

Żelazo zerowartościowe, zwłaszcza starzone do zastosowania jako środek przeciwwirusowy, sposób wytwarzania żelaza zerowartościowego oraz żelazo zerowartościowe wytworzone tym sposobem

5 **Dziedzina wynalazku**

Przedmiotem wynalazku jest żelazo zerowartościowe do zastosowania jako środek przeciwwirusowy, w szczególności do profilaktyki i/lub zwalczania infekcji wirusowej, zwłaszcza wywołanej wirusem z rodziny Orthomyxovirade, takim jak wirus grypy, w szczególności wirus grypy typu A, jak również do zastosowania jako środek dezynfekcyjny. Przedmiot wynalazku stanowi również sposób wytwarzania żelaza zerowartościowego otrzymywanego w reakcji redukcji soli żelaza tetraborowodorkiem sodu oraz żelazo zerowartościowe wytworzone tym sposobem do zastosowania jako środek przeciwwirusowy, w szczególności w profilaktyce i/lub zwalczaniu infekcji wirusowej, zwłaszcza wywołanej wirusem z rodziny Orthomyxovirade, takim jak wirus grypy, w szczególności wirus grypy typu A.

15 **Stan techniki**

Wirusy z rodziny Orthomyxovirade to grupa wirusów otoczkowych obejmująca szereg wirusów, których reprezentatywnym przykładem jest wirus grypy. Takie wirusy o stale mutującym genomie bardzo często zmieniają swoje właściwości, w tym wyjątkowo szybko nabywają odporności na istniejące leki oraz szczepionki przeciwwirusowe, co jak wiadomo z historii może być niezwykle śmiertelnym i szybko rozprzestrzeniającym zagrożeniem. Dlatego istnieje pilna potrzeba opracowania nowych skutecznych środków przeciwwirusowych zabezpieczających przed infekcją wirusem tego rodzaju, w tym do zwalczania infekcji wirusem z rodziny Orthomyxovirade, takim jak wirus grypy, w szczególności wirus grypy typu A.

Nanotechnologia to jedna z najmłodszych i jednocześnie najbardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin nauki, którą zainteresowanie zdecydowanie wzrosło w ostatnich latach. Swój rozwój zawdzięcza nowym technologiom, jak i wciąż rosnącemu zapotrzebowaniu na nowe leki i terapie. Co więcej, możliwość syntezy nanocząstek o różnych kształtach, rozmiarach lub modyfikacja ich powierzchni, wyróżniają ich ogromny potencjał aplikacyjny.

Nanocząstki najczęściej są wykorzystywane jako nośniki różnego rodzaju substancji: białek, kwasów nukleinowych, czy też leków. Wyróżniamy różne strategie

zastosowania nanocząstek do zwalczania wirusów, takie jak wykorzystanie nanocząstek jako nośników szczepionek, inhibitorów ekspresji genów czy też leków. Co więcej, nanocząstki metali coraz częściej znajdują zastosowanie nie tylko jako nośniki, ale również jako związki wykazujące działanie przeciwwirusowe. Właściwości hamowania namnażania wirusa grypy wykazują między innymi nanocząstki: srebra, złota, tlenku cynku, tlenku żelaza, dwutlenku tytanu, tlenku wapnia oraz dwutlenku cyrkonu [1].

Dotychczas wykazano, że nanocząstki tlenku żelaza (Fe_3O_4) zastosowane w stężeniu $30 \mu\text{g/ml}$ hamują syntezę RNA wirusa grypy A H1N1 w komórkach MDCK. Wyniki sugerują, że właściwości przeciwwirusowe wynikają z wiązania przez nanocząstki wirusowego RNA [2]. Z kolei w innej z prac opisano aktywność przeciwwirusową nanocząstek tlenku żelaza (Fe_3O_4) zsyntetyzowanych jednoetapowo w układzie solwotermalnym przez połączenie FeCl_3 i octanu sodu w glikolu etylenowym. Nanocząstki te wykazują zdolność do peroksydacji lipidów otoczki wirusa, która to prowadzi do inaktywacji wirusów grypy typu A. Przedstawione badania wskazują na skuteczność działania nanocząstek tlenku żelaza w stosunku do 12 podtypów wirusa grypy typu A. Ponadto, autorzy pracy sugerują, że nanocząstki tlenku żelaza mogą stanowić ogólny środek przeciwwirusowy przeciwko wirusom otoczkowym, takim jak HIV, wirus Ebola, wirus Zika, wirus Zachodniego Nilu i wirus Nipah [3].

W literaturze można znaleźć również zastosowanie nanożelaza jako filtr oczyszczający z wirusów otoczkowych i bezotoczkowych. W podejściu tym wytworzono nanowłókna amyloidowe i pokryto je nanocząstkami oksywodorotlenku żelaza. Nanocząstki oksywodorotlenku żelaza wytrącano bezpośrednio na nanowłóknach poprzez podwyższenie pH w obecności $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Badania przeprowadzono na trzech wirusach otoczkowych: bakteriofagu $\Phi 6$, wirusie grypy A H1N1 oraz wirusie SARS-CoV-2, a także na dwóch wirusach bezotoczkowych: bakteriofagu MS2 i enterowirusie 71. Dla wszystkich badanych wirusów za wyjątkiem enterowirusa 71, po filtracji z zastosowaniem nanocząstek żelaza miano wirusów spadło poniżej progu wykrywalności. Z kolei miano enterowirusa 71 uległo obniżeniu do 1/3 początkowej ilości [4]. Jednakże, z przeprowadzonych badań nie uzyskano odpowiedzi tłumaczącej działanie wytworzonego filtra. Określono, że aktywność przeciwwirusowa nie jest ani wywołana zatrzymywaniem wirionów na materiale filtracyjnym ze względu na małe rozmiary porów, ani też obniżeniem miana wirusa w wyniku kontaktu z nanocząstkami żelaza.

Ze względu na wykazywane właściwości redukujące i katalityczne nanocząstki żelaza na zerowym stopniu utlenienia (ang. zero-valent iron nanoparticles, nZVI) są zaliczane do najistotniejszych nanocząstek pozwalających na efektywną redukcję szerokiej gamy zanieczyszczeń środowiska przyrodniczego, zarówno pochodzenia organicznego jak i nieorganicznego [5]. Żelazo zerowartościowe (ZVI) jest używane do 5 oczyszczania skażonych wód gruntowych od prawie dwóch dekad [6]. Prace z ostatnich lat wykazały, że ZVI jest również stosowane do oczyszczania wody pitnej z zanieczyszczeń wirusowych, bakteryjnych [7], chemicznych i jonami [6,8,9]. Warto podkreślić, że nanocząstki żelaza zerowartościowego dotychczas nie były stosowane 10 jako środki przeciwwirusowe do zwalczania infekcji wirusem z rodziny Orthomyxoviridae, jednakże opisano ich aktywność w stosunku do wirusów: norowirusa ludzkiego i mysiego [10], bakteriofaga MS-2 [11–13] i φX-174 [12,13], adenowirusa 41 i wirusa Aichi [12] oraz cząstek wirusopodobnych [14]. Ponadto, nZVI utleniają się w wodzie i „starzeją się” wraz z upływem czasu, co prowadzi do powstania 15 nietoksycznego magentytu i/lub maghemitu [15,16], sugeruje to niskie ryzyko toksyczności dla ekosystemów.

Wśród praktycznych zastosowań nanocząstek zerowartościowego żelaza znane jest ponadto ich zastosowanie jako składników aktywnych opakowań zawierających tzw. pochłaniacze tlenu [[17] oraz opisy patentowe PL227096 i PL227585].

20 Ze zgłoszenia P.432267 znane jest również zastosowanie nanocząstek zerowartościowego żelaza jako składnika matrycy polimerowej naniesionej w postaci cienkiej powłoki na warstwę wewnętrzną materiału opakowaniowego wykazujących właściwości przeciwbakteryjne, jak również przeciw drożdżom i pleśniam. W ujawnionym rozwiązaniu poprzez wprowadzenie nanocząstek żelaza 25 zerowartościowego do powłoki nanokompozytowej uzyskano hamowanie wzrostu mikroorganizmów, takich jak bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, drożdże i pleśnie. Jednakże do tej pory nie przeprowadzono badań sprawdzających działanie przeciwwirusowe takich nanocząstek.

30 Znane są metody otrzymywania nanocząstek metali, wśród których jedną z powszechnie stosowanych jest chemiczna redukcja soli metali w roztworze.

Sposoby wytwarzania nanocząstek żelaza zerowartościowego oraz ich zastosowanie ujawniono w opisach patentowych PL227096 i PL227585.

W opisie PL227585 przedstawiono sposób wytwarzania nanocząstek żelaza zerowartościowego domieszkowanego borem w reakcji redukcji soli żelaza (III) tetraborowodorkiem sodu w ściśle określonych warunkach reakcji, takich że m.in. stosunek molowy soli żelaza do NaHB_4 wynosi 1:3. W wyniku tak prowadzonego sposobu otrzymano nanocząstki żelaza zerowartościowego wykazujące wyjątkowo dużą 5 aktywność wiązania tlenu w każdym środowisku, w tym bezwodnym, co znalazło zastosowanie tak wytworzonych nanocząstek jako materiału pochłaniającego tlen do umieszczania wewnątrz opakowań do eliminowania tlenu z opakowań, jak również wychwytywania tlenu przenikającego do wnętrza materiału opakowaniowego.

10 Podobny sposób wytwarzania nanocząstek żelaza zerowartościowego również z wykorzystaniem reakcji redukcji soli żelaza tetraborowodorkiem sodu przy zachowaniu takich warunków, że stosunek molowy soli żelaza do NaHB_4 wynosi 1:3 ujawniono w opisie PL227096. W opisie tym również wskazano, że nanocząstki otrzymane opracowanym sposobem wykazują właściwości wiązania tlenu i mogą być stosowane 15 jako pochłaniacz tlenu w opakowaniach.

Sposoby wytwarzania nanocząstek żelaza zerowartościowego ujawnione w powyższych opisach patentowych są kosztowne z uwagi na wymaganą dużą ilość czynnika redukującego zużywanego w reakcji redukcji. Ponadto w wyniku tak prowadzonej reakcji wydziela się duża ilość gazowego wodoru, co jest niebezpieczne.

20 W dziedzinie istnieje zatem wciąż zapotrzebowanie na nowe i skuteczne środki przeciwwirusowe, zwłaszcza do profilaktyki i/lub zwalczania infekcji wirusowej, w szczególności infekcji wirusem z rodziny Orthomyxovirade, takim jak wirus grypy, zwłaszcza wirus grypy typu A. Istnieje wciąż także zapotrzebowanie na nowe i efektywne sposoby wytwarzania żelaza zerowartościowego, w szczególności w postaci 25 nanocząstek.

Celem wynalazku jest opracowanie nowych skutecznych środków przeciwwirusowych do profilaktyki i/lub zwalczania infekcji wirusowej, zwłaszcza wywołanej wirusem z rodziny Orthomyxovirade, takim jak wirus grypy, w szczególności wirus grypy typu A oraz sposobu ich wytwarzania, które pozbawione są 30 wad znanych ze stanu techniki.

Cele te zrealizowano dzięki wynalazkom zdefiniowanym w zastrzeżeniach patentowych będących częścią niniejszego zgłoszenia oraz przedstawionych szczegółowo w niniejszym opisie.

Krótki opis wynalazku

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest żelazo zerowartościowe do zastosowania jako środek przeciwwirusowy.

5 Korzystnie takie żelazo zerowartościowe ma postać nanocząstek o rozmiarach <100 nm, które tworzą aglomeraty.

Korzystnie średnia wielkość hydrodynamiczna aglomeratów nanocząstek mieści się w zakresie 250 do 900 nm.

Korzystnie takie żelazo zerowartościowe jest poddane starzeniu.

10 Korzystnie takie żelazo zerowartościowe jest stosowane do profilaktyki i/lub zwalczania infekcji wirusowej.

Korzystnie wirus stanowi wirus z rodziny Orthomyxoviridae, w szczególności wirus grypy, zwłaszcza wirus grypy typu A.

Korzystnie takie żelazo zerowartościowe jest stosowane jako środek dezynfekcyjny.

15 Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania żelaza zerowartościowego otrzymywanego w reakcji redukcji soli żelaza tetraborowodorkiem sodu NaBH_4 , polegający na tym, że do redukcji jako substancję wyjściową stosuje się sól żelaza (II) lub mieszaninę soli żelaza (II) w stosunku molowym soli żelaza (II) do NaBH_4 wynoszącym 1:2, reakcję prowadzi się w atmosferze ochronnej gazu obojętnego do wytrącenia osadu, następnie osad po wytrąceniu dekantuje się i przemywa do 20 całkowitego usunięcia anionów soli użytej do redukcji, po czym osad sączy się na filtrze nylonowym i suszy.

Korzystnie jako substancję wyjściową stosuje się chlorek żelaza (II).

25 Korzystnie jako substancję wyjściową stosuje się mieszaninę chlorku żelaza (II) i siarczanu żelaza (II).

Korzystnie stosuje się filtr z tkaniny nylonowej, zwłaszcza o splocie 20 DEN.

Korzystnie suszenie prowadzi się metodą liofilizacji.

Korzystnie po etapie suszenia żelazo zerowartościowe poddaje się starzeniu.

Korzystnie starzenie prowadzi się do utlenienia maksymalnie 1% powierzchni.

30 Przedmiot wynalazku stanowi również żelazo zerowartościowe wytworzone sposobem jak określono powyżej do zastosowania jako środek przeciwwirusowy.

Korzystnie takie żelazo zerowartościowe jest stosowane w profilaktyce i/lub zwalczaniu infekcji wirusowej.

Korzystnie wirus stanowi wirus z rodziny Orthomyxovirade, w szczególności wirus grypy, zwłaszcza wirus grypy typu A.

Korzystnie takie żelazo zerowartościowe jest stosowane jako środek dezynfekcyjny.

5 **Szczegółowy opis wynalazku**

Żelazo zerowartościowe (ZVI) to żelazo na zerowym stopniu utlenienia, czyli o zerowej wartościowości. Zgodnie z niniejszym wynalazkiem korzystne jest stosowanie żelaza zerowartościowego w postaci nanocząstek (nZVI).

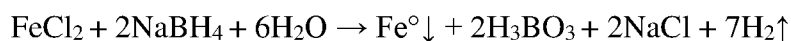
10 Zgodnie z zaleceniami definicyjnymi International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nanocząstki to cząstki o dowolnym kształcie i w przybliżeniu jednym z wymiarów w zakresie od 10^{-9} do 10^{-7} m. Główną cechą materiałów i cząstek w skali nano jest to, że wykazują one inne właściwości niż w większej skali. Ponadto możliwość wyboru różnych rozmiarów, morfologii i modyfikacji powierzchni nanocząsteczek, sprawia, że są one jeszcze bardziej pożądane do szerszego
15 zastosowania. Nanocząstki charakteryzują się zatem specyficzną strukturą geometryczną cechującą się wysokim stosunkiem powierzchni do objętości, której ukształtowanie ma wpływ na właściwości.

20 Nanocząstki żelaza zerowartościowego mogą tworzyć aglomeraty o większych rozmiarach niż nanometryczne. Zgodnie z wynalazkiem średnia wielkość hydrodynamiczna takich aglomeratów korzystnie mieści się w zakresie 250 do 900 nm.

Żelazo zerowartościowe można wytwarzać różnymi sposobami znanymi w dziedzinie, w tym na drodze syntezy z redukcją chemiczną, przy czym korzystnie można je wytwarzać sposobem według wynalazku jak opisano poniżej i przedstawiono w Przykładach.

25 W opracowanym sposobie wytwarzania żelaza zerowartościowego według wynalazku ZVI jest otrzymywane sposobem polegającym na reakcji redukcji soli żelaza borowodorkiem sodu NaBH_4 , przy czym jako materiał wyjściowy stosuje się sól żelaza (II) lub mieszaninę soli żelaza (II), korzystnie chlorek żelaza (II) $[\text{FeCl}_2]$ lub mieszaninę chlorku żelaza (II) i siarczanu żelaza (II) $[\text{FeCl}_2 + \text{FeSO}_4]$.

30 Reakcja redukcji przebiega według poniższego schematu:



Przykładowo, sposób wytwarzania ZVI według wynalazku można przeprowadzić w następujący sposób.

Proces prowadzi się w kolbie szklanej o pojemności odpowiedniej do ilości stosowanych roztworów wodnych reagentów, zaopatrzonej w doprowadzenie i odprowadzenie gazu. W syntezie stosuje się 0,5 M roztwór FeCl_2 (uzyskany przez rozpuszczenie 63,5 g FeCl_2 w 1000 ml odgazowanej wody destylowanej) oraz 0,5 M

5 roztwór NaBH_4 (przygotowany przez rozpuszczenie 37,2 g NaBH_4 w 1000 ml odgazowanej wody destylowanej). Roztwór NaBH_4 następnie wkrapla się z szybkością 0,25 – 0,3 ml/s do roztworu chlorku żelaza aż do momentu zauważenia braku dalszego wytrącania się czarnego osadu oraz wydzielania wodoru. Reakcję należy prowadzić w atmosferze ochronnej gazu obojętnego, korzystnie argonu. Mieszaninę reakcyjną

10 pozostawia się na 24 godz., po czym dodaje pozostały roztwór borowodorku sodu porcjami po 50 ml i pozostawia na 24 godz. w celu stabilizacji osadu. Osad ZVI po zdekantowaniu przemywa się wodą destylowaną aż do całkowitego usunięcia jonów Cl^- . Następnie osad sączy się na filtrze nylonowym, korzystnie z tkaniny nylonowej o splocie 20 DEN opracowanym przez twórców niniejszego wynalazku. Filtr ten pozwala

15 na szczególnie efektywną separację nanocząstek żelaza zerowartościowego z roztworu, która stanowi znaczny problem w sposobach znanych w stanie techniki. Przesączony osad suszy się, korzystnie metodą liofilizacji. Taka procedura filtracji i suszenia zapewnia jednorodność składu otrzymanego preparatu ZVI. Otrzymany preparat ZVI przechowuje się w szczelnym pojemniku w atmosferze ochronnej gazu obojętnego,

20 przykładowo argonu.

Zgodnie z wynalazkiem, chlorek żelaza (II) stosowany jako materiał wyjściowy w sposobie wytwarzania ZVI jest droższym reagentem w porównaniu do dotychczas stosowanego chlorku żelaza (III), niemniej jednak w reakcji jego redukcji zużywa się mniej borowodorku sodu (na 1 g ZVI potrzeba 1,7 g NaBH_4 oraz 2,3 g FeCl_2 , podczas

25 gdy dla otrzymania 1g ZVI w reakcji redukcji chlorku żelaza (III) niezbędne jest użycie 2,3 g NaBH_4 oraz 2,9 g FeCl_3). Przekłada się to na bardziej ekonomiczny efekt procesu prowadzonego według wynalazku. Ponadto w reakcji redukcji prowadzonej według opracowanego sposobu wywarzania żelaza zerowartościowego wydziela się znacznie

30 mniejsza ilość gazowego wodoru ($7\text{H}_2\uparrow$ wobec $10,5\text{H}_2\uparrow$ w konwencjonalnym sposobie), który jest niebezpieczny, a co obserwuje się w przypadku sposobów znanych ze stanu techniki.

Zatem przedstawiony tu sposób wytwarzania ZVI zapewnia wymierne korzyści w postaci bardziej ekonomicznego procesu o mniejszej szkodliwości.

Twórcy niniejszego wynalazku w ramach przeprowadzonych badań nieoczekiwanie stwierdzili, że żelazo zerowartościowe, w szczególności wytwarzane według opracowanego sposobu wykazuje silną aktywność przeciwwirusową.

5 Warunki syntezy ZVI (stosunek ilości soli żelaza do borowodorku; sposób przemywania osadu i jego suszenia) oraz jego późniejszej obróbki (przechowywanie w atmosferze ochronnej gazu obojętnego i/lub starzenie) mają wpływ na rozmiary uzyskanych cząstek oraz ich reaktywność [17–22].

10 Twórcy niniejszego wynalazku przeprowadzili badania ZVI pod kątem właściwości przeciwwirusowych wykonując szereg testów dla reprezentatywnych szczepów wirusów z rodziny Orthomyxovirade, w tym wirusa grypy, określających wpływ inkubacji wirionów z ZVI na ilość i infekcyjność cząstek wirusów. W rezultacie stwierdzono, że ZVI w sposób istotny redukuje ilość wirusa.

15 W celu zbadania miana wirusa grypy, wykonano wyjątkowo czuły test immunofluorescencyjny pozwalający określić ilość jednostek infekcyjnych wirusa w jednym mililitrze badanego supernatantu wirusowego. Wykazano, że przy zastosowaniu ZVI o stężeniu 3 mg/ml już po 15 minutach inkubacji z wirusem grypy nastąpiło istotne obniżenie miana wirusa. Co więcej, już najniższe stężenia użytego do badań ZVI (tj. 0,75 mg/ml) wykazały istotne obniżenie miana wirusa grypy po dwóch godzinach inkubacji z wirusem. Ponadto, zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia ZVI, 20 wzrasta efektywność inaktywacji wirusa grypy. Przy najwyższym zastosowanym stężeniu ZVI (8 mg/ml) uzyskano drastyczne obniżenie miana wirusa grypy z 7,2 log₁₀ do 2,7 log₁₀, co stanowi aż 99,99% ilości wirusa. Działanie przeciwwirusowe ZVI jest więc wyjątkowo silne i zależne od stężenia. Dodatkowo wykonano analizę białek wirusowych techniką Western Blot. Wykazała ona, że po inkubacji wirusa grypy z 25 najniższym stężeniem ZVI nie jest możliwe przyłączenie przeciwciał nakierowanych na białka wirusa grypy, pomimo potwierdzenia ich obecności na membranie inną techniką, co świadczy o unieaktywnieniu antygenów białek wirusa grypy.

Wyniki przeprowadzonych przez twórców niniejszego wynalazku badań na wybranych szczepach wirusa grypy typu A, będącego reprezentatywnym wirusem z 30 rodziny Orthomyxovirade, wykazują skuteczną aktywność przeciwwirusową żelaza zerowartościowego.

W badaniach aktywności przeciwwirusowej badano również wpływ okresu starzenia żelaza zerowartościowego na jego aktywność.

Zgodnie z wynalazkiem, poprzez starzenie ZVI rozumie się wystawienie go na działanie powietrza w temperaturze pokojowej do zmiany barwy z czarnej na brunatną, zwykle 1 godz. Warunki starzenia dobiera się tak, aby powierzchniowemu utlenieniu uległo maksimum 1% preparatu. Schematycznie strukturę nanocząstki starzonego ZVI

5 typu rdzeń – powłoka pasywacyjna przedstawiono na Fig. 3, która różni się od tzw. „świeżego ZVI” tym, że na powierzchni wytwarza się warstwa tlenków żelaza na różnym stopniu utlenienia, która to warstwa ma znaczenie dla aktywności przeciwwirusowej ZVI, jak opisano poniżej i przedstawiono w załączonych

Przykładach wykonania wynalazku.

10 W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono korzystny wpływ starzenia ZVI na jego aktywność przeciwwirusową.

Uzyskane wyniki badań wpływu okresu starzenia ZVI na jego aktywność przeciwwirusową wyraźnie wskazują, że preparaty ZVI po częściowym utlenieniu wykazują znacznie większą aktywność przeciwwirusową. Przy stężeniu 1 mg/ml świeżo

15 przygotowane ZVI w buforze PBS powoduje obniżenie miana wirusa o 1 log₂, podczas gdy ZVI po 36 godz. starzenia w buforze PBS powoduje obniżenie miana wirusa grypy o 2 log₂. Miano wirusa spada do wartości zerowej przy zastosowaniu 2,5 mg/ml świeżo przygotowanego ZVI, natomiast ten sam efekt można uzyskać przy użyciu mniejszej

ilości preparatu ZVI starzonego przez 36 godz. w PBS, a mianowicie 1,75 mg/ml

20 starzonego ZVI wystarczy do obniżenia miana wirusa do zera.

Jak opisano powyżej i przedstawiono w Przykładach na reprezentatywnym przykładzie wirusa z rodziny Orthomyxovirade, czyli wirusie grypy typu A, żelazo zerowartościowe według wynalazku, w szczególności w postaci nanocząstek, które

korzystnie mogą tworzyć aglomeraty, zwłaszcza wytworzone sposobem według

25 wynalazku, charakteryzuje się silnymi właściwościami przeciwwirusowymi, zwłaszcza przeciwko wirusom z rodziny Orthomyxovirade.

Dzięki swoim właściwościom żelazo zerowartościowe, korzystnie w postaci nanocząstek, które mogą być skupione w postaci aglomeratów, może być zatem

stosowane w szeregu aplikacji biologicznych i biomedycznych, w tym,

30 nieograniczająco, do zwalczania i profilaktyki infekcji wirusem z rodziny Orthomyxovirade, a także do innych wirusów otoczkowych z uwagi na podobieństwo budowy z wirusem z rodziny Orthomyxovirade.

Niniejszy wynalazek zostanie poniżej zilustrowany za pomocą przykładów wykonania i figur, które nie mają jednak w jakikolwiek sposób ograniczać zakresu ochrony wynalazku jak zdefiniowano w zastrzeżeniach patentowych.

Krótki opis figur

5 Fig. 1 przedstawia na wykresach wyniki badania wpływu preparatów ZVI Fe1 – Fe4 otrzymanych według Przykładów 1a - 1d na zmniejszenie miana wirusa grypy po 2 godzinach inkubacji. Określenie ilości jednostek infekcyjnych wirusa grypy zostało wykonane przy zastosowaniu testu immunofluorescencyjnego dla szczepów A/California/04/2009 (H1N1) oraz A/PR8/1934 (H1N1). Dane przedstawiono jako
10 średnią \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych eksperymentów, każde wykonane w trzech powtórzeniach. Dla porównań statystycznych przeprowadzono niesparowany test t Studenta z rozkładem dwustronnym (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001). Dokładne wartości przedstawiono w Tabeli 2 (Fe1), Tabeli 3 (Fe2), Tabeli 4 (Fe3) i Tabeli 5 (Fe4).

15 Fig. 2 przedstawia na wykresach wyniki badania wpływu preparatów ZVI Fe1 – Fe4 otrzymanych według Przykładów 1a - 1d na zmniejszenie miana wirusa grypy po inkubacji, badane w interwałach czasowych 15, 30, 60 i 120 minut. Badanie przeprowadzono dla stężenia 3 mg/ml ZVI. Określenie ilości jednostek infekcyjnych wirusa grypy zostało wykonane przy zastosowaniu testu immunofluorescencyjnego dla
20 szczepu A/PR8/1934 (H1N1). Dane przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych eksperymentów, każde wykonane w trzech powtórzeniach. Dla porównań statystycznych przeprowadzono niesparowany test t Studenta z rozkładem dwustronnym (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001). Dokładne wartości przedstawiono w Tabeli 2 (Fe1), Tabeli 3 (Fe2), Tabeli 4 (Fe3) i Tabeli 5 (Fe4).
25

Fig. 3 przedstawia schematycznie strukturę nanocząstki starzonego ZVI typu rdzeń – tlenkowa powłoka pasywacyjna: a) rdzeń żelaza zerowartościowego $\alpha\text{Fe}(0)$, b) FeO , c) $\text{Fe}(\text{OH})_2$, d) $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$, e) FeOOH , f) $\text{Fe}_2\text{O}_3\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$.

Fig. 4 przedstawia zdjęcie elektronomikroskopowe preparatu ZVI Fe1.

30 Fig. 5 przedstawia zdjęcie elektronomikroskopowe preparatu ZVI Fe2.

Przykłady

Otrzymywanie żelaza zerowartościowego (ZVI) i starzonego ZVI oraz badanie ich aktywności przeciwwirusowej

Wszystkie opisane poniżej procedury i analizy doświadczalne przeprowadzono z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów testowych, odczynników i aparatury, postępując zgodnie z zaleceniami producentów stosowanych zestawów, odczynników i aparatury, o ile nie wskazano wyraźnie inaczej. Wszelkie analizy przeprowadzono z
5 zastosowaniem standardowych, powszechnie znanych metod stosowanych w dziedzinie, do której należy niniejszy wynalazek.

Przykład 1. Opis ogólny otrzymywania żelaza zerwartościowego (ZVI) w reakcji redukcji chlorku żelaza (II) borowodorkiem sodu

Proces prowadzono w kolbie szklanej o pojemności 5 dm³ zaopatrzonej w
10 doprowadzenie i odprowadzenie gazu. W 1000 ml odgazowanej wody destylowanej rozpuszczono 63,5 g FeCl₂ uzyskując 0,5 M roztwór. Oddzielnie przygotowano 2500 ml 0,5 M (37,2 g w 1000 ml odgazowanej wody destylowanej) roztworu NaBH₄, który następnie wkraplano z szybkością 0,25 – 0,3 ml/s do roztworu chlorku żelaza do momentu zauważenia braku dalszego wytrącania się czarnego osadu oraz wydzielania
15 wodoru, zwykle 2000 ml. Reakcję prowadzono w atmosferze ochronnej gazu obojętnego argonu. Mieszanie reakcyjną pozostawiano na 24 godz., po czym dodano porcjami po 50 ml pozostałe 500 ml roztworu borowodorku i pozostawiano na 24 godz. w celu stabilizacji osadu. Osad po zdekantowaniu przemywano wodą destylowaną do całkowitego usunięcia jonów Cl⁻. Następnie osad sączono na filtry z tkaniny nylonowej
20 o splocie 20 DEN i suszono metodą liofilizacji. Otrzymany preparat ZVI przechowywano w szczelnym pojemniku w atmosferze ochronnej gazu obojętnego argonu do dalszych zastosowań.

Przykład 1a. Preparat ZVI Fe1

Partię preparatu ZVI otrzymanego w Przykładzie 1 poddano starzeniu
25 wystawiając na działanie powietrza w temperaturze pokojowej przez 1 godz. do zmiany barwy preparatu z czarnej na brunatną.

Warunki starzenia dobierano tak, aby powierzchniowemu utlenieniu uległo maksimum 1% preparatu. W tym celu w szklanym pojemniku o pojemności 150 ml, wypełnionym powietrzem, umieszczono 10 g ZVI i szczelnie zamknięto.

30 W reakcji utleniania 1 g Fe może związać 300 ml O₂. W pojemniku o pojemności 150 ml wypełnionym powietrzem (- 10 ml na preparat) jest 29,4 ml tlenu, który wystarcza na utlenienie powierzchniowe preparatu.

Przeprowadzone badanie elektronomikroskopowe wykazało strukturę nanocząstki starzonego ZVI typu rdzeń - tlenkowa powłoka pasywacyjna, jak przedstawiono schematycznie na Fig. 3. Potwierdza to zdjęcie elektronomikroskopowe starzonego ZVI Fe1 przedstawione na Fig. 4, na którym wyraźnie widoczne są
5 jaśniejsze otoczki tlenków żelaza wokół ziarna żelaza zerwartościowego.

Otrzymany preparat ZVI Fe1 użyto do badań aktywności przeciwwirusowej po 6 miesiącach. W tym celu 100 mg ZVI umieszczono w 1 ml buforu PBS (1X Phosphate Buffered Saline, pH 7,3-7,5; BioShop) na okres co najmniej 36 godzin. Tak przygotowany preparat stosowano do badań właściwości przeciwwirusowych ZVI Fe1.

10 **Przykład 1b. Preparat ZVI Fe2**

Partię preparatu ZVI otrzymanego w Przykładzie 1 poddano starzeniu bezpośrednio po liofilizacji, wystawiając na działanie powietrza w temperaturze pokojowej przez 1 godz. do zmiany barwy preparatu z czarnej na brunatną.

Warunki starzenia dobrano zgodnie z opisem w Przykładzie 1a.

15 Strukturę otrzymanego starzonego ZVI przedstawiono na Fig. 5 za pomocą zdjęcia elektronomikroskopowego.

Otrzymany preparat ZVI Fe2 użyto do badań aktywności przeciwwirusowej po tygodniu. W tym celu 100 mg ZVI umieszczono w 1 ml buforu PBS (1X Phosphate Buffered Saline, pH 7,3-7,5; BioShop) na okres co najmniej 36 godzin. Tak
20 przygotowany preparat stosowano do badań właściwości przeciwwirusowych ZVI Fe2.

Przykład 1c. Preparat ZVI Fe3

Partię preparatu ZVI otrzymanego w Przykładzie 1 po liofilizacji przechowywano w argonie i poddano starzeniu bezpośrednio przed użyciem, wystawiając na działanie powietrza w temperaturze pokojowej przez 1 godz. do zmiany
25 barwy preparatu z czarnej na brunatną.

Warunki starzenia dobrano zgodnie z opisem w Przykładzie 1a.

Następnie 100 mg ZVI umieszczono w 1 ml buforu PBS (1X Phosphate Buffered Saline, pH 7,3-7,5; BioShop) na okres co najmniej 36 godzin. Tak przygotowany preparat stosowano do badań właściwości przeciwwirusowych ZVI Fe3.

30 **Przykład 1d. Preparat ZVI Fe4**

Otrzymywanie ZVI w reakcji redukcji borowodorkiem sodu mieszaniny chlorku żelaza (II) i siarczanu żelaza (II).

Proces prowadzono w kolbie szklanej o pojemności 5 dm³ zaopatrzonej w doprowadzenie i odprowadzenie gazu. W 1000 ml odgazowanej wody destylowanej rozpuszczono 40 g FeCl₂ oraz 40 g FeSO₄ x 4H₂O, uzyskując 0,5 M roztwór soli żelaza. Oddzielnie przygotowano 2500 ml 0,5 M (37,2 g w 1000 ml odgazowanej wody destylowanej) roztworu NaBH₄, który następnie wkraplało z szybkością 0,25 – 0,3 ml/s do roztworu soli żelaza do momentu zauważenia braku dalszego wytrącania się czarnego osadu oraz wydzielania wodoru, zwykle 2000 ml. Reakcję prowadzono w atmosferze ochronnej gazu obojętnego argonu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 24 godz., po czym porcjami po 50 ml dodano pozostałe 500 ml roztworu borowodoru i pozostawiano na 24 godz. w celu stabilizacji osadu. Osad po zdekantowaniu przemywano wodą destylowaną do całkowitego usunięcia jonów Cl⁻. Następnie osad sączone na filtrze z tkaniny nylonowej o splocie 20 DEN i suszono metodą liofilizacji.

Otrzymany preparat początkowo przechowywano w atmosferze ochronnej gazu obojętnego argonu, a następnie poddano starzeniu wystawiając na działanie powietrza w temperaturze pokojowej przez 1 godz. do zmiany barwy preparatu z czarnej na brunatną. Warunki starzenia dobrano zgodnie z opisem w Przykładzie 1a.

Otrzymany preparat ZVI Fe₄ użyto do badań aktywności przeciwwirusowej po tygodniu. W tym celu 100 mg ZVI umieszczono w 1 ml buforu PBS (1X Phosphate Buffered Saline, pH 7,3-7,5; BioShop) na okres co najmniej 36 godzin. Tak przygotowany preparat stosowano do badań właściwości przeciwwirusowych ZVI Fe₄.

Tabela 1. **Charakterystyka preparatów ZVI Fe1 – Fe4**

	Średnia wielkość cząstek Z-ave (nm)	Współczynnik polidispersyjności Pdl	d _{Intensity} (nm)	d _{Number} (nm)	Potencjał Zeta (mV)
Fe1	582,6 / 44,3	0,444 / 0,090	502,1 / 8,73	421,8 / 8,16	22,3 / 0,36
Fe2	402,3 / 14,8	0,506 / 0,056	439,3 / 42,0	144,5 / 95,78	28,8 / 3,41
Fe3	249,3 / 11,7	0,389 / 0,007	373,8 / 74,0	98,5 / 54,54	28,1 / 0,72
Fe4	889,0 / 58,4	0,380 / 0,058	763,3 / 39,3	551,0 / 82,01	16,1 / 0,36

W powyższej tabeli 1 przedstawiono charakterystykę otrzymanych preparatów ZVI Fe1 – Fe4 uzyskaną w wyniku przeprowadzonych badań, które wykazały, że średnia wielkość cząstek (średnica hydrodynamiczna) uzyskanych preparatów po liofilizacji mieści się w zakresie 250 do 900 nm. Badania elektronomikroskopowe tych preparatów wykazały, że składają się one z nanocząstek żelaza zerwartościowego o rozmiarach poniżej 100 nm tworzących skupiska w postaci aglomeratów.

W wyniku przeprowadzonych badań można stwierdzić, że okres starzenia preparatów wpływa na średnią wielkość hydrodynamiczną cząstek żelaza zerowartościowego, która mieści się w zakresie od 250 nm dla ZVI Fe₃ najkrócej starzonego do 580 nm dla ZVI Fe₁ najdłużej starzonego.

5 Okres starzenia ma również wpływ na wartość potencjału Zeta badanych preparatów. Preparat otrzymany z mieszaniny soli żelazawych (ZVI Fe₄) charakteryzuje się największą średnią wielkością hydrodynamiczną cząstek oraz najniższym potencjałem Zeta.

10 Takie właściwości wpływają na aktywność otrzymanych nanocząstek ZVI jak wykazano w przykładach poniżej.

Przykład 2. Badanie aktywności przeciwwirusowej starzonego żelaza zerowartościowego (ZVI)

15 Aktywność przeciwwirusową starzonego żelaza zerowartościowego badano na przykładzie reprezentatywnych szczepów wirusa grypy typu A A/California/04/2009 (H1N1) oraz A/PR8/1934 (H1N1).

20 **Przykład 2a.** ZVI Fe₁ otrzymane w przykładzie 1a poddano testowi immunofluorescencyjnemu pozwalającemu na określenie ilości jednostek infekcyjnych wirusa w jednym mililitrze badanego supernatantu wirusowego. Badania przeprowadzono na stężonych roztworach wirusa grypy typu A (A/California/04/2009 (H1N1) lub A/PR8/1934 (H1N1), o mianie 1×10^8 FFU/ml każdy). W tym celu zmieszano 45 μ l roztworu wirusa z 5 μ l roztworu ZVI (o stężeniu 100 mg/ml) do powstania końcowych stężeń ZVI 0,75, 1,5, 3, 6 oraz 8 mg/ml (do rozcieńczeń wykorzystano bufor PBS). Badane próbki inkubowano w 22°C przez 2 godziny. Dodatkowo zbadano również efektywność przeciwwirusową ZVI dla stężenia 3 mg/ml 25 w czasach 15, 30, 60 minut. W kolejnym etapie supernatant zawierający wirusa został zebrany przy użyciu statywu magnetycznego, wykorzystując właściwości superparamagnetyczne ZVI.

30 W kolejnym etapie przygotowano komórki dla testu immunofluorescencyjnego. Komórki Madin-Darby canine kidney (MDCK) wysiano na 96-dołkowych płytkach w ilości 20 000 komórek w 100 μ l na dołek w pożywce 1x DMEM (Corning) suplementowanej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS; Gibco) i 1% PSG (penicylina — 100 U/ml, streptomycyna — 100 mg/ml, l-glutamina — 2 mM; Gibco) i inkubowano 24 godzinny w standardowych warunkach hodowli (37°C, 5% CO₂, 95%

wilgotności). Seryjne dziesięciokrotne rozcieńczenia badanych supernatantów wirusowych przygotowano w pożywce infekcyjnej zawierającej 0,3% BSA (Sigma), 100 U/ml penicyliny, 100 mg/ml streptomycyny (Sigma) w buforze PBS. Komórki przemyto dwukrotnie 100 µl buforu PBS i infekowano seryjnymi rozcieńczeniami supernatantów wirusowych (50 µl na dołek) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na delikatnie kołyszącej się platformie. Następnie usunięto pożywkę infekcyjną i dodano pożywkę post infekcyjną DMEM suplementowaną 0,2% BSA, 67 U/ml penicyliny, 67 mg/ml streptomycyny, 1,3 mM glutaminy, 2,5 µg/ml N-acetylowanej trypsyny (Sigma), 1% Avicel i inkubowano przez 18-26 godzin (18 godzin dla wirusa A/PR8/1934; 26 godzin dla wirusa A/California/04/2009) w 33°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności. Pożywkę post infekcyjną następnie usunięto, a komórki utrwalono i permeabilizowano w buforze PBS zawierającym 4% roztwór formaldehydu (Sigma), 0,5% roztwór Triton X-100 (BioShop) w przez 20 min w temperaturze pokojowej. Następnie komórki przemyto dwukrotnie 100 µl buforu PBS i inkubowano w 50 µl buforu blokującego zawierającego 2% surowiczej albuminy wołowej (bovine serum albumin; Sigma) w buforze PBS przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Później bufor blokujący zastąpiono 50 µl roztworem przeciwciał pierwszorzędowych nacelowanych na białka wirusowe grypy (nukleoproteiny; MAB8257, Merck) rozcieńczone w buforze PBS (1 µg/ml) i inkubowano przez 1–2 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie komórki przemyto dwukrotnie 100 µl buforu PBS, dodano 50 µl roztworu wyznakowanych fluorescencyjnie przeciwciał drugorzędowych (AP160F, Merck) rozcieńczonych w buforze PBS (6,6 µg/ml) i inkubowano przez 30-60 minut w temperaturze pokojowej. Zliczanie jednostek infekcyjnych wirusa grypy (focus forming units; FFU) przeprowadzono pod mikroskopem fluorescencyjnym i na podstawie rozcieńczeń określono ilość jednostek znajdujących się w jednym mililitrze supernatantu (FFU/ml).

Stwierdzono, że przy zastosowaniu ZVI Fe1 o stężeniu 3 mg/ml już po 15 minutach inkubacji z wirusem grypy istotnie obniżyło się miano wirusa grypy dla szczepu A/PR8/1934 z 7,33 log₁₀ do 6,02 log₁₀, co stanowi 95,14% ilości wirusa (Tabela 2, Fig. 2). Wydłużenie czasu inkubacji z 15 minut do 120 minut nie wpłynęło istotnie na zwiększenie właściwości przeciwwirusowych (p-value = 0,2535), zatem wnioskuje się, że 15 minut jest wystarczającym, a zarazem minimalnym okresem inkubacji. Co więcej, już najniższe stężenie ZVI (tj. 0,75 mg/ml) powoduje istotne

- obniżenie miana wirusa grypy po dwóch godzinach inkubacji z wirusem zarówno dla szczepu A/California/04/2009 jak i A/PR8/1934 (Tabela 2, Fig. 1). Ponadto, zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia ZVI, wzrasta efektywność inaktywacji wirusa grypy. Przy najwyższym zastosowanym stężeniu ZVI (8 mg/ml) uzyskano
- 5 obniżenie miana wirusa grypy szczepu A/PR8/1934 z 7,27 log₁₀ do 4,13 log₁₀, co stanowi aż 99,93% ilości wirusa (Tabela 2, Fig. 1). Dla szczepu A/California/04/2009 uzyskano zbliżone wyniki, gdzie przy najwyższym testowanym stężeniu ZVI (8 mg/ml) obniżono miano wirusa grypy z 7,54 log₁₀ do 4,90 log₁₀, co stanowi aż 99,77% ilości wirusa.
- 10 Na podstawie uzyskanych wyników wnioskuje się, że zastosowane stężenie 8 ml/ml ZVI przy dwugodzinnej inkubacji pozwala na uzyskanie najwyższej efektywności przeciwwirusowej.

Badanie właściwości przeciwwirusowych dla ZVI Fe1 w zależności od:						
czasu inkubacji z ZVI dla wirusa grypy A/PR8/1934						
czas inkubacji [min]	0	15	30	60	120	
miano wirusa grypy [FFU/ml]	2,3E+07	1,1E+06	1,3E+06	6,6E+05	6,4E+05	
miano wirusa grypy wyrażone w log ₁₀	7,33 ± 0,22	6,02 ± 0,22	6,09 ± 0,14	5,76 ± 0,32	5,77 ± 0,24	
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	95,14% ± 2,07%	94,48% ± 1,41%	97,17% ± 1,27%	97,24% ± 1,17%	
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0019 (**)	0,0013 (**)	0,0021 (**)	0,0011 (**)	
stężenia ZVI dla wirusa grypy A/PR8/1934						
stężenie ZVI [mg/ml]	0	0,75	1,5	3	6	8
miano wirusa grypy [FFU/ml]	1,9E+07	8,2E+05	3,6E+05	1,6E+05	1,3E+05	1,4E+04
wyniki wyrażone w log ₁₀	7,27 ± 0,12	5,78 ± 0,41	5,54 ± 0,17	5,10 ± 0,38	5,02 ± 0,35	4,13 ± 0,11
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	95,68% ± 3,24%	98,07% ± 0,54%	99,14% ± 0,63%	99,29% ± 0,50%	99,93% ± 0,01%
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0039 (**)	0,0001 (***)	0,0007 (***)	0,0004 (***)	<0,0001 (****)
stężenia ZVI dla wirusa grypy A/California/04/2009						
miano wirusa grypy [FFU/ml]	3,5E+07	4,2E+05	2,7E+05	1,4E+05	6,9E+04	8,0E+04
wyniki wyrażone w log ₁₀	7,54 ± 0,11	5,60 ± 0,18	5,40 ± 0,20	5,08 ± 0,26	4,83 ± 0,09	4,90 ± 0,04
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	98,81% ± 0,36%	99,23% ± 0,27%	99,61% ± 0,21%	99,81% ± 0,03%	99,77% ± 0,02%
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	<0,0001 (****)	<0,0001 (****)	<0,0001 (****)	<0,0001 (****)	<0,0001 (****)

Tabela 2. **Zmniejszenie miana wirusa grypy po inkubacji z ZVI Fe1.** Określenie ilości jednostek infekcyjnych wirusa grypy zostało wykonane przy zastosowaniu testu

immunofluorescencyjnego dla szczepów A/California/04/2009 (H1N1) oraz A/PR8/1934 (H1N1). Badanie zależności od czasu inkubacji z ZVI wykonano dla 3 mg/ml, a badanie zależności od stężenia ZVI dla 2 godzin inkubacji. Kontrolę stanowiła próba niezawierająca ZVI, wyłącznie bufor PBS. Dane przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z trzech niezależnych eksperymentów, każde wykonane w trzech powtórzeniach. Dla porównań statystycznych przeprowadzono niesparowany test t Studenta z rozkładem dwustronnym (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Przykład 2b. ZVI Fe2 otrzymane jak w przykładzie 1b poddano badaniom według procedur przedstawionych w Przykładzie 2a.

Stwierdzono, że przy zastosowaniu ZVI Fe2 o stężeniu 3 mg/ml już po 15 minutach inkubacji z wirusem grypy istotnie obniżyło miana wirusa grypy dla szczepu A/PR8/1934 z 7,09 log₁₀ do 5,03 log₁₀, co stanowi 98,94% ilości wirusa (Tabela 3, Fig. 2). Wydłużenie czasu inkubacji z 15 minut do 120 minut nie wpłynęło istotnie na zwiększenie właściwości przeciwwirusowych (p-value = 0,2279), zatem wnioskuje się, że 15 minut jest wystarczającym, a zarazem minimalnym okresem inkubacji. Co więcej, już najniższe stężenie ZVI (tj. 0,75 mg/ml) powoduje istotne obniżenie miana wirusa grypy po dwóch godzinach inkubacji z wirusem zarówno dla szczepu A/California/04/2009 jak i A/PR8/1934 (Tabela 3, Fig. 1). Ponadto, zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia ZVI, wzrasta efektywność inaktywacji wirusa grypy. Przy najwyższym zastosowanym stężeniu ZVI (8 mg/ml) uzyskano obniżenie miana wirusa grypy szczepu A/PR8/1934 z 7,30 log₁₀ do 5,01 log₁₀, co stanowi aż 99,54% ilości wirusa (Tabela 3, Fig. 1). Dla szczepu A/California/04/2009 uzyskano zbliżone wyniki, gdzie przy najwyższym testowanym stężeniu ZVI (8 mg/ml) obniżono miano wirusa grypy z 7,54 log₁₀ do 6,05 log₁₀, co stanowi aż 96,60% ilości wirusa.

Na podstawie uzyskanych wyników wnioskuje się, że zastosowane stężenie 8 mg/ml ZVI przy dwugodzinnej inkubacji pozwala na uzyskanie najwyższej efektywności przeciwwirusowej.

Badanie właściwości przeciwwirusowych dla ZVI Fe2 w zależności od:						
czasu inkubacji z ZVI dla wirusa grypy A/PR8/1934						
czas inkubacji [min]	0	15	30	60	120	
miano wirusa grypy [FFU/ml]	1,3E+07	1,3E+05	9,2E+04	1,1E+05	5,1E+04	
miano wirusa grypy wyrażone w log ₁₀	7,09 ± 0,13	5,03 ± 0,38	4,92 ± 0,25	4,99 ± 0,23	4,61 ± 0,34	
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	98,94% ± 0,59%	99,27% ± 0,34%	99,14% ± 0,31%	99,60% ± 0,28%	
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0009 (***)	0,0002 (***)	0,0002 (***)	0,0003 (***)	
stężenia ZVI dla wirusa grypy A/PR8/1934						
stężenie ZVI [mg/ml]	0	0,75	1,5	3	6	8
miano wirusa grypy [FFU/ml]	2,2E+07	2,6E+06	1,5E+06	6,4E+05	2,9E+05	1,0E+05
wyniki wyrażone w log ₁₀	7,30 ± 0,24	6,27 ± 0,41	6,11 ± 0,28	5,55 ± 0,60	5,28 ± 0,47	5,01 ± 0,02
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	88,50% ± 9,48%	93,20% ± 3,89%	97,12% ± 2,86%	98,69% ± 1,20%	99,54% ± 0,01%
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0204 (*)	0,0053 (**)	0,0094 (**)	0,0027 (**)	<0,0001 (****)
stężenia ZVI dla wirusa grypy A/California/04/2009						
miano wirusa grypy [FFU/ml]	3,5E+07	3,1E+06	4,4E+06	1,4E+06	1,5E+06	1,2E+06
wyniki wyrażone w log ₁₀	7,54 ± 0,11	6,48 ± 0,11	6,66 ± 0,33	6,10 ± 0,30	6,18 ± 0,11	6,05 ± 0,20
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	91,19% ± 1,91%	87,42% ± 8,45%	95,96% ± 1,75%	95,66% ± 0,96%	96,60% ± 1,16%
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0007 (***)	0,0004 (***)	0,0001 (***)	0,0001 (***)	0,0004 (***)

Tabela 3. **Zmniejszenie miana wirusa grypy po inkubacji z ZVI Fe2.** Określenie ilości jednostek infekcyjnych wirusa grypy zostało wykonane przy zastosowaniu testu immunofluorescencyjnego dla szczepów A/California/04/2009 (H1N1) oraz A/PR8/1934 (H1N1). Badanie zależności od czasu inkubacji z ZVI wykonano dla 3 mg/ml, a badanie zależności od stężenia ZVI dla 2 godzin inkubacji. Kontrolę stanowiła próba niezawierająca ZVI, wyłącznie bufor PBS. Dane przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z trzech niezależnych eksperymentów, każde wykonane w trzech powtórzeniach. Dla porównań statystycznych przeprowadzono niesparowany test t Studenta z rozkładem dwustronnym (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Przykład 2c. ZVI Fe3 otrzymane jak w przykładzie 1c poddano badaniom według procedur przedstawionych w Przykładzie 2a.

Stwierdzono, że przy zastosowaniu ZVI Fe3 o stężeniu 3 mg/ml już po 15 minutach inkubacji z wirusem grypy istotnie obniżyło miano wirusa grypy dla szczepu A/PR8/1934 z 7,24 log₁₀ do 5,41 log₁₀, co stanowi 98,35% ilości wirusa (Tabela 4, Fig. 2). Jednakże, wydłużenie czasu inkubacji z 15 minut do 120 minut istotnie wpłynęło na

zwiększenie właściwości przeciwwirusowych (p-value = 0,0326 (*)), zatem wnioskuje się, że 120 minut jest najefektywniejszym czasem inkubacji. Co więcej, już najniższe stężenie ZVI (tj. 0,75 mg/ml) powoduje istotne obniżenie miana wirusa grypy po dwóch godzinach inkubacji z wirusem zarówno dla szczepu A/California/04/2009 jak i

5 A/PR8/1934 (Tabela 4, Fig. 1). Ponadto, zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia ZVI, wzrasta efektywność inaktywacji wirusa grypy. Co więcej, ZVI o stężeniu 3 mg/ml już po 15 minutach inkubacji z wirusem grypy istotnie obniżyło miana wirusa grypy dla szczepu A/PR8/1934 z 7,24 log₁₀ do 5,41 log₁₀, co stanowi 98,35% ilości wirusa (Tabela 4, Fig. 2). Przy najwyższym zastosowanym stężeniu ZVI (8 mg/ml)

10 uzyskano obniżenie miana wirusa grypy szczepu A/PR8/1934 z 7,18 log₁₀ do 2,66 log₁₀, co stanowi aż 99,997% ilości wirusa (Tabela 4, Fig. 1). Dla szczepu A/California/04/2009 uzyskano zbliżone wyniki, gdzie przy najwyższym testowanym stężeniu ZVI (8 mg/ml) obniżono miano wirusa grypy z 7,54 log₁₀ do 5,44 log₁₀, co stanowi aż 99,20% ilości wirusa.

15 Na podstawie uzyskanych wyników wnioskuje się, że zastosowane stężenie 8 ml/ml ZVI przy dwugodzinnej inkubacji pozwala na uzyskanie najwyższej efektywności przeciwwirusowej.

Badanie właściwości przeciwwirusowych dla ZVI Fe³ w zależności od:						
czasu inkubacji z ZVI dla wirusa grypy A/PR8/1934						
czasu inkubacji z ZVI dla wirusa grypy A/PR8/1934	0	15	30	60	120	
miano wirusa grypy [FFU/ml]	1,8E+07	3,0E+05	2,3E+05	8,2E+04	5,5E+04	
miano wirusa grypy wyrażone w log ₁₀	7,24 ± 0,14	5,41 ± 0,32	5,36 ± 0,13	4,91 ± 0,09	4,71 ± 0,21	
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	98,35% ± 0,73%	98,70% ± 0,29%	99,54% ± 0,08%	99,70% ± 0,11%	
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0008 (***)	<0,0001 (****)	<0,0001 (****)	<0,0001 (****)	
stężenia ZVI dla wirusa grypy A/PR8/1934						
stężenie ZVI [mg/ml]	0	0,75	1,5	3	6	8
miano wirusa grypy [FFU/ml]	1,5E+07	9,6E+05	3,7E+05	3,9E+04	1,5E+04	4,9E+02
wyniki wyrażone w log ₁₀	7,18 ± 0,05	5,93 ± 0,25	5,51 ± 0,28	4,37 ± 0,60	4,04 ± 0,46	2,66 ± 0,21
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	93,74% ± 2,84%	97,61% ± 1,16%	99,75% ± 0,20%	99,90% ± 0,06%	99,997% ± 0,001%
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0011 (**)	0,0005 (***)	0,0012 (**)	0,0003 (***)	<0,0001 (****)
stężenia ZVI dla wirusa grypy A/California/04/2009						
miano wirusa grypy [FFU/ml]	3,5E+07	3,0E+06	1,8E+06	7,5E+05	3,3E+05	2,8E+05

wyniki wyrażone w log ₁₀	7,54 ± 0,11	6,45 ± 0,14	6,25 ± 0,03	5,85 ± 0,18	5,50 ± 0,15	5,44 ± 0,13
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	91,64% ± 2,26%	94,97% ± 0,24%	97,88% ± 0,65%	99,08% ± 0,23%	99,20% ± 0,18%
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0005 (***)	<0,0001 (****)	0,0002 (***)	<0,0001 (****)	<0,0001 (****)

Tabela 4. **Zmniejszenie miana wirusa grypy po inkubacji z ZVI Fe₃**. Określenie ilości jednostek infekcyjnych wirusa grypy zostało wykonane przy zastosowaniu testu immunofluorescencyjnego dla szczepów A/California/04/2009 (H1N1) oraz A/PR8/1934 (H1N1). Badanie zależności od czasu inkubacji z ZVI wykonano dla 3 mg/ml, a badanie zależności od stężenia ZVI dla 2 godzin inkubacji. Kontrolę stanowiła próba niezawierająca ZVI, wyłącznie bufor PBS. Dane przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z trzech niezależnych eksperymentów, każde wykonane w trzech powtórzeniach. Dla porównań statystycznych przeprowadzono niesparowany test t Studenta z rozkładem dwustronnym (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Przykład 2d. ZVI Fe 4 otrzymane jak w przykładzie 1d poddano badaniom według procedur przedstawionych w Przykładzie 2a.

Stwierdzono, że przy zastosowaniu ZVI Fe₃ o stężeniu 3 mg/ml już po 15 minutach inkubacji z wirusem grypy istotnie obniżyło miana wirusa grypy dla szczepu A/PR8/1934 z 7,12 log₁₀ do 5,89 log₁₀, co stanowi 94,10% ilości wirusa (Tabela 5, Fig. 2). Wydłużenie czasu inkubacji z 15 minut do 120 minut nie wpłynęło istotnie na zwiększenie właściwości przeciwwirusowych (p-value = 0,2081), zatem wnioskuje się, że 15 minut jest wystarczającym, a zarazem minimalnym okresem inkubacji. Co więcej, już najniższe stężenie ZVI (tj. 0,75 mg/ml) powoduje istotne obniżenie miana wirusa grypy po dwóch godzinach inkubacji z wirusem zarówno dla szczepu A/California/04/2009 jak i A/PR8/1934 (Tabela 5, Fig. 1). Ponadto, zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia ZVI, wzrasta efektywność inaktywacji wirusa grypy. Co więcej, ZVI Przy najwyższym zastosowanym stężeniu ZVI (8 mg/ml) uzyskano obniżenie miana wirusa grypy szczepu A/PR8/1934 z 7,18 log₁₀ do 5,09 log₁₀, co stanowi aż 99,997% ilości wirusa (Tabela 5, Fig. 1). Dla szczepu A/California/04/2009 uzyskano zbliżone wyniki, gdzie przy najwyższym testowanym stężeniu ZVI (8 mg/ml) obniżono miano wirusa grypy z 7,54 log₁₀ do 6,12 log₁₀, co stanowi 96,04% ilości wirusa.

Na podstawie uzyskanych wyników wnioskuje się, że zastosowane stężenie 8 ml/ml ZVI przy dwugodzinnej inkubacji pozwala na uzyskanie najwyższej efektywności przeciwwirusowej.

Badanie właściwości przeciwwirusowych dla ZVI Fe4 w zależności od:						
czasu inkubacji z ZVI dla wirusa grypy A/PR8/1934						
czas inkubacji [min]	0	15	30	60	120	
miano wirusa grypy [FFU/ml]	1,4E+07	8,0E+05	7,9E+05	4,5E+05	4,6E+05	
miano wirusa grypy wyrażone w log ₁₀	7,12 ± 0,15	5,89 ± 0,11	5,85 ± 0,23	5,60 ± 0,26		5,59 ± 0,33
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	94,10% ± 1,20%	94,18% ± 2,69%	96,66% ± 1,81%	96,58% ± 1,69%	
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0004 (***)	0,0014 (**)	0,001 (**)		0,0019 (**)
stężenia ZVI dla wirusa grypy A/PR8/1934						
stężenie ZVI [mg/ml]	0	0,75	1,5	3	6	8
miano wirusa grypy [FFU/ml]	1,5E+07	1,4E+06	7,6E+05	4,6E+05	1,3E+05	1,6E+05
wyniki wyrażone w log ₁₀	7,18 ± 0,05	6,10 ± 0,22	5,80 ± 0,34	5,59 ± 0,33	5,09 ± 0,23	5,09 ± 0,36
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	91,01% ± 4,10%	95,01% ± 2,84%	96,97% ± 1,51%	99,13% ± 0,31%	98,99% ± 0,70%
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0012 (**)	0,0021 (**)	0,0012 (**)	0,0001 (***)	0,0006 (***)
stężenia ZVI dla wirusa grypy A/California/04/2009						
miano wirusa grypy [FFU/ml]	3,5E+07	1,0E+07	4,3E+06	1,9E+06	1,6E+06	1,4E+06
wyniki wyrażone w log ₁₀	7,54 ± 0,11	6,95 ± 0,24	6,58 ± 0,26	6,26 ± 0,17	6,20 ± 0,11	6,12 ± 0,19
efektywność w stosunku do kontroli [%]	-	71,82% ± 13,58%	87,92% ± 4,85%	94,53% ± 1,69%	95,41% ± 0,88%	96,04% ± 1,26%
prawdopodobieństwo testowe (p-value)	-	0,0014 (**)	0,0044 (**)	0,0004 (***)	0,0001 (***)	0,0004 (***)

Tabela 5. **Zmniejszenie miana wirusa grypy po inkubacji z ZVI Fe4.** Określenie ilości jednostek infekcyjnych wirusa grypy zostało wykonane przy zastosowaniu testu immunofluorescencyjnego dla szczepów A/California/04/2009 (H1N1) oraz A/PR8/1934 (H1N1). Badanie zależności od czasu inkubacji z ZVI wykonano dla 3 mg/ml, a badanie zależności od stężenia ZVI dla 2 godzin inkubacji. Kontrolę stanowiła próba niezawierająca ZVI, wyłącznie bufor PBS. Dane przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z trzech niezależnych eksperymentów, każde wykonane w trzech powtórzeniach. Dla porównań statystycznych przeprowadzono niesparowany test t Studenta z rozkładem dwustronnym (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Przykład 2e. Preparat ZVI w PBS

Wpływ okresu starzenia w buforze PBS na aktywność przeciwwirusową ZVI.

Partię preparatu ZVI otrzymanego w Przykładzie 1 bezpośrednio po liofilizacji umieszczono w próbówce zawierającej bufor PBS (1X Phosphate Buffered Saline, pH

7,3-7,5; BioShop). Do badań aktywności przeciwwirusowej użyto świeżo przygotowane ZVI w buforze PBS, po 36 godzinach starzenia ZVI w buforze PBS oraz po 7 dniach starzenia ZVI w buforze PBS.

Określenie miana wirusa grypy zostało wykonane przy zastosowaniu testu hemaglutynacji dla szczepu A/California/04/2009 (H1N1). Badanie przeprowadzono po 2 godzinach inkubacji ZVI ze stężonym roztworem wirusa grypy. Wyniki przedstawiono jako \log_2 rozcieńczeń stężonego roztworu wirusa. Kontrolę stanowiła próba niezawierająca ZVI, wyłącznie bufor PBS.

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w poniższej Tabeli 6.

10 Tabela 6. Wpływ czasu inkubacji ZVI w buforze PBS na aktywność przeciwwirusową.

stężenie ZVI [mg/ml]	Miano wirusa grypy		
	świeżo przygotowane ZVI w buforze PBS [\log_2]	36 godzin inkubacji ZVI w buforze PBS [\log_2]	7 dni inkubacji ZVI w buforze PBS [\log_2]
0	3	3	3
1	2	1	1
1,75	1	0	0
2,5	0	0	0
3,5	0	0	0

Przedstawione w Tabeli 6 wyniki badań wpływu czasu starzenia (inkubacji) ZVI w buforze PBS na jego aktywność przeciwwirusową wyraźnie wskazują, że preparaty ZVI po częściowym utlenieniu wykazują znacznie większą aktywność przeciwwirusową. Przy stężeniu 1 mg/ml świeżo przygotowane ZVI w buforze PBS powoduje obniżenie miana wirusa grypy o 1 \log_2 , podczas gdy ZVI po 36 godz. starzenia w buforze PBS powoduje obniżenie miana wirusa grypy o 2 \log_2 . Miano wirusa grypy spada do zera przy użyciu 1,75 mg/ml preparatu starzonego przez 36 godz. w PBS, podczas gdy do uzyskania tego samego efektu potrzeba użyć 2,5 mg/ml świeżo przygotowanego ZVI w buforze PBS.

Przykład 2f. Utleniony preparat ZVI

Partię preparatu ZVI otrzymanego w Przykładzie 1 bezpośrednio po liofilizacji umieszczono w szklanym słoju i wystawiano na działanie powietrza w temperaturze pokojowej przez 48 godz. do zmiany barwy na jasno brązową i następnie użyto do badań aktywności przeciwwirusowej stosując metodykę jak w poprzednich przykładach.

W wyniku przeprowadzonego badania stwierdzono brak aktywności przeciwwirusowej utlenionego preparatu ZVI.

Powyżej przedstawione wyniki przeprowadzonych badań świadczą o wpływie starzenia (powierzchniowego utlenienia preparatów ZVI) na ich aktywność przeciwwirusową. Jednakże całkowite utlenienie preparatów ZVI (Przykład 2f) prowadzi do ich dezaktywacji, mimo doniesień literaturowych o aktywności przeciwwirusowej tlenków żelaza, specjalnie dla tego celu syntezowanych.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz uzyskanych wyników można stwierdzić, że żelazo zerowartościowe (ZVI), w szczególności w postaci nanocząstek tworzących korzystnie aglomeraty, zwłaszcza otrzymane przedstawionym tu sposobem, wykazuje istotną aktywność przeciwwirusową już przy najniższym zastosowanym stężeniu (tj. 0,75 mg/ml) oraz przy najkrótszym badanym czasie inkubacji (tj. 15 minut). Pozwala to na zastosowanie ZVI jako skutecznego środka przeciwwirusowego, w tym jako środka do profilaktyki i/lub zwalczania infekcji wirusowej, zwłaszcza wywołanej wirusem z rodziny Orthomyxoviridae, takim jak wirus grypy, w szczególności wirus grypy typu A, oraz przypuszczalnie również dla innych wirusów otoczkowych na podstawie podobieństwa strukturalnego i mechanizmu działania przeciwwirusowego.

20 Literatura

1. Wieczorek, K.; Szutkowska, B.; Kierzek, E. Anti-influenza strategies based on nanoparticle applications. *Pathogens* **2020**, *9*, 1–24, doi:10.3390/pathogens9121020.
2. Kumar, S.R.; Paulpandi, M.; Manivelraja, M.; Mangalaraj, D.; Viswanathan, C.; Kannan, S.; Ponpandian, N. An in vitro analysis of H1N1 viral inhibition using polymer coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 13409–13418, doi:10.1039/c3ra47542e.
3. Qin, T.; Ma, R.; Yin, Y.; Miao, X.; Chen, S.; Fan, K.; Xi, J.; Liu, Q.; Gu, Y.; Yin, Y.; et al. Catalytic inactivation of influenza virus by iron oxide nanozyme. *Theranostics* **2019**, *9*, 6920–6935, doi:10.7150/thno.35826.
4. Palika, A.; Armanious, A.; Rahimi, A.; Medaglia, C.; Gasbarri, M.; Handschin, S.; Rossi, A.; Pohl, M.O.; Busnadiego, I.; Gübeli, C.; et al. An antiviral trap made of protein nanofibrils and iron oxyhydroxide nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, doi:10.1038/s41565-021-00920-5.

5. Foltynowicz, Z.; Maranda, A.; Czajka, B.; Wachowski, L.; Sałaciński, T. Efektywne usuwanie zanieczyszczeń pochodzenia organicznego i nieorganicznego za pomocą kompozytów na bazie nanocząstek zero wartościowego żelaza n-Fe(0). *Mater. Wysokoenergetyczne / High Energy Mater.* **2018**, 108–146, doi:10.22211/matwys/0172.
- 5 6. Chiu, P.C. Applications of zero-valent iron (ZVI) and nanoscale ZVI to municipal and decentralized drinking water systems-A review. *ACS Symp. Ser.* **2013**, 1123, 237–249, doi:10.1021/bk-2013-1123.ch014.
7. Dong, H.; Li, L.; Lu, Y.; Cheng, Y.; Wang, Y.; Ning, Q.; Wang, B.; Zhang, L.; Zeng, G. Integration of nanoscale zero-valent iron and functional anaerobic bacteria for
10 groundwater remediation: A review. *Environ. Int.* **2019**, 124, 265–277, doi:10.1016/j.envint.2019.01.030.
8. Kar, S.; Tewari, P.K. *Nanotechnology for domestic water purification*; 2013; ISBN 9780857095442.
9. Fu, F.; Dionysiou, D.D.; Liu, H. The use of zero-valent iron for groundwater
15 remediation and wastewater treatment: A review. *J. Hazard. Mater.* **2014**, 267, 194–205, doi:10.1016/j.jhazmat.2013.12.062.
10. Shearer, A.E.H.; Kniel, K.E. Enhanced removal of norovirus surrogates, murine norovirus and tulane virus, from aqueous systems by zero-valent iron. *J. Food Prot.* **2018**, 81, 1432–1438, doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-054.
- 20 11. Kim, J.Y.; Lee, C.; Love, D.C.; Sedlak, D.L.; Yoon, J.; Nelson, K.L. Inactivation of MS2 coliphage by ferrous ion and zero-valent iron nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45, 6978–6984, doi:10.1021/es201345y.
12. Shi, C.; Wei, J.; Jin, Y.; Kniel, K.E.; Chiu, P.C. Removal of viruses and bacteriophages from drinking water using zero-valent iron. *Sep. Purif. Technol.* **2012**,
25 84, 72–78, doi:10.1016/j.seppur.2011.06.036.
13. You, Y.; Han, J.; Chiu, P.C.; Jin, Y. Removal and inactivation of waterborne viruses using zerovalent iron. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 9263–9269, doi:10.1021/es050829j.
14. Chopyk, J.; Kulkarni, P.; Nasko, D.J.; Bradshaw, R.; Kniel, K.E.; Chiu, P.;
30 Sharma, M.; Sapkota, A.R. Zero-valent iron sand filtration reduces concentrations of virus-like particles and modifies virome community composition in reclaimed water used for agricultural irrigation. *BMC Res. Notes* **2019**, 12, 1–8, doi:10.1186/s13104-019-4251-y.

15. Liu, Y.; Lowry, G. V. Effect of particle age (Fe⁰ content) and solution pH on NZVI reactivity: H₂ evolution and TCE dechlorination. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 6085–6090, doi:10.1021/es060685o.
16. Phenrat, T.; Long, T.C.; Lowry, G. V.; Veronesi, B. Partial oxidation (“Aging”) and surface modification decrease the toxicity of nanosized zerovalent Iron. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 195–200, doi:10.1021/es801955n.
17. Foltynowicz, Z. Nanoiron-Based Composite Oxygen Scavengers for Food Packaging. *Compos. Mater. Food Packag.* **2017**, 209–234, doi:10.1002/9781119160243.ch6.
18. Glavee, G.N.; Klabunde, K.J.; Sorensen, C.M.; Hadjipanayis, G.C. Chemistry of borohydride reduction of iron(II) and iron(III) ions in aqueous and nonaqueous media. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 28–35.
19. Woo, H.; Park, J.; Lee, S.; Lee, S. Effects of washing solution and drying condition on reactivity of nano-scale zero valent irons (nZVIs) synthesized by borohydride reduction. *Chemosphere* **2014**, *97*, 146–152, doi:10.1016/j.chemosphere.2013.11.010.
20. Goldstein, N.; Greenlee, L.F. Influence of synthesis parameters on iron nanoparticle size and zeta potential. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, doi:10.1007/s11051-012-0760-5.
21. Wang, Q.; Lee, S.; Choi, H. Aging study on the structure of Fe⁰-nanoparticles: Stabilization, characterization, and reactivity. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 2027–2033, doi:10.1021/jp909137f.
22. Kim, H.S.; Kim, T.; Ahn, J.Y.; Hwang, K.Y.; Park, J.Y.; Lim, T.T.; Hwang, I. Aging characteristics and reactivity of two types of nanoscale zero-valent iron particles (Fe⁰H and Fe⁰H₂) in nitrate reduction. *Chem. Eng. J.* **2012**, *197*, 16–23, doi:10.1016/j.cej.2012.05.018.

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Pełnomocnik:

Elżbieta Pietruszyńska

Rzecznik Patentowy