative delle proteine sono state analizzate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE) e saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA). Per l'analisi SDS-PAGE, i campioni raccolti sono stati estratti con EzApply (ATTO, Giappone) e la proteina del virus SARS-CoV-2 è stata separata con gel di SDS-poliacrilammide al 10% come precedentemente descritto⁴⁸. Le bande proteiche sono state colorate con SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific, USA) e visualizzate con un sistema di imaging Chemidoc (BioRad, Francia).

La quantificazione della proteina spike S1 SARS-CoV-2 del campione raccolto è stata determinata utilizzando un kit ELISA per la proteina SARS-CoV-2 spike S1 (RK04154; ABclonal, USA), secondo le istruzioni fornite dal produttore. Gli standard di calibrazione sono stati analizzati contemporaneamente ai campioni e hanno permesso all'operatore di produrre una curva standard della densità ottica rispetto alla concentrazione delle proteine spike S1 SARS-CoV-2. La concentrazione dei campioni è stata poi determinata confrontando la D.O. dei campioni con la curva standard. L'assorbimento è stato misurato a 450 nm con uno spettrofotometro. I campioni sono stati analizzati in duplice copia.

Rilevamento del gene N della SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR. La quantità di RNA virale è stata analizzata mediante RT-qPCR. In breve, l'RNA è stato estratto dai campioni utilizzando il QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germania), secondo le istruzioni fornite dal produttore. La RT-qPCR è stata eseguita utilizzando il QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) sul QuantStudio 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher, USA) e la seguente serie di primer/sonde specifici per il gene N virale: il primer anteriore, 5'-AAATTTGGGGACCAGGAAC-3'; il primer inverso, 5'-TGGCAGCTGTGTAGTCAAC-3'; e la sonda, 5'-(FAM) ATGTCCGCATTGGC ATGGA (BHQ)-3'⁴⁹. I valori di soglia del ciclo (Ct) della RT-qPCR sono stati convertiti in numeri di copie di RNA virale sulla base di una curva standard preparata da diluizioni seriali decuplicate di numeri di copie note di RNA di SARS-CoV-2.

Disponibilità dei dati

I dati che supportano i risultati di questo studio sono disponibili nei file dell'articolo e delle Informazioni supplementari o presso gli autori corrispondenti su richiesta ragionevole.

Ricevuto: 6 gennaio 2022; Accettato: 23 marzo 2022

Published online: 14 April 2022

Bibliografia

- Zhu, N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017> (2020).
- Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
- Prather, K. A., Wang, C. C. & Schooley, R. T. Reducing transmission of SARS-CoV-2. *Science* **368**, 1422–1424. <https://doi.org/10.1126/science.abc6197> (2020).
- Feng, B. *et al.* Multi-route transmission potential of SARS-CoV-2 in healthcare facilities. *J. Hazard. Mater.* **402**, 123771. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123771> (2021).

5. Kampf, G., Grotheer, D. & Steinmann, J. Efficacy of three ethanol-based hand rubs against feline calicivirus, a surrogate virus for norovirus. *J. Hospit. Infect.* **60**, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.12.005> (2005).
6. Tuladhar, E., Terpstra, P., Koopmans, M. & Duizer, E. Virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour disinfection. *J. Hospit. Infect.* **80**, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.10.012> (2012).
7. Barclay, L. *et al.* Infection control for norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 731–740. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12674> (2014).
8. Anson, M. L. in *Advances in Protein Chemistry* Vol. 2 (eds M. L. Anson & John T. Edsall) 361–386 (Academic Press, 1945).
9. van Doremalen, N. *et al.* Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1564–1567. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973> (2020).
10. Ito, T. *et al.* Preparation of cerium molybdates and their antiviral activity against bacteriophage $\Phi 6$ and SARS-CoV-2. *Mater. Lett.* **290**, 129510. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.129510> (2021).
11. Fujishima, A., Rao, T. N. & Tryk, D. A. Titanium dioxide photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **1**, 1–21. [https://doi.org/10.1016/S1389-5567\(00\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S1389-5567(00)00002-2) (2000).
12. Mills, A. & Le Hunte, S. An overview of semiconductor photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **108**, 1–35. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(97\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(97)00118-4) (1997).
13. Hoffmann, M. R., Martin, S. T., Choi, W. & Bahnemann, D. W. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chem. Rev.* **95**, 69–96. <https://doi.org/10.1021/cr00033a004> (1995).
14. Ishiguro, H. *et al.* Photocatalytic inactivation of bacteriophages by TiO₂-coated glass plates under low-intensity, long-wavelength UV irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**, 1825–1829. <https://doi.org/10.1039/C1PP05192J> (2011).
15. Nakano, R. *et al.* Photocatalytic inactivation of influenza virus by titanium dioxide thin film. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 1293–1298. <https://doi.org/10.1039/C2PP05414K> (2012).
16. Nakano, R. *et al.* Broad spectrum microbicidal activity of photocatalysis by TiO₂. *Catalysts* **3**, 310–323 (2013).
17. Matsuura, R. *et al.* SARS-CoV-2 disinfection of air and surface contamination by TiO₂ photocatalyst-mediated damage to viral morphology, RNA, and protein. *Viruses* **13**, 942 (2021).
18. Khaiboullina, S., Uppal, T., Dhabarde, N., Subramanian, V. R. & Verma, S. C. Inactivation of human coronavirus by titania nano-particle coatings and UVC radiation: throwing light on SARS-CoV-2. *Viruses* **13**, 19 (2021).
19. Sunada, K., Kikuchi, Y., Hashimoto, K. & Fujishima, A. Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 726–728. <https://doi.org/10.1021/es970860o> (1998).
20. Sunada, K., Minoshima, M. & Hashimoto, K. Highly efficient antiviral and antibacterial activities of solid-state cuprous compounds. *J. Hazard. Mater.* **235–236**, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.052> (2012).
21. Miyauchi, M., Nakajima, A., Watanabe, T. & Hashimoto, K. Photocatalysis and photoinduced hydrophilicity of various metal oxide thin films. *Chem. Mater.* **14**, 2812–2816. <https://doi.org/10.1021/cm020076p> (2002).
22. Irie, H., Miura, S., Kamiya, K. & Hashimoto, K. Efficient visible light-sensitive photocatalysts: grafting Cu(II) ions onto TiO₂ and WO₃ photocatalysts. *Chem. Phys. Lett.* **457**, 202–205. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.04.006> (2008).
23. Irie, H. *et al.* Visible light-sensitive Cu(II)-grafted TiO₂ photocatalysts: activities and X-ray absorption fine structure analyses. *J. Phys. Chem. C* **113**, 10761–10766. <https://doi.org/10.1021/jp903063z> (2009).
24. Minoshima, M. *et al.* Comparison of the antiviral effect of solid-state copper and silver compounds. *J. Hazard. Mater.* **312**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.023> (2016).
25. Qiu, X. *et al.* Hybrid Cu_xO/TiO₂ nanocomposites As risk-reduction materials in indoor environments. *ACS Nano* **6**, 1609–1618. <https://doi.org/10.1021/nn2045888> (2012).
26. Miyauchi, M. *et al.* Visible-light-sensitive photocatalysts: nanocluster-grafted titanium dioxide for indoor environmental remediation. *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 75–84. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.5b02041> (2016).
27. Miyauchi, M., Sunada, K. & Hashimoto, K. Antiviral effect of visible light-sensitive Cu_xO/TiO₂ photocatalyst. *Catalysts* **10**, 1093 (2020).
28. Kupferschmidt, K. & Wadman, M. Delta variant triggers new phase in the pandemic. *Science* **372**, 1375–1376. <https://doi.org/10.1126/science.372.6549.1375> (2021).
29. Torjesen, I. Covid-19: omicron may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. *BMJ* **375**, n2943. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2943> (2021).
30. Dehury, B., Raina, V., Misra, N. & Suar, M. Effect of mutation on structure, function and dynamics of receptor binding domain of human SARS-CoV-2 with host cell receptor ACE2: a molecular dynamics simulations study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **39**, 7231–7245. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1802348> (2021).
31. Walls, A. C. *et al.* Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* **181**, 281–292.e286. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058> (2020).
32. Ke, Z. *et al.* Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* **588**, 498–502. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2> (2020).
33. Kim, J.-M. *et al.* Identification of coronavirus isolated from a patient in Korea with COVID-19. *Osong. Public Health Res. Perspect.* **11**, 3–7. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2020.11.1.02> (2020).
34. Choudhury, B., Dey, M. & Choudhury, A. Defect generation, d-d transition, and band gap reduction in Cu-doped TiO₂ nanoparticles. *Int. Nano Lett.* **3**, 25. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-3-25> (2013).
35. Uema, M. *et al.* Effect of the photocatalyst under visible light irradiation in SARS-CoV-2 stability on an abiotic surface. *Biocontrol Sci.* **26**, 119–125. <https://doi.org/10.4265/bio.26.119> (2021).
36. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pöhlmann, S. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol. Cell* **78**, 779–784.e775. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022> (2020).
37. Mori, T. *et al.* Elucidation of interactions regulating conformational stability and dynamics of SARS-CoV-2 S-protein. *Biophys. J.* **120**, 1060–1071. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.01.012> (2021).
38. Verma, S. K. *et al.* Mechanistic insight into size-dependent enhanced cytotoxicity of industrial antibacterial titanium oxide nanoparticles on colon cells because of reactive oxygen species quenching and neutral lipid alteration. *ACS Omega* **3**, 1244–1262. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01522> (2018).
39. Verma, S. K. *et al.* Mechanistic insight into ROS and neutral lipid alteration induced toxicity in the human model with fins (Danio rerio) by industrially synthesized titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Res.* **7**, 244–257. <https://doi.org/10.1039/C7TX00300E> (2018).
40. Kumari, P. *et al.* Mechanistic insight to ROS and apoptosis regulated cytotoxicity inferred by green synthesized CuO nanoparticles from *Calotropis gigantea* to embryonic zebrafish. *Sci. Rep.* **7**, 16284. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16581-1> (2017).
41. Rashid, M. M., Forte Tavčer, P. & Tomšič, B. Influence of titanium dioxide nanoparticles on human health and the environment. *Nanomaterials* **11**, 2354 (2021).
42. Borkow, G. Safety of using copper oxide in medical devices and consumer products. *Curr. Chem. Biol.* **6**, 86–92. <https://doi.org/10.2174/2212796811206010086> (2012).
43. Maron, D. M. & Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res. Environ. Mutagen. Relat. Subj.* **113**, 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9) (1983).

44. Kim, Y. I., Atherton, S. J., Brigham, E. S. & Mallouk, T. E. Sensitized layered metal oxide semiconductor particles for photochemical hydrogen evolution from nonsacrificial electron donors. *J. Phys. Chem.* **97**, 11802–11810. <https://doi.org/10.1021/j100147a038> (1993).
45. Ohko, Y., Hashimoto, K. & Fujishima, A. Kinetics of photocatalytic reactions under extremely low-intensity UV illumination on titanium dioxide thin films. *J. Phys. Chem. A* **101**, 8057–8062. <https://doi.org/10.1021/jp972002k> (1997).
46. Jureka, A. S., Silvas, J. A. & Basler, C. F. Propagation, inactivation, and safety testing of SARS-CoV-2. *Viruses* <https://doi.org/10.3390/v12060622> (2020).
47. Yano, H. *et al.* Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by gaseous ozone treatment. *J. Hospit. Infect.* **106**, 837–838. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.10.004> (2020).
48. Wu, X. D. *et al.* The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells. *Cell Res.* **14**, 400–406. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290240> (2004).
49. Shirato, K. *et al.* Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.7883/voken.IIID.2020.061> (2020).

Acknowledgements

This work was funded by the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) in Japan (project name: Project to Create Photocatalyst Industry for Recycling-Oriented Society). This NEDO project was directed by Prof. K. Hashimoto at the University of Tokyo, Japan (now president of the National Institute for Materials Science [NIMS], Japan). We are also thankful to the project members of NEDO, including Prof. H. Irie at Yamanashi University, Japan; Dr. M. Minoshima at Osaka University, Japan; Dr. Y. Kuroda at Showa Denko K.K., Japan; Prof. H. Yu at Wuhan University of Technology, China; Prof. X. Qiu and Prof. M. Liu at Central South University, China; and other collaborators for their great help in the development of the present photocatalyst. We also thank Mr. A. Genseki at Open Facility Center, Tokyo Institute of Technology for the TEM observation. This research was also financially supported by the NAKA Corporation (Tokyo) and JSPS Kakenhi (18H02055). Finally, we would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Author contributions

R.N., A.N., Y.S., and H.Y. carried out experimental studies on the inactivation of SARS-CoV-2 and RNA/protein denaturation. K.S., T.N., and H.I. conducted experimental studies on the anti-viral properties of photocatalysts.

A.Y. and M.M. developed the photocatalyst materials and characterised their structures. R.N., H.I., and M.M. conceived the project. M.M. wrote the first draft of this paper, and all authors discussed the results and organisation of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09402-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to R.N., H.I. or M.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022