Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA

București

Școala Doctorală a Facultății de Inginerie Chimică și Biotehnologii

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT EXTINS

SISTEME PE BAZĂ DE HIDROGELURI PENTRU ELIBERARE CONTROLATĂ DE ANTIDOTURI ȘI SUBSTANȚE DECONTAMINANTE

Doctorand

Chim.Adriana-Elena BRATU

Conducător de Doctorat

Prof. Dr. Ing. Izabela-Cristina STANCU

București

2026

Mulțumiri

Îmi exprim profunda recunoștință față de doamna Prof.univ.dr.ing. Izabela-Cristina Stancu pentru îndrumarea, sprijinul și încrederea acordate pe parcursul celor cinci ani de studiu. Răbdarea, calmul și înțelegerea de care a dat dovadă, precum și exigența și sinceritatea cu care mi-a prezentat realitățile mediului de cercetare au contribuit la formarea mea profesională și personală. De asemenea, adresez sincere mulțumiri doamnei Andrada Serafim pentru sprijinul constant, pentru disponibilitatea de a explica și clarifica noțiuni complexe, precum și pentru răbdarea și implicarea în procesul meu de învățare. Totodată, îi mulțumesc Elenei Olăreț pentru ajutorul oferit, pentru colaborare și pentru susținerea pe parcursul activităților desfășurate, contribuind la desfășurarea în bune condiții a acestui demers științific.

Îmi exprim recunoștința față de colectivul din cadrul Centrului de Cercetare și Inovare pentru Apărare CBRN, în special al Laboratorului de Analize Chimice, pentru colaborarea deosebită, sprijinul constant și munca susținută depusă de-a lungul acestui parcurs. Mediul profesional și prietenos a reprezentat un cadru esențial pentru dezvoltarea mea, iar experiențele acumulate îmi doresc să fie doar începutul unei colaborări de durată pentru a continua explorarea acestui domeniu vast și provocator al cercetării științifice. În mod deosebit, adresez mulțumiri doamnei dr. ing. Ginghina Raluca, pentru îndrumare, susținere și pentru parteneriatul profesional construit în timp. Dincolo de rolul său de mentor, a reprezentat un sprijin real și constant, contribuind semnificativ la evoluția mea în acest domeniu. Îmi doresc ca această colaborare să continue pe termen lung, păstrând același entuziasm, rigoare și deschidere către inovare care ne-au ghidat până în prezent.

Îmi exprim sincerele mulțumiri față de colegii din cadrul Academiei Tehnice Militare „Ferdinand I”, pentru sprijinul acordat și pentru colaborarea constructivă de-a lungul acestui parcurs. În mod deosebit, adresez mulțumiri doamnei conf.dr.ing. Gabriela Toader și domnului conf.dr.ing. Aurel Diacon pentru deschiderea, profesionalismul și implicarea de care au dat dovadă. Colaborarea cu dumnealor a reprezentat un real sprijin în dezvoltarea acestui demers științific, iar experiența acumulată îmi doresc să constituie baza unei colaborări pe termen lung, în direcția consolidării și valorificării rezultatelor cercetării.

Îmi exprim recunoștința față de membrii comisiei de îndrumare pentru sprijinul științific, observațiile și recomandările formulate pe parcursul elaborării tezei, care au contribuit la perfecționarea acesteia. De asemenea, adresez sincere mulțumiri tuturor coautorilor lucrărilor care au stat la baza prezentei teze, pentru colaborarea eficientă, schimbul de idei și contribuțiile valoroase aduse pe parcursul desfășurării activității de cercetare.

Nu în ultimul rând, doresc să le mulțumesc părinților mei și fratelui meu pentru sprijinul necondiționat, încrederea și puterea pe care mi le-au oferit de-a lungul acestor ani. Au fost mereu alături de mine și m-au încurajat să merg mai departe, oferindu-mi stabilitate și încredere în propriul parcurs. De asemenea, le sunt recunoscătoare prietenilor mei pentru susținere, pentru înțelegere și pentru momentele în care au reușit să aducă echilibru și energie pozitivă în această perioadă solicitantă.

CUPRINS

PARTEA I. STUDIUL CRITIC AL DATELOR DE LITERATURĂ 7
CAPITOLUL 1
AGENȚI CHIMICI DE RĂZBOI: MECANISME DE ACȚIUNE, BIOMARKERI ȘI METODE DE IDENTIFICARE 7
1.1. Agenți chimici de război: clasificare, proprietăți și caracteristici generale 7
1.2. Mecanisme de acțiune biologică ale agenților vezicanți și neurotoxici 8
1.3. Biomarkeri specifici în urma expunerii la agenți chimici de război 9
1.4. Metode analitice pentru identificarea biomarkerilor specifici formați în urma expunerii la agenți chimici de război 10
1.5. Tratamentul și profilaxia expunerii la agenți chimici de război 11
CAPITOLUL 2
STRATEGII DE DECONTAMINARE ȘI DEZVOLTAREA MATERIALELOR AVANSATE PENTRU APLICAȚII CBRN ȘI BIOMEDICALE 13
2.1. Principii generale ale decontaminării agenților chimici de război 13
2.2. Managementul operațional și metodele convenționale de decontaminare a agenților chimici de război 14
2.3. Hidrogeluri și biomateriale avansate 15
2.4. Hidrogeluri modificate pentru decontaminarea suprafețelor expuse la agenți chimici de război 16
2.5. Hidrogeluri biocompatibile și aplicații biomedicale 17
PARTEA II. CONTRIBUȚII ORIGINALE STUDIUL EXPERIMENTAL 20
CAPITOLUL 3
STUDIUL EXPERIMENTAL PRIVIND DEZVOLTAREA STRATEGIILOR ANALITICE PENTRU IDENTIFICAREA BIOMARKERILOR DE EXPUNERE LA AGENȚI CHIMICI DE RĂZBOI 20
3.1. Necesitatea dezvoltării unor strategii analitice integrate pentru identificarea biomarkerilor de expunere la agenți chimici de război 20
3.2. Metode de prepararea probelor biologice (urină și plasmă) 20
3.3. Dezvoltarea și optimizarea metodei analitice pentru identificare biomarkerilor specifici expunerii la agenți chimici de război 23
3.4. Rezultate și dicuții 26
3.4.1. Identificarea biomarkerilor specifici expunerii la agenți vezicanți și neurotoxici în probe de plasmă și urinăprin LC-MS/MS 26
3.4.2. Identificarea biomarkerilor specifici expunerii la agenți vezicanți și neurotoxici în probe de plasmă și urină prin GC-MS/MS 29
3.5. Concluzii 31
CAPITOLUL 4
STUDIUL EXPERIMENTAL PRIVIND EVALUAREA EFICIENȚEI DE DECONTAMINARE A AGENȚILOR CHIMICI DE RĂZBOI – SOMAN ȘI IPERITĂ - UTILIZÂND SUSPENSII ORGANICE REACTIVE CARE CONȚIN NANOADSORBANȚI DIN OXID DE ZINC (ZnO), DIOXID DE TITAN (TiO_2) ȘI ZEOLIT 32
4.1. Necesitatea dezvoltării unor strategii moderne de decontaminare pentru agenți chimici de război 32
4.2. Metode de sinteză a soluțiilor de decontaminare, caracterizarea fizico-chimică a componentei organice și verificarea compatibilității componentei organice cu nanoparticulele. Testarea eficienței de decontaminare la agenți chimici de război reali 32
4.3. Caracterizare 33
4.4. Rezultate și discuții 33

4. 5. Concluzii 36
CAPITOLUL 5
DEZVOLTAREA UNOR HIDROGELURI PERICULOGENE DETAȘABILE PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI CARE ÎNCORPOREAZĂ STRUCTURI METALO-ORGANICE PENTRU DECONTAMINAREA IMEDIATĂ A IPERITEI 37
5.1. Necesitatea dezvoltării unor hidrogeluri funcționalizate cu structuri metalo-organice pentru decontaminarea agenților vezicanți 37
5.2. Metode de preparare a formulărilor și testarea eficienței decontaminării 37
5.3. Caracterizări 38
5.4. Rezultate și discuții 39
5.5. Concluzii 40
CAPITOLUL 6
HIDROGELURI PENTRU ELIBERAREA CONTROLATĂ A ATROPINEI ÎN SCENARII DE EXPUNERE LA AGENȚI CHIMICI DE RĂZBOI 42
6.1. Necesitatea dezvoltării hidrogelurilor pentru eliberarea controlată a agenților terapeutici în scenarii de expunere la agenți chimici de război 42
6.2. Metode de sinteză a hidrogelurilor funcționalizate pentru eliberarea controlată a sulfatului de atropină 43
6.3. Caracterizări 43
6.4. Rezultate și discuții 44
6.5. Concluzii 45
CAPITOLUL 7
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE 46
7.1. Importanța tezei 46
7.2. Concluzii finale 46
7.3. Sinteza integrativă a rezultatelor experimentale privind identificarea, decontaminarea și tratarea în scenarii de expunere la agenți chimici de război 47
7.4. Contribuții personale 50
7.5. Direcții de cercetare deschise de teză 53

PARTEA I. STUDIUL CRITIC AL DATELOR DE LITERATURĂ

CAPITOLUL 1

AGENȚI CHIMICI DE RĂZBOI: MECANISME DE ACȚIUNE, BIOMARKERI ȘI METODE DE IDENTIFICARE

1.1.Agenți chimici de război: clasificare, proprietăți și caracteristici generale

Agenții chimici de război (ACR) reprezintă o categorie de substanțe toxice cu efecte letale sau cu proprietăți de incapacitare asupra organismelor vii, fiind incluși în cadrul amenințărilor de tip CBRN (chimice, biologice, radiologice și nucleare). Datorită toxicității ridicate, efectelor rapide și dificultății de detecție în anumite condiții, acești compuși constituie un subiect de interes major în domeniul securității și apărării[1, 2].

Din punct de vedere al clasificării, agenții chimici de război pot fi grupați în funcție de mecanismul de acțiune asupra organismului. Cele mai importante categorii includ agenții neurotoxici, agenții vezicanți, agenții sufocanți, agenții iritanți și agenții psihochimici[2, 3]. Agenții neurotoxici, precum sarinul (GB), somanul (GD), VX sau compușii din seria A, acționează prin inhibarea enzimei acetilcolinesterază, conducând la acumularea acetilcolinei și la disfuncții severe ale sistemului nervos[3, 4]. Agenții vezicanți, precum iperita și analogii săi, produc leziuni cutanate și oculare prin mecanisme de alchilare a biomoleculelor[4, 5], în timp ce agenții sufocanți afectează sistemul respirator prin distrugerea țesuturilor pulmonare.

Din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice, acești compuși prezintă o variabilitate ridicată, care influențează comportamentul lor în mediul înconjurător și în organism. Unele substanțe sunt volatile și persistă pentru perioade scurte de timp (sarin), în timp ce altele sunt mai puțin volatile și pot contamina suprafețele pentru o perioadă extinsă de timp (VX, iperita)[2, 6]. Stabilitatea chimică, solubilitatea și reactivitatea determină atât modul de dispersie, cât și mecanismele de degradare și transformare în mediul biologic[5, 6].

O caracteristică importantă a agenților chimici de război este capacitatea acestora de a interacționa rapid cu biomoleculele, conducând la formarea de produși de degradare și aducți biologici. Aceste transformări complică identificarea directă a compusului intact în probe biologice, fiind necesară utilizarea biomarkerilor specifici pentru confirmarea expunerii[3, 5, 7]. Astfel, analiza agenților chimici nu se limitează la detecția substanței inițiale, ci implică o abordare complexă, bazată pe identificarea produșilor rezultați în urma reacțiilor din organism.

În concluzie, agenții chimici de război reprezintă o clasă diversă de compuși, cu proprietăți și mecanisme de acțiune distincte, care impun dezvoltarea unor strategii analitice și operaționale adaptate. Înțelegerea clasificării, proprietăților și comportamentului acestora constituie un element principal pentru dezvoltarea metodelor de detecție, protecție și intervenție în domeniul securității chimice[1, 7].

Clasificarea substanțelor chimice în cadrul Convenției pentru Interzicerea Armelor Chimice (Chemical Warfare Convention - CWC) este realizată pe baza unor criterii legate de toxicitate, utilizări legitime și potențial de utilizare în scopuri militare. Astfel, compușii sunt organizați în trei categorii principale (Schedule 1, 2 și 3)[8], fiecare reflectând nivelul de risc și regimul de control aplicabil. O reprezentare sintetică a acestor categorii și a principalelor caracteristici asociate este prezentată în Figura 1.1.

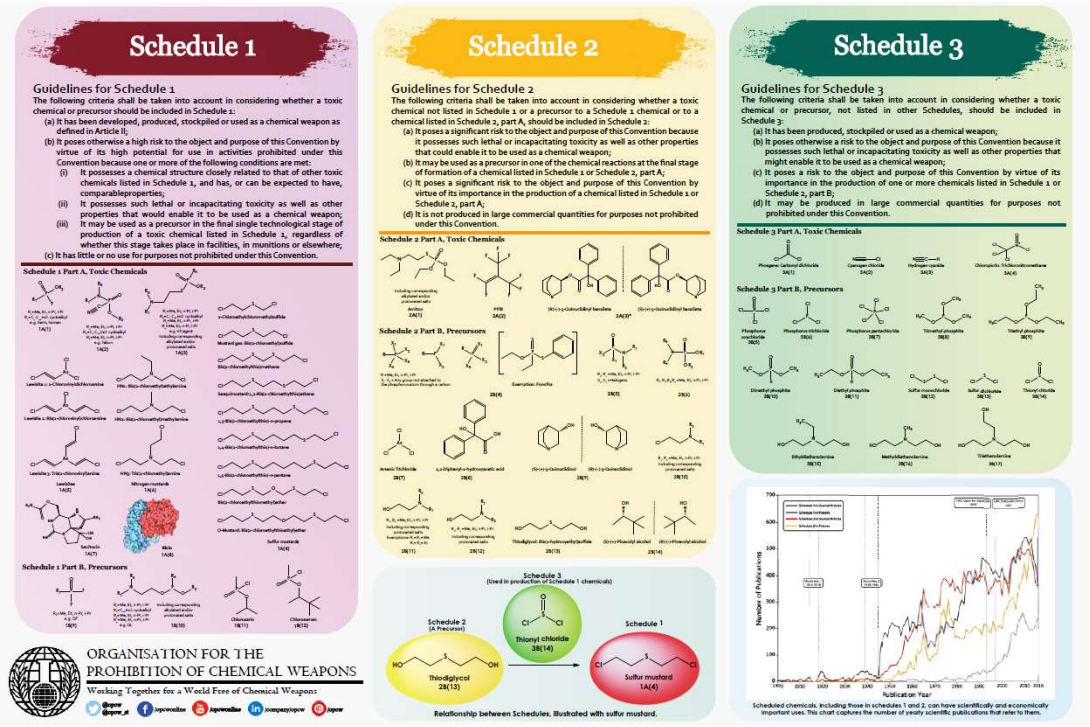


Figura 1.1.*Clasificarea substanțelor chimice conform Convenției pentru Interzicerea Armelor Chimice*[8] *(CWC)*

1.2. Mecanisme de acțiune biologică ale agenților vezicanți și neurotoxici

Analiza mecanismelor de acțiune biologică este importantă nu doar pentru înțelegerea efectelor toxice, ci și pentru fundamentarea abordărilor experimentale adoptate în cadrul prezentei teze. Particularitățile reacțiilor chimice și ale interacțiunilor cu sistemele biologice influențează direct alegerea metodelor analitice pentru identificarea biomarkerilor de expunere, precum și proiectarea materialelor avansate destinate decontaminării și intervenției terapeutice. Astfel, corelarea mecanismelor moleculare cu strategiile de detecție și răspuns permite dezvoltarea unor soluții integrate, adaptate complexității scenariilor reale de expunere. În continuare, sunt prezentate principalele mecanisme de acțiune ale agenților vezicanți și neurotoxici, cu accent pe procesele relevante pentru abordările experimentale investigate.

Agenții neurotoxici, în special compușii organofosforici, acționează prin inhibarea ireversibilă a enzimei acetilcolinesterază (AChE), esențială în reglarea transmiterii impulsurilor nervoase. Prin fosforilarea situsului activ al enzimei, acești compuși determină acumularea excesivă de acetilcolină la nivelul sinapsei, ceea ce duce la stimularea continuă a receptorilor colinergici. Această hiperactivare se manifestă prin efecte muscarinice și nicotinice severe, inclusiv bronhospasm, hipersecreție, convulsii și, în cele din urmă, paralizie respiratorie. În timp, complexul enzimă-inhibitor poate suferi un proces de îmbătrânire celulară, care stabilizează legătura și face extrem de dificilă reactivarea enzimelor, reducând eficacitatea tratamentului dacă intervenția nu este rapidă.

Spre deosebire de agenții vezicanți, pentru agenții neurotoxici există scheme terapeutice bine stabilite, bazate pe administrarea injectabilă de atropină, oxime și anticonvulsivante, care pot contracara efectele toxice dacă sunt administrate prompt. Cu toate acestea, eficacitatea

tratamentului depinde în mod critic de viteza intervenției și de tipul de agent implicat. Astfel, deși există antidoturi stabilite, complexitatea mecanismelor de acțiune și variabilitatea răspunsului terapeutic evidențiază necesitatea dezvoltării continue a strategiilor de detectare și intervenție. În același timp, în cazul agenților vezicanți, pentru care nu există un antidot specific bine definit, cercetările trebuie intensificate în direcția dezvoltării unor soluții de răspuns eficiente, capabile să completeze lipsa terapiilor bine definite.

Agenții veziculari sunt reprezentați de o clasă de substanțe toxice caracterizate prin capacitatea de a produce leziuni severe la nivelul pielii, ochilor și sistemului respirator, în principal prin mecanismul de alchilare a componentelor celulare. Iperita și analogii săi sunt cei mai studiați și relevanți din punct de vedere toxicologic compuși, datorită analogiilor date de utilizările lor istorice și de efectele biologice complexe pe care le induc.

De la utilizarea lor în timpul Primului Război Mondial, agenții vezicanți au reprezentat o amenințare majoră pentru indivizi și au cauzat aproximativ două milioane de victime[9]. O înțelegere clară a acestor agenți și a metodelor lor de acțiune este esențială pentru dezvoltarea unor strategii eficiente de decontaminare și a unor acțiuni terapeutice. Datorită toxicității lor ridicate și utilizării restricționate, au fost efectuate cercetări și rămân multe mecanisme de studiat în ceea ce privește identificarea mecanismului de acțiune biologică a acestor compuși. Au fost dezvoltate diverse soluții de decontaminare și tehnologii de detectare, care s-au dovedit a fi eficiente. Cu toate acestea, un obstacol major pare a fi lipsa dezvoltării adecvate a mecanismului toxicologic de acțiune al acestor compuși.

1.3. Biomarkeri specifici în urma expunerii la agenți chimici de război

Înțelegerea mecanismelor de acțiune biologică ale agenților vezicanți și neurotoxici reprezintă primul pas pentru interpretarea efectelor toxice la nivel molecular și sistemic, constituind totodată baza pentru identificarea unor markeri specifici de expunere, utilizați în confirmarea analitică a contactului cu acești compuși.

Pornind de la aceste mecanisme de acțiune, identificarea biomarkerilor specifici expunerii la agenți chimici de război reprezintă o primă măsură pentru confirmarea expunerii și în evaluarea impactului toxicologic asupra organismului. În cadrul prezentei teze, dezvoltarea și optimizarea strategiilor analitice pentru detectarea acestor biomarkeri constituie un element central, permițând corelarea proceselor biochimice induse de agenții toxici cu metodele moderne de analiză, cât și cu strategia de gestionare a procedurilor de decontaminare și răspuns profilactic pentru combaterea efectelor toxice a acestor clase de compuși.

Identificarea expunerii la agenți chimici de război se bazează pe detectarea unor biomarkeri specifici în matrici biologice, precum plasmă și urină. Reactivitatea ridicată și a transformărie rapide suferite de acești compuși în organism, detecția directă a substanței intacte este adesea dificilă, motiv pentru care analiza acestora este direcționată pe produșii lor de degradare și a aducților formați cu biomoleculele[10, 11].

În cazul agenților neurotoxici, biomarkerii principali sunt reprezentați fie de compuși intacți, fie de produșii de hidroliză, precum acizii alchilmetilfosfonici (EMPA, IMAP, PMPA), detectabili în special în probele de urină[10, 12]. O categorie importantă de biomarkeri primari este reprezentată de aducții formați cu proteinele din plasmă, în special cu butirilcolinesteraza (BChE) sau albumina, unde pot fi puși în evidență sub formă de peptide

modificate în urma digestiei enzimatice[13, 14]. Acești aducți oferă informații precise privind expunerea, având o stabilitate mai mare comparativ cu compușii liberi.

Pentru agenții vezicanți, precum iperita și analogii săi, biomarkerii includ produșii de hidroliză, de tip tiodiglicol (TDG) și derivații acestuia, identificați frecvent în urină, precum și aducți formați cu proteinele din plasmă, în special la nivelul grupărilor nucleofile din lanțurile polipeptidice. În urma reacțiilor de alchilare, se formează compuși stabili care pot fi ulterior identificați prin metode analitice sensibile, oferind dovezi clare ale expunerii.

Analiza biomarkerilor necesită utilizarea unor tehnici analitice avansate, precum LC-MS/MS și GC-MS/MS, capabile să asigure selectivitate și sensibilitate ridicată[11, 15]. Alegerea tipului de biomarker depinde de mai mulți factori, inclusiv timpul scurs de la expunere, stabilitatea compusului și matricea biologică analizată.

1.4. Metode analitice pentru identificarea biomarkerilor specifici formați în urma expunerii la agenți chimici de război

Identificarea biomarkerilor specifici formați în urma expunerii la agenți chimici de război se realizează prin utilizarea unor metode analitice avansate, capabile să asigure sensibilitate ridicată, selectivitate și reproductibilitate, în condițiile unor matrici biologice complex, precum plasmă și urină. Complexitatea acestor probe, precum și concentrațiile reduse ale compușilor țintă, impun dezvoltarea unor strategii analitice integrate, care includ atât etape de pregătire adecvată, cât și tehnici instrumentale performante[16].

Printre cele mai multe metode analitice se numără tehnicile de cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă, în special cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (LC-MS/MS) și cromatografia de gazoase cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (GC-MS/MS). Aceste tehnici permit identificarea și cuantificarea biomarkerilor pe baza tranzițiților specifice ion precursor–ion produs, oferind un grad ridicat de selectivitate prin utilizarea modului de lucru MRM (Multiple Reaction Monitoring).

LC-MS/MS este utilizată în mod predominant pentru analiza compușilor polari sau termolabili, fiind adecvată pentru identificarea produșilor de hidroliză și a aducților biologici, peptidele modificate rezultate din interacțiunea agenților neurotoxici sau vezicanți cu proteinele din plasmă[17]. Avantajele acestei tehnici includ analizele directe ale compușilor în condiții blânde de ionizare, precum și compatibilitatea cu o gamă largă de biomarkeri.

Pe de altă parte, GC-MS/MS este preferată pentru analiza compușilor volatili sau semi-volatili, precum și pentru determinarea acestora prin reacții de derivatizare dacă compușii nu sunt suficient de volatili. Această tehnică oferă o separare eficientă și o fragmentare caracteristică, fiind utilă în special pentru confirmarea compușilor reali și pentru analiza produșilor de hidroliză în urma reacțiilor de derivatizare[18]. Deși fragmentarea în condiții de ionizare prin impact de electroni (EI) este mai complexă comparativă cu LC-MS/MS, această metodă furnizează informații structurale valoroase, utile în procesul de identificare.

Un rolimportant în cadrul acestor metode de identificare îl reprezintă etapa de preparare a probelor, care poate include extracția compușilor din matrice biologică, purificarea, concentrarea și, în unele cazuri, derivatizarea acestora. Alegerea metodei de preparare depinde de natura biomarkerului și de tipul de matrice analizată, fiind importanta pentru obținerea unor rezultate fiabile[16].

1.5. Tratamentul și profilaxia expunerii la agenți chimici de război

Dezvoltarea metodelor analitice pentru identificarea biomarkerilor specifici expunerii la agenți chimici de război reprezintă o etapă esențială nu doar pentru confirmarea expunerii, ci și pentru fundamentarea deciziilor privind intervenția medicală. Informațiile obținute prin tehnici analitice avansate permit evaluarea gradului de expunere și a tipului de agent implicat, aspecte decisive pentru alegerea și eficientizarea strategiilor de tratament și profilaxie. În acest sens, corelarea datelor analitice cu mecanismele de acțiune biologică contribuie la optimizarea răspunsului terapeutic și la dezvoltarea unor soluții adaptate scenariilor reale de expunere. În cadrul prezentei teze, această abordare integrată evidențiază importanța conexiunii dintre detecție și intervenție, justificând analiza detaliată a opțiunilor de tratament și profilaxie prezentate în continuare.Gestionarea expunerii la agenți chimici de război nu se limitează la identificarea și decontaminarea acestora, ci presupune și implementarea unor strategii eficiente de tratament și profilaxie, adaptate mecanismelor toxice specifice fiecărei clase de compuși. Complexitatea acestor intervenții derivă din diversitatea efectelor biologice induse, precum și din absența, în unele cazuri, a unor antidoturi specifice, ceea ce impune abordări terapeutice diferențiate și multidisciplinare.

O categorie distinctă de agenți neurotoxici este reprezentată de compușii din seria Novichok, dezvoltați în cadrul programelor militare sovietice în perioada Războiului Rece. Acești agenți organofosforici de generație nouă au fost concepuți pentru a avea o toxicitate extrem de ridicată și pentru a evita detecția prin metodele standard utilizate la acea vreme.

Din punct de vedere chimic, Novichokurile sunt inhibitori ai acetilcolinesterazei, similari agenților din seriile G și V, însă pot prezenta o toxicitate comparabilă sau chiar superioară acestora[19, 20]. Expunerea determină apariția rapidă a simptomelor colinergice severe, incluzând mioză, convulsii și insuficiență respiratorie.

Interesul pentru această clasă de compuși a crescut în urma unor incidente recente, printre care se numără și cazul otrăvirii opozantului politic Alexei Navalny în anul 2020, în care s-a confirmat utilizarea unui agent din familia Novichok[21]. Acest eveniment a evidențiat atât persistența acestor substanțe în context geopolitic, cât și necesitatea dezvoltării unor metode avansate de detecție și contramăsuri eficiente.

În ceea ce privește agenții neurotoxici, tratamentul intoxicației acute cu această clasă de compuși include decontaminarea, suportul respirator și administrarea de antidoturi specifice.Decontaminarea se realizează prin îndepărtarea hainelor contaminate și spălarea tegumentului cu apă și soluții adecvate, inclusiv hipoclorit de sodiu.Atropina este utilizată pentru antagonizarea efectelor colinergice și se administrează repetat până la controlul secrețiilor. Oximele, precum pralidoxima (2-PAM), reactivează acetilcolinesteraza și contribuie la restabilirea funcției neuromusculare[22, 23].Crizele convulsive sunt tratate cu benzodiazepine, midazolamul fiind preferat pentru acțiunea rapidă.În scop profilactic, bromura de piridostigmină poate fi administrată înainte de expunere, pentru a proteja reversibil enzima de inhibare ireversibilă[24].Cercetările recente au evidențiat utilizarea bioscavengerilor, precum butirilcolinesteraza, precum și potențialul unor agenți neuroprotectori, inclusiv ketamina și dexanabinolul[25].

Pentru o mai bună înțelegere a mecanismelor implicate în toxicitatea agenților neurotoxici, precum și a modului de acțiune al antidoturilor utilizate în tratament, în Figura 1.5.1 este prezentată schematic inhibarea acetilcolinesterazei și intervenția atropinei la nivelul transmisiei colinergice. Din figură reiese atât acumularea acetilcolinei în urma inhibării enzimatice, cât și efectele antagoniste ale atropinei asupra receptorilor muscarinici. În condiții

fiziologice, acetilcolinesteraza hidrolizează rapid acetilcolina în colină și acetat, asigurând terminarea semnalului nervos. În prezența agenților organofosforici, enzima este fosforilată la nivelul situsului activ, ceea ce determină inhibarea acesteia și acumularea acetilcolinei la nivel sinaptic, conducând la stimulare colinergică excesivă. Acest fenomen se manifestă prin efecte muscarinice și nicotinice severe, precum hipersecreții, bronhoconstricție, bradicardie și paralizie musculară. Atropina intervine prin antagonism competitiv la nivelul receptorilor muscarinici, reducând efectele periferice ale excesului de acetilcolină, fără a influența semnificativ receptorii nicotinici, motiv pentru care este utilizată în asociere cu oximele în tratamentul intoxicațiilor cu agenți neurotoxici.

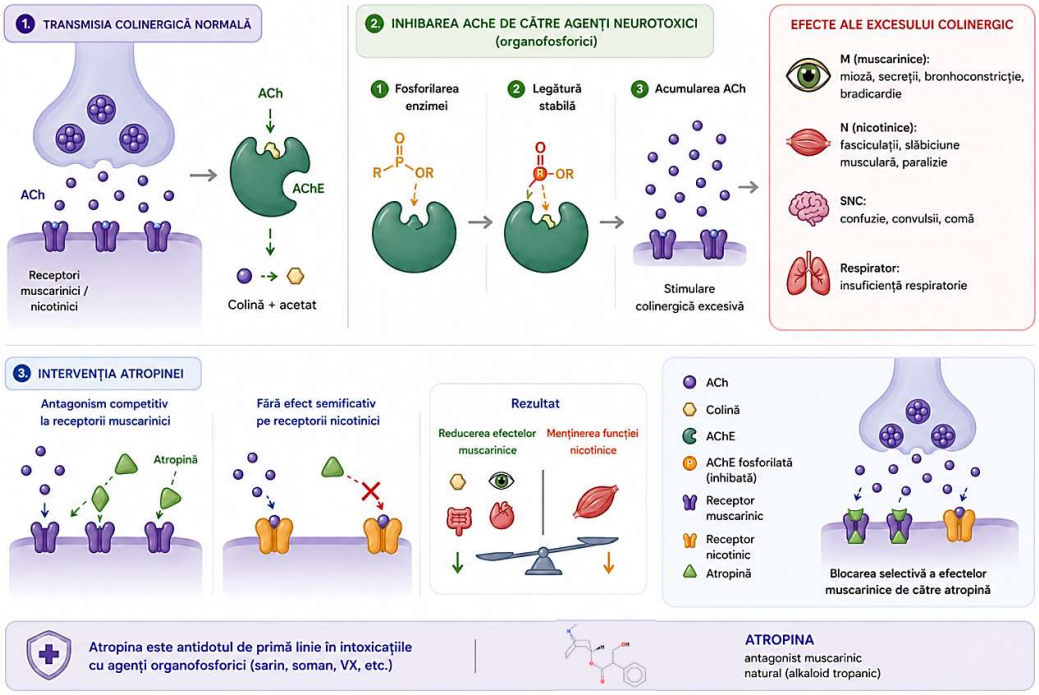


Figura 1.2. *Reprezentare schematică a mecanismului de inhibare a acetilcolinesterazei și a modului de acțiune al atropinei la nivelul transmisiei colinergice*
(*BioRender, accesat martie 2026)*

Importanța atropinei în tratamentul intoxicațiilor cu agenți neurotoxici, precum și limitările asociate administrării sistemice convenționale, au condus la explorarea unor sisteme alternative de livrare a antidoturilor. În acest context, utilizarea hidrogelurilor pentru eliberarea controlată a atropinei reprezintă o direcție inovatoare, care permite administrarea susținută și localizată a substanței active, cu potențial de îmbunătățire a eficienței terapeutice și de reducere a efectelor adverse. Integrarea acestor sisteme în strategiile de răspuns la incidente chimice reflectă tranziția de la abordări reactive la soluții avansate, cu rol atât terapeutic, cât și profilactic.

Tratamentul expunerii la iperită este în principal simptomatic, în absența unui antidot specific. Intervenția include evacuarea din zona contaminată, decontaminarea[26] prin îndepărtarea hainelor și spălarea tegumentului, urmată de tratamentul leziunilor cutanate cu corticosteroizi și agenți antimicrobieni[27, 28]. În cazul afectării extinse, abordarea este similară managementului arsurilor.În cazul expunerii oculare, sunt necesare irigații ale ochilor, aplicarea de antibiotice topice și steroizi[27]. Pneumonia chimică se caracterizează prin tuse

productivă, dispnee și febră și apare după 12–24 de ore de la inhalare[29]. Infecțiile apar, în general, între ziua a treia și a cincea, debutând cu febră crescută, infiltrate pulmonare, creșterea secreției de spută și modificarea culorii acesteia[2].Formarea pseudomembranelor poate necesita bronhoscopie[30]. Bronhodilatatoarele și glucocorticoizii sunt benefice în cazul bronhospasmului. Supresia măduvei osoase începe în ziua a treia după expunere și atinge un maxim la 7–14 zile; în acest caz, poate fi necesară stimularea hematopoiezei (prin factori de creștere granulocitari) sau, în cazuri severe, transplant de măduvă osoasă[27].În studiile experimentale pe animale s-a observat și efectul benefic al unor compuși de tip vaniloid și al N-acetilcisteinei[31].

În cazul altor agenți vezicanți, precum levizita, abordarea terapeutică prezintă elemente comune, însă se diferențiază prin existența unui antidot specific.Tratamentul constă în îndepărtarea rapidă a victimelor din zona contaminată de către personalul echipat corespunzător, urmată de decontaminare prin îndepărtarea hainelor și spălarea tegumentului. Spre deosebire de iperită, pentru lewizită există un antidot specific, dimercaprolul (BAL), utilizat pentru prevenirea toxicității sistemice. De asemenea, agenții de chelare precum 2,3-dimercaptopropan-1-sulfonatul (DMPS), acidul mezo-2,3-dimercaptosuccinic (DMSA) și derivații acestuia pot avea efecte benefice în urma administrării orale sau intravenoase[2].

CAPITOLUL 2

STRATEGII DE DECONTAMINARE ȘI DEZVOLTAREA MATERIALELOR AVANSATE PENTRU APLICAȚII CBRN ȘI BIOMEDICALE

2.1. Principii generale ale decontaminării agenților chimici de război

Deși strategiile de tratament și profilaxie reprezintă un rol important în gestionarea efectelor expunerii la agenți chimici de război, eficiența acestora depinde în mod critic de limitarea rapidă a contaminării și de reducerea absorbției agentului toxic. În acest context, decontaminarea reprezintă o etapă fundamentală în lanțul de intervenție, contribuind direct la diminuarea încărcării toxice și la prevenirea expunerii secundare. Corelarea măsurilor de decontaminare cu informațiile privind mecanismele de acțiune și cu datele analitice obținute prin identificarea biomarkerilor permite dezvoltarea unor strategii integrate de răspuns, adaptate complexității scenariilor reale. În cadrul prezentei teze, această abordare evidențiază importanța optimizării proceselor de decontaminare, ca element principal în reducerea riscului chimic și în completarea intervențiilor terapeutice. În continuare, sunt prezentate principiile generale care stau la baza decontaminării agenților chimici de război.

Decontaminarea agenților chimici de război reprezintă prima contramăsură în gestionarea situațiilor de expunere de tip CBRN, având ca obiectiv principal reducerea sau eliminarea contaminării de pe suprafețe, echipamente, mediu sau organisme vii. Procesul de decontaminare urmărește limitarea efectelor toxice ale agenților toxici, prevenirea propagării contaminării și protejarea personalului implicat în intervenție.

Principiile generale ale decontaminării se bazează pe o combinație de mecanisme fizice și chimice, adaptate în funcție de natura agentului chimic și de tipul de suprafață contaminată. Din punct de vedere fizic, decontaminarea implică îndepărtarea mecanică a contaminantului prin spălare, diluție sau adsorbție pe materiale poroase. Aceste metode sunt eficiente în

special pentru agenții persistenți, reducând cantitatea de contaminant disponibilă pentru absorbție sau volatilizare.

Decontaminarea chimică presupune transformarea agenților toxici în compuși mai puțin periculoși, prin reacții de hidroliză, oxidare sau neutralizare. Alegerea agentului de decontaminare are un rol important și depinde de structura chimică a compusului țintă. De exemplu, agenții organofosforici pot fi degradați prin reacții de hidroliză sau oxidare, în timp ce agenții vezicanți, precum iperita, pot suferi reacții de oxidare sau substituție nucleofilă. În acest context, eficiența procesului este influențată de factori precum pH-ul, temperatura, timpul de contact și natura mediului în care are loc reacția[32].

Un aspect important al decontaminării îl reprezintă clasificarea agenților chimici în funcție de persistență. Agenții nepersistenți, precum sarinul, se evaporă rapid și necesită intervenții rapide pentru limitarea expunerii, în timp ce agenții persistenți, precum VX sau iperita, pot rămâne pe suprafețe pentru perioade îndelungate, necesitând metode de decontaminare mai intensive și durabile.

În ultimii ani, cercetările s-au orientat către dezvoltarea unor materiale funcționale avansate, capabile să combine procesele de adsorbție și degradare într-un singur sistem. Acestea includ materiale nanostructurate, oxizi metalici, zeoliți sau structuri metalo-organice, care oferă suprafețe active extinse și proprietăți reactive îmbunătățite. Integrarea acestor materiale în sisteme aplicative, precum suspensii sau hidrogeluri, permite dezvoltarea unor soluții eficiente pentru decontaminarea rapidă și controlată[33, 34].

Decontaminarea agenților chimici de război reprezintă un proces complex, care necesită o abordare adaptată în funcție de tipul agentului și de condițiile de intervenție. Înțelegerea mecanismelor implicate și dezvoltarea unor soluții inovatoare contribuie semnificativ la creșterea eficienței intervenției și la reducerea riscurilor asociate expunerii la compuși toxici.

2.2. Managementul operațional și metodele convenționale de decontaminare a agenților chimici de război

Principiile generale ale decontaminării oferă cadrul conceptual necesar pentru înțelegerea proceselor implicate în reducerea contaminării chimice, însă aplicarea eficientă a acestora în condiții reale presupune integrarea într-un sistem operațional riguros. Gestionarea incidentelor chimice implică organizarea spațială a zonei afectate, stabilirea etapelor de intervenție și utilizarea unor metode de decontaminare validate, adaptate tipului de agent și condițiilor de mediu. În cadrul prezentei teze, această etapă are un rol important în fundamentarea direcțiilor experimentale ulterioare, permițând corelarea cerințelor operaționale cu dezvoltarea materialelor avansate destinate decontaminării. În continuare, sunt prezentate principalele strategii de management operațional și metodele convenționale utilizate în decontaminarea agenților chimici de război.

Managementul operațional al decontaminării agenților chimici de război reprezintă un ansamblu de proceduri și măsuri organizatorice menite să limiteze efectele expunerii și să prevină extinderea contaminării în situații de urgență CBRN. Acesta implică coordonarea rapidă a resurselor, evaluarea riscurilor și implementarea unor protocoale standardizate de intervenție, adaptate tipului de agent chimic și mediul afectat.

Un element central al managementului operațional îl constituie stabilirea zonelor de intervenție, delimitate în funcție de gradul de contaminare: zona fierbinte (hot zone), unde contaminarea este maximă și accesul este strict controlat; zona caldă (warm zone), destinată operațiunilor de decontaminare; și zona rece (cold zone), în care se desfășoară activități de

suport și monitorizare. Această organizare permite reducerea riscului de contaminare secundară și protejarea personalului implicat[35].

Metodele convenționale de decontaminare includ proceduri fizice și chimice, aplicate în funcție de tipul agentului chimic și de suprafața contaminată. Decontaminarea chimică implică utilizarea unor agenți reactivi care transformă compușii toxici în produși mai puțin periculoși. Printre cei mai utilizați agenți de decontaminare se numără soluțiile pe bază de hipoclorit, peroxizi sau compuși alcalini, care acționează prin mecanisme de oxidare sau hidroliză. Aceste metode sunt eficiente în special pentru neutralizarea agenților organofosforici și a agenților vezicanți, însă pot prezenta limitări legate de compatibilitatea cu suprafețele tratate sau de generarea unor produși secundari de degradare[36].

Un alt aspect important îl reprezintă timpul de intervenție, care influențează direct eficiența procesului de decontaminare. Intervențiile rapide pot reduce semnificativ gradul de contaminare și pot limita absorbția agenților chimici în organism sau în materiale. În același timp, condițiile de mediu, precum temperatura, umiditatea și tipul suprafeței, pot afecta eficiența metodelor aplicate.

Deși metodele convenționale de decontaminare stau la baza gestionării situațiilor de urgență, acestea prezintă limitări legate de eficiența în cazul agenților persistenți, de consumul ridicat de resurse și de impactul asupra mediului. În acest context, cercetările actuale sunt orientate către dezvoltarea unor soluții alternative, bazate pe materiale funcționale și sisteme reactive, capabile să ofere o decontaminare mai eficientă și mai sustenabilă[37].

2.3. Hidrogeluri și biomateriale avansate

Limitările metodelor convenționale de decontaminare, evidențiate atât din perspectiva eficienței în condiții reale, cât și a compatibilității cu diferite tipuri de suprafețe și materiale, au condus la orientarea cercetărilor către dezvoltarea unor sisteme de materiale avansate, capabile să răspundă cerințelor actuale din domeniul securității chimice. În acest context, biomaterialele polimerice, în special hidrogelurile, au atras un interes considerabil datorită proprietăților lor specifice, precum capacitatea de a reține cantități semnificative de lichid, de a adera la suprafețe și de a permite integrarea unor compuși activi implicați în procese de adsorbție și degradare chimică. Aceste caracteristici permit abordarea simultană a mai multor etape ale procesului de decontaminare, contribuind la reducerea riscului de redistribuire a contaminantului și la îmbunătățirea controlului asupra procesului.

În cadrul prezentei teze, explorarea acestor materiale are rolul de a răspunde limitărilor identificate la nivelul metodelor convenționale, prin dezvoltarea unor sisteme capabile să combine retenția și neutralizarea agenților chimici într-o manieră controlată și adaptată scenariilor reale de expunere. În continuare, sunt prezentate principalele caracteristici ale hidrogelurilor și ale biomaterialelor polimerice, precum și potențialul acestora în aplicații de decontaminare.

Hidrogelurile reprezintă o clasă importantă de biomateriale avansate, caracterizate prin capacitatea de a reține cantități semnificative de apă în structura lor tridimensională reticulată. Datorită acestei proprietăți, hidrogelurile prezintă o similitudine structurală și funcțională cu matricea extracelulară, ceea ce le conferă o biocompatibilitate ridicată și le recomandă pentru aplicații biomedicale și de protecție în domeniul CBRN.

Din punct de vedere structural, hidrogelurile sunt formate din rețele polimerice stabilizate prin legături fizice sau chimice, care determină proprietățile mecanice, gradul de

gonflare și comportamentul de transport al substanțelor în interiorul acestora. Polimerii utilizați pot avea origine naturală (alginat, gumă arabică, gelatină) sau sintetică, fiecare categorie prezentând avantaje specifice în ceea ce privește biocompatibilitatea, stabilitatea și controlul proprietăților finale ale materialului[38].

Un aspect important în dezvoltarea hidrogelurilor funcționale îl reprezintă posibilitatea de funcționalizare, prin integrarea unor compuși activi sau structuri nanometrice în rețeaua polimerică. Această abordare permite modificarea proprietăților materialului, precum creșterea rezistenței mecanice, ajustarea comportamentului reologic sau introducerea unor funcții suplimentare, cum ar fi capacitatea de adsorbție, degradare sau eliberare controlată de substanțe active.

În contextul aplicațiilor CBRN, hidrogelurile prezintă un interes ridicat datorită capacității lor de a acționa simultan ca sisteme de barieră și decontaminare. Prin proprietățile lor de gonflare și aderență, acestea pot fi aplicate direct pe suprafețe contaminate, facilitând captarea și reținerea agenților chimici. În același timp, funcționalizarea cu materiale reactive, precum oxizi metalici sau structuri metalo-organice, permite inițierea proceselor de degradare a compușilor toxici, contribuind la reducerea rapidă a contaminării[39].

Pe lângă aplicațiile în decontaminare, hidrogelurile sunt investigate și ca sisteme pentru eliberarea controlată a substanțelor active, având capacitatea de a transporta și elibera compuși terapeutici într-un mod controlat în timp. Această proprietate este deosebit de importantă în scenarii de expunere la agenți chimici, unde administrarea eficientă a antidoturilor poate influența semnificativ evoluția clinică[40].

În ultimii ani, cercetările s-au concentrat pe dezvoltarea unor hidrogeluri compozite și nanostructurate, capabile să îmbine proprietățile structurale ale polimerilor cu funcționalitatea materialelor avansate. Această abordare permite obținerea unor sisteme multifuncționale, adaptabile diferitelor cerințe operaționale și biomedicale[41].

Hidrogelurile și biomaterialele funcționale reprezintă o platformă versatilă pentru dezvoltarea unor soluții inovatoare în domeniul decontaminării și al protecției chimice, precum și în aplicații biomedicale, oferind posibilitatea integrării unor funcții multiple într-un singur sistem.

2.4. Hidrogeluri modificate pentru decontaminarea suprafețelor expuse la agenți chimici de război

Deși hidrogelurile și biomaterialele polimerice prezintă proprietăți promițătoare în contextul aplicațiilor biomedicale și de mediu, valorificarea lor în domeniul decontaminării agenților chimici de război necesită adaptarea compoziției și a structurii acestora astfel încât să răspundă cerințelor specifice scenariilor de expunere. Integrarea unor componente active, precum particule anorganice sau structuri poroase cu rol în adsorbție și degradare, permite extinderea performanței acestor sisteme dincolo de simpla retenție a contaminantului, către procese eficiente de neutralizare chimică.

În contextul dezvoltării unor strategii moderne de decontaminare, hidrogelurile funcționalizate au atras un interes crescut datorită capacității lor de a combina proprietăți structurale favorabile cu funcționalități chimice active. Aceste sisteme reprezintă o clasă avansată de materiale, capabile să acționeze simultan prin mecanisme de adsorbție, retenție și degradare a agenților chimici de război[42].

Hidrogelurile funcționalizate sunt obținute prin integrarea unor componente active în rețeaua polimerică, precum nanoparticule, oxizi metalici sau structuri metalo-organice

(MOF). Această funcționalizare permite creșterea suprafeței active și introducerea unor centre reactive capabile să interacționeze direct cu agenții toxici. În funcție de natura componentelor introduse, aceste materiale pot favoriza procese de hidroliză, oxidare sau cataliză, contribuind la transformarea agenților chimici în produși mai puțin periculoși[41].

Un avantaj major al hidrogelurilor în aplicațiile de decontaminare îl reprezintă comportamentul lor de gonflare și capacitatea de a adera la suprafețe, inclusiv la nivelul pielii. Această proprietate permite formarea unui strat protector care limitează dispersia contaminantului și facilitează captarea acestuia în structura materialului. În același timp, caracterul detașabil al anumitor formulări permite îndepărtarea rapidă a contaminantului prin simpla îndepărtare mecanică a hidrogelului, reducând riscul de contaminare secundară.

Integrarea materialelor nanostructurate, precum oxizii metalici (ZnO, TiO_2) sau structurile MOF, conduce la dezvoltarea unor sisteme multifuncționale, în care procesele de adsorbție sunt completate de mecanisme catalitice de degradare. Aceste materiale prezintă o eficiență ridicată în interacțiunea cu agenți chimici de tip organofosforic sau vezicanți, datorită suprafețelor active extinse și a capacității de a genera specii reactive implicate în degradarea compușilor toxici[43, 44].

În plus, hidrogelurile funcționalizate pot fi proiectate astfel încât să răspundă unor stimuli externi, precum pH-ul, temperatura sau radiația UV, ceea ce permite controlul proceselor de decontaminare și adaptarea materialului la condițiile specifice de utilizare. Această flexibilitate deschide perspective importante pentru dezvoltarea unor sisteme inteligente, capabile să acționeze eficient în scenarii variate de expunere[45, 46].

Comparativ cu metodele convenționale de decontaminare, hidrogelurile funcționalizate oferă avantaje semnificative, precum reducerea consumului de soluții chimice, limitarea impactului asupra mediului și creșterea eficienței prin combinarea mai multor mecanisme într-un singur sistem. În acest context, aceste materiale reprezintă o direcție promițătoare pentru dezvoltarea unor soluții moderne și eficiente în domeniul protecției chimice.

În concluzie, hidrogelurile funcționalizate constituie o platformă versatilă și inovatoare pentru decontaminarea agenților chimici de război, oferind posibilitatea integrării unor funcționalități multiple și adaptării la cerințele specifice ale scenariilor CBRN.

2.5. Hidrogeluri biocompatibile și aplicații biomedicale

În contextul expunerii la agenți chimici de război, în special la agenți vezicanți, afectarea tegumentului reprezintă una dintre principalele consecințe, caracterizată prin apariția leziunilor cutanate, inflamație și procese de vindecare întârziate. În aceste condiții, abordarea decontaminării nu poate fi separată de necesitatea gestionării leziunilor tisulare rezultate, ceea ce impune dezvoltarea unor sisteme de materiale capabile să îmbine proprietățile de îndepărtare a contaminantului cu cele de suport pentru regenerarea țesuturilor. Hidrogelurile biocompatibile, utilizate frecvent în aplicații de vindecare a rănilor, prezintă avantaje relevante în acest sens, datorită capacității de a menține un mediu umed, de a proteja zona afectată și de a facilita procesele de reparare tisulară.

În plus, aceste sisteme pot fi adaptate pentru a permite eliberarea controlată a substanțelor active, contribuind nu doar la protecția și regenerarea țesuturilor, ci și la intervenția terapeutică localizată. În cadrul prezentei teze, această direcție este valorificată prin dezvoltarea unor hidrogeluri capabile să asigure eliberarea controlată a atropinei, evidențiind potențialul acestor materiale de a integra funcții multiple într-un singur sistem, de la decontaminare până la tratament. În continuare, sunt prezentate principalele caracteristici

ale hidrogelurilor biocompatibile și aplicațiile lor în domeniul biomedical, cu accent pe relevanța acestora în gestionarea leziunilor asociate expunerii la agenți chimici de război.

Hidrogelurile biocompatibile reprezintă o clasă avansată de biomateriale, caracterizate prin capacitatea de a interacționa favorabil cu sistemele biologice, fără a induce reacții adverse semnificative. Datorită structurii lor tridimensionale hidratate, aceste materiale prezintă proprietăți similare matricei extracelulare, ceea ce le conferă un potențial ridicat pentru aplicații biomedicale, inclusiv în ingineria tisulară, regenerare și sisteme de livrare controlată a substanțelor active[47].

Biocompatibilitatea hidrogelurilor este influențată de natura polimerilor utilizați, gradul de reticulare și prezența eventualelor componente funcționale. Polimerii de origine naturală, precum gelatină, alginatul sau guma arabică, sunt frecvent utilizați datorită biodegradabilității și compatibilității lor cu țesuturile biologice. În același timp, combinarea acestora cu polimeri sintetici sau cu materiale nanostructurate permite ajustarea proprietăților mecanice și funcționale ale sistemului final.

Un domeniu de interes major îl reprezintă utilizarea hidrogelurilor ca sisteme pentru eliberarea controlată a medicamentelor. Structura lor poroasă permite încorporarea substanțelor active și eliberarea acestora într-un mod controlat, influențat de factori precum difuzia, degradarea rețelei polimerice sau stimuli externi. Această caracteristică este esențială în scenarii de expunere la agenți chimici de război, unde administrarea eficientă și controlată a antidoturilor poate contribui semnificativ la reducerea efectelor toxice[48].

De asemenea, hidrogelurile biocompatibile sunt investigate pentru aplicații în vindecarea rănilor și protecția tegumentului, datorită capacității lor de a menține un mediu umed favorabil regenerării tisulare și de a acționa ca barieră împotriva contaminanților. În acest context, integrarea unor compuși bioactivi sau a unor agenți antimicrobieni poate îmbunătăți performanțele acestor materiale, contribuind la prevenirea infecțiilor și accelerarea procesului de vindecare.

În plus, dezvoltarea hidrogelurilor inteligente, capabile să răspundă la stimuli precum pH-ul, temperatura sau prezența unor compuși specifici, deschide noi perspective în domeniul biomedical. Aceste sisteme pot adapta eliberarea substanțelor active în funcție de condițiile locale, oferind un control sporit asupra proceselor terapeutice[49].

Hidrogelurile biocompatibile reprezintă o platformă versatilă pentru aplicații biomedicale, oferind posibilitatea dezvoltării unor sisteme eficiente pentru protecție, regenerare și tratament. Integrarea acestor materiale în strategii complexe de răspuns la expunerea la agenți chimici de război evidențiază potențialul lor în dezvoltarea unor soluții inovatoare și adaptate cerințelor actuale.

Concluzii

Analiza critică a datelor de literatură evidențiază complexitatea și caracterul multidisciplinar al domeniului agenților chimici de război, atât din perspectiva mecanismelor de acțiune biologică, cât și a strategiilor necesare pentru identificarea, decontaminarea și gestionarea expunerii. Diversitatea acestor compuși, reflectată în proprietăți fizico-chimice variate, niveluri diferite de persistență și mecanisme toxice distincte, impune dezvoltarea unor abordări integrate și adaptabile, capabile să răspundă unor scenarii de expunere din ce în ce mai complexe.

Din punct de vedere analitic, identificarea biomarkerilor specifici în matrici biologice precum plasmă și urină reprezintă un element central în confirmarea expunerii, mai ales în

condițiile în care compușii inițiali suferă transformări rapide în organism. Utilizarea tehnicilor avansate de analiză, în special LC-MS/MS și GC-MS/MS, permite obținerea unor rezultate cu un grad ridicat de sensibilitate și selectivitate, contribuind la o identificare fără ambiguitate a agenților toxici și a produșilor lor de degradare sau a aducților biologici. Complementaritatea acestor metode evidențiază necesitatea unei abordări analitice integrate, în care selecția tehnicii este dictată de natura biomarkerului și de contextul analizei.În paralel, strategiile de decontaminare au evoluat semnificativ, de la metode convenționale bazate pe procese fizice și chimice, către soluții moderne care valorifică proprietățile materialelor funcționale avansate. Deși metodele clasice rămân de bază pentru intervențiile rapide în teren, acestea prezintă limitări legate de impact asupra mediului, ceea ce a condus la orientarea cercetărilor către sisteme inovatoare, capabile să combine mecanisme multiple de acțiune.În acest context, hidrogelurile și biomaterialele funcționalizate se conturează ca platforme deosebit de promițătoare, datorită capacității lor de a integra proprietăți structurale și funcționale într-un singur sistem. Prin posibilitatea de funcționalizare cu nanoparticule, oxizi metalici sau structuri metalo-organice, aceste materiale pot asigura simultan adsorbția, retenția și degradarea agenților chimici, oferind o abordare eficientă și controlată a procesului de decontaminare. În același timp, caracterul biocompatibil al anumitor formulări deschide perspective importante pentru aplicații biomedicale, inclusiv în protecția tegumentului și în eliberarea controlată de substanțe active.Prin urmare, cadrul teoretic prezentat evidențiază necesitatea dezvoltării unor sisteme multifuncționale, capabile să răspundă simultan cerințelor de detecție, decontaminare și protecție. Integrarea metodelor analitice performante cu materiale avansate și strategii inovatoare de intervenție reprezintă o direcție esențială pentru consolidarea capacităților în domeniul securității chimice și pentru alinierea la standardele internaționale. Această abordare integrată constituie fundamentul cercetărilor experimentale prezentate în cadrul prezentei teze, orientate către dezvoltarea unor soluții eficiente și aplicabile în scenarii reale de expunere la agenți chimici de război.

PARTEA II – CONTRIBUȚII ORIGINALE

STUDIUL EXPERIMENTAL

CAPITOLUL 3.

STUDIUL EXPERIMENTAL PRIVIND DEZVOLTAREA STRATEGIILOR ANALITICE PENTRU IDENTIFICAREA BIOMARKERILOR DE EXPUNERE LA AGENȚI CHIMICI DE RĂZBOI

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost evaluate în contextul participării la programe internaționale de testare a competențelor interlaboratoarelor desfășurate sub egida OPCW, în perioada 2024–2026, unde compușii din probele necunoscute au fost identificați și raportați corect. În paralel, metodele analitice dezvoltate au fost aplicate și verificate în exerciții internaționale realizate în colaborare cu Institutul Finlandez pentru Verificarea Convenției Armelor Chimice (VERIFIN), Universitatea din Helsinki Finlanda, colaborare activă în perioada 2022-2026.

3.1. Necesitatea dezvoltării unor strategii analitice integrate pentru identificarea biomarkerilor de expunere la agenți chimici de război

Identificarea expunerii la agenți chimici de război în matrici biologice reprezintă o provocare majoră din punct de vedere analitic, determinată de complexitatea acestora, de concentrațiile reduse ale compușilor țintă și de transformările rapide pe care aceștia le suferă în organism. În majoritatea cazurilor, compușii inițiali nu mai sunt prezenți în forma lor intactă, fiind transformați în produși de hidroliză sau aducți cu biomoleculele, ceea ce impune orientarea analizei către identificarea unor biomarkeri specifici și stabili. În acest context, metodele analitice trebuie să asigure un nivel ridicat de sensibilitate și selectivitate, precum și capacitatea de a diferenția între compuși cu structuri similare sau prezenți în matrici complexe, precum plasmă și urină. De asemenea, cerințele impuse la nivel internațional privind confirmarea expunerii impun utilizarea unor strategii analitice riguroase, bazate pe identificări multiple și corelate. Prin urmare, dezvoltarea unor strategii analitice integrate, care să combine tehnici complementare și metode adecvate de preparare a probelor, devine extrem de importantă pentru obținerea unor rezultate fiabile și pentru asigurarea unei identificări fără ambiguitate a biomarkerilor specifici. Acest capitol abordează aceste aspecte prin dezvoltarea și optimizarea unor metode analitice adaptate diferitelor clase de compuși, în vederea evidențierii biomarkerilor în matrici biologice relevante.

3.2. Metode de prepararea probelor biologice (urină și plasmă)

a) Prepararea probelor de urină

Probele de urină utilizate în acest studiu au fost supuse unui proces controlat de marcare cu diferite clase de agenți chimici de război, incluzând agenți neurotoxici și agenți vezicanți, în vederea evaluării biomarkerilor formați în funcție de tipul compusului. În general, în matricea marcată sunt identificați preponderent produși de hidroliză, rezultați atât în urma reactivității agenților în mediul apos, cât și ca urmare a proceselor metabolice. Acești metaboliți reprezintă biomarkeri relevanți ai expunerii și sunt eliminați prin excreție. O

excepție o constituie compușii din seria A, care, datorită stabilității chimice ridicate, pot fi detectați și sub formă nemodificată.

Pentru o mai bună înțelegere a strategiilor analitice aplicate, a fost elaborată o schemă conceptuală (Figura 3.1), care ilustrează principalele căi de transformare ale agenților chimici în mediul biologic și tipurile de biomarkeri rezultați, corelate cu tehnicile analitice utilizate. În vederea controlului interferențelor, probele au fost analizate împreună cu probe blank, preparate în aceleași condiții, pentru verificarea semnalului de fond.

Prepararea probelor de urină a fost realizată prin aplicarea unor strategii multiple, adaptate clasei de compuși analizați și tipului de biomarker urmărit. Acestea au inclus:

✓ extracția pe fază solidă (SPE), utilizată pentru izolarea și concentrarea acizilor alchilfosfonici și a metaboliților specifici, în vederea analizei prin LC-MS/MS;

✓ derivatizarea chimică (cu PFB-Br sau HFBI), aplicată pentru creșterea volatilității și detectabilității compușilor în analiza GC-MS/MS;

✓ proceduri de schimb de solvent, pentru adaptarea probelor între cele două tehnici analitice (GC-MS/MS și LC-MS/MS);

✓ diluția directă a probei, utilizată ca metodă rapidă pentru screening prin LC-MS/MS;

✓ tratamentul chimic specific (ex. reducere cu $TiCl_3$), aplicat pentru evidențierea metaboliților β-liazei în cazul agenților vezicanți.

În mod general, procedurile de preparare au implicat etape de extracție, purificare, concentrare și, după caz, derivatizare, în funcție de natura analitului și de tehnica analitică utilizată. Alegerea metodei de preparare a fost realizată astfel încât să se asigure un compromis optim între recuperarea analitului, eliminarea interferențelor matriciale și compatibilitatea cu metoda instrumentală.

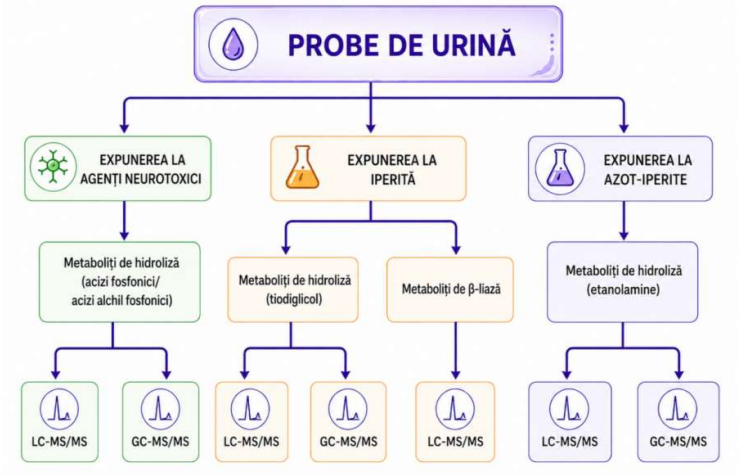


Figura 3.1. *Diagramă de flux a biomarkerilor de expunere la agenți neurotoxici, iperite și azot- iperite cât și a metodelor analitice pentru detectare (BioRender, accesat aprilie 2026)*

b) Prepararea probelor de plasmă

Manipularea probelor de plasmă a fost realizată cu respectarea strictă a normelor de siguranță biologică, acestea fiind considerate potențial infecțioase. Întrucât concentrațiile agenților chimici de război nereacționați sunt, în general, reduse în probele biologice, analiza se bazează predominant pe identificarea biomarkerilor formați în urma interacțiunii acestora cu componentele din plasmă. Pentru menținerea stabilității compușilor de interes, probele au

fost manipulate în condiții controlate și stocate la temperaturi scăzute (−20 °C sau mai reduse), pentru a preveni degradarea și dezvoltarea microorganismelor.

Strategiile analitice aplicate în cazul probelor de plasmă au fost fundamentate pe natura biomarkerilor specifici formați în urma expunerii la agenți neurotoxici și vezicanți. În cazul agenților neurotoxici, identificarea s-a bazat pe trei tipuri principale de biomarkeri: metaboliți de hidroliză, aducți proteici și compuși regenerați. Aducții proteici, rezultați din reacția directă a agenților cu enzime sau proteinele din plasmă, reprezintă biomarkeri primari ai expunerii, oferind un grad ridicat de certitudine. În anumite situații, agenții pot fi evidențiați și sub formă intactă sau regenerată, prin aplicarea unor tehnici specifice, precum refluorurarea, care permit eliberarea compusului inițial din structurile biologice.

Pentru agenții vezicanți, identificarea biomarkerilor a inclus metaboliți de hidroliză, produși rezultați din reacții de tip β-liază și aducți proteici, specifici fiecărei clase de compuși (iperite și azot-iperite). Corelarea acestor biomarkeri cu tehnicile analitice adecvate (LC-MS/MS și GC-MS/MS) a permis o abordare integrată a procesului de identificare.

În vederea obținerii biomarkerilor specifici, probele de plasmă au fost supuse unui proces controlat de marcare, urmat de incubare în condiții apropiate celor fiziologice, pentru a permite desfășurarea reacțiilor de legare și formarea compușilor derivați. Pentru controlul interferențelor, probele au fost analizate împreună cu probe blank, preparate în aceleași condiții.

Prepararea probelor de plasmă a implicat aplicarea unor strategii multiple, adaptate tipului de biomarker urmărit și tehnicii analitice utilizate, incluzând:

- ✓ digestii enzimatice (pepsină, pronază), utilizate pentru evidențierea aducților proteici sub formă de peptide sau aminoacizi modificați;
- ✓ reacții de reactivare (refluorurare), aplicate pentru regenerarea agenților neurotoxici din aducții proteici și identificarea acestora prin GC-MS/MS;
- ✓ extracție pe fază solidă (SPE), utilizată pentru izolarea și concentrarea metaboliților de hidroliză;
- ✓ derivatizare chimică (PFB-Br, HFBI), pentru creșterea volatilității și detectabilității compușilor în analiza GC-MS/MS;
- ✓ precipitarea proteinelor și extracția cu solvenți organici, pentru separarea compușilor de interes din matricea biologică;
- ✓ proceduri de hidroliză și tratamente chimice specifice, utilizate pentru eliberarea compușilor din aducții sau transformarea acestora în forme detectabile;
- ✓ diluarea directă a probei, utilizată ca metodă alternativă în situații de concentrații foarte scăzute, pentru analiza rapidă prin LC-MS/MS.

Figura 3.2. descrie diagrama de flux a biomarkerilor de expunere la agenți neurotoxici, iperite și azot- iperite și a metodelor analitice pentru detectare.

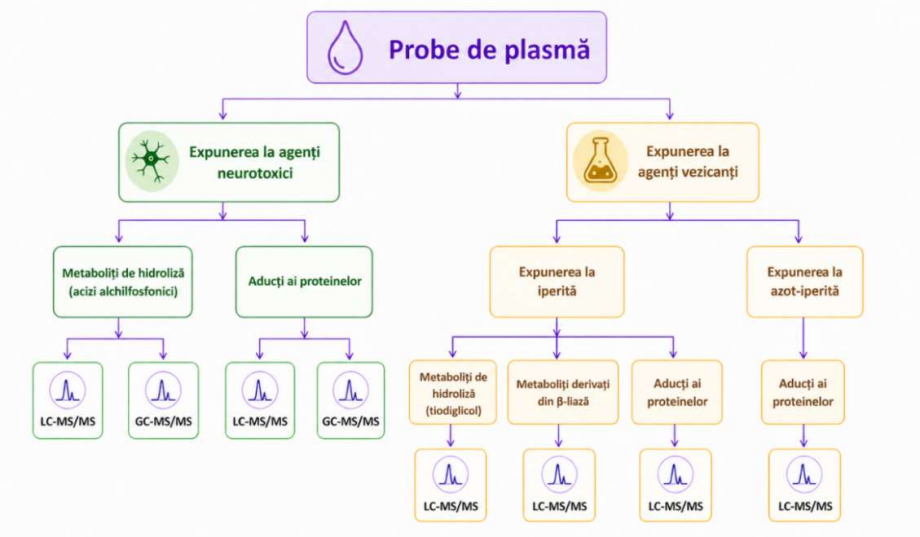


Figura 3.2. *Diagramă de flux a biomarkerilor de expunere la agenți neurotoxici, iperite și azot- iperite cât și a metodelor analitice pentru detectarea acestora* (*BioRender, accesat aprilie 2026)*

3.3. Dezvoltarea și optimizarea metodei analitice pentru identificare biomarkerilor specifici expunerii la agenți chimici de război

Analizele cromatografice au fost realizate utilizând tehnici de cromatografie de gaze (GC) și cromatografie de lichide de ultra-înaltă performanță (UHPLC), ambele cuplate cu spectrometrie de masă în tandem (MS/MS). Pentru determinările GC-MS/MS s-a utilizat un sistem TRACE 1310 cuplat cu spectrometru de masă TSQ 9000 (Thermo Scientific), operat în moduri de ionizare EI și CI, în timp ce analizele LC-MS/MS au fost efectuate cu un sistem ACQUITY I-Class Plus UPLC cuplat cu un spectrometru de masă Xevo TQ Absolute (Waters).

Analiza GC-MS/MS

Separarea cromatografică a fost realizată pe o coloană capilară TG-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), utilizând heliu ca gaz purtător. Programul de temperatură a fost optimizat pentru a asigura separarea eficientă a compușilor, cu o rampă de încălzire până la temperaturi ridicate (300°C).

Detecția s-a realizat în modurile de ionizare:

- EI (Electron Ionization) – caracterizat prin fragmentare extinsă, utilizat pentru obținerea de spectre structurale detaliate;
- CI (Chemical Ionization) – caracterizat prin fragmentare redusă și sensibilitate crescută, utilizat pentru evidențierea ionilor moleculari sau cvasi-moleculari.

Spectrometria de masă în tandem a fost realizată în modul SRM, utilizând argon drept gaz de coliziune.

Optimizarea metodei GC-MS/MS

Optimizarea metodei a fost realizată etapizat, urmărind obținerea unui compromis optim între sensibilitate și selectivitate:

- analiza inițială în mod full scan, pentru identificarea spectrelor de masă caracteristice și evaluarea separării cromatografice;

o selectarea ionilor precursori, preferabil ioni moleculari sau cu abundență ridicată;

o identificarea ionilor produs și optimizarea energiilor de coliziune (CE) pentru maximizarea răspunsului;

o definirea tranzițiilor SRM, selectând 2–4 tranziții/compus, în funcție de modul de ionizare;

o verificarea metodei pe probe de test în matrice relevantă, pentru evaluarea performanței analitice.

În general, modul CI a generat un număr mai redus de tranziții, datorită fragmentării mai limitate comparativ cu modul EI.

Criterii de identificare

Identificarea compușilor a fost realizată pe baza:

✓ timpului de retenție;

✓ tranzițiilor MRM selectate;

✓ raportului ionic dintre tranzițiile de confirmare și cea de cuantificare.

Pentru fiecare compus au fost utilizate cel puțin două tranziții, o tranziție principală (Q) pentru cuantificare și una sau mai multe tranziții secundare (q) pentru confirmare.Raportul q/Q a fost comparat între probe și standardele de referință, asigurând confirmarea identității compușilor în condiții de selectivitate ridicată.

În figura 3.3. este prezentată schema de funcționare a unui GC-MS/MS și modul de fragmentare al analiților.

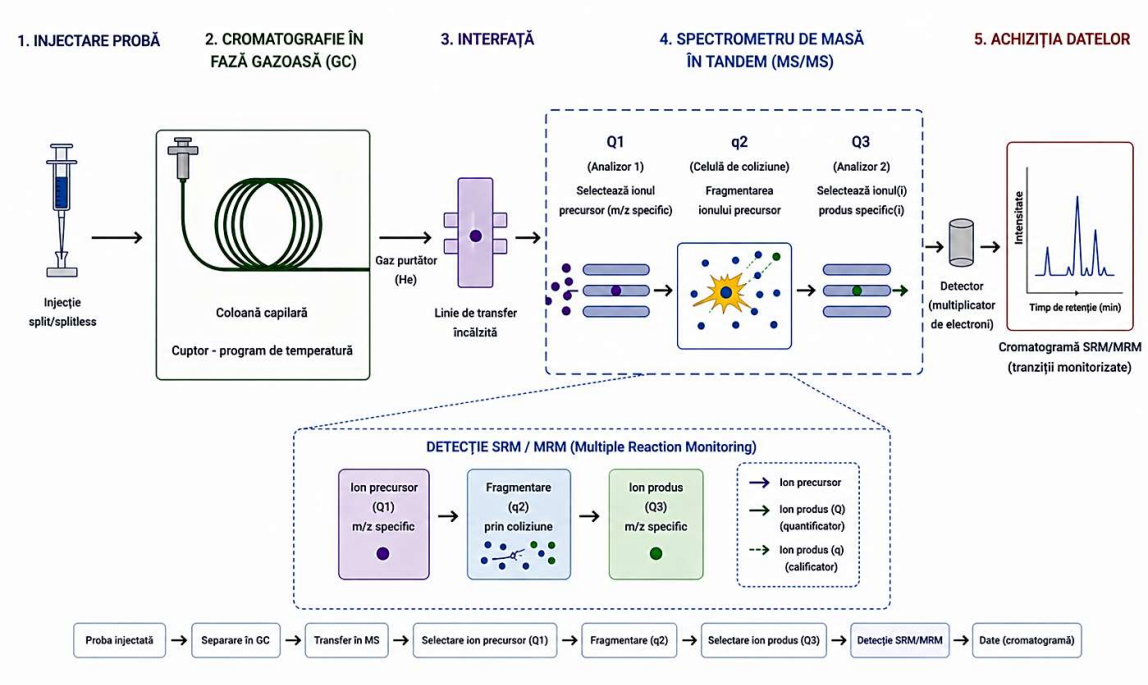


Figura 3.3. *Schema analizei GC-MS/MS (BioRender, accesat aprilie 2026)*

Analiza LC-MS/MS

Cromatografia de lichide cuplată cu spectrometria de masă în tandem (LC-MS/MS) a fost utilizată pentru analiza compușilor polari, nevolatili sau termolabili, dificil de determinat

prin GC-MS/MS fără derivatizare. Tehnica oferă sensibilitate și selectivitate ridicate, fiind adecvată pentru identificarea compușilor țintă în matrici biologice complexe.

Condiții cromatografice

Separarea a fost realizată pe o coloană C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm), utilizând faze mobile pe bază de apă și acetonitril, ambele acidulate cu 0,1% acid formic. A fost aplicat un gradient de eluție, utilizat ca metodă generală pentru majoritatea compușilor, asigurând o separare eficientă și reproductibilă.

Condițiile cromatografice au fost menținute, în general, constante (tip coloană, faze mobile, profil de gradient), ceea ce a permis analiza unui spectru larg de compuși fără modificări majore ale metodei. Pentru compușii cu retenție crescută, timpul de analiză a fost extins (până la 30 min), păstrând forma gradientului, dar ajustând durata etapelor. Temperatura coloanei a fost menținută la 45°C, iar autosampler-ul la 15°C.

Detecția MS/MS

Detecția a fost realizată prin ionizare electrospray (ESI), în mod pozitiv sau negativ, în funcție de natura chimică a compușilor:

- ESI(+): pentru compuși cu caracter bazic;
- ESI(–): pentru compuși acizi.

Analiza a fost efectuată în modul MRM (Multiple Reaction Monitoring), monitorizând tranzițiile dintre ionul precursor și ionii produs, ceea ce asigură o selectivitate ridicată și reduce interferențele matriciale.

Optimizarea metodei LC-MS/MS

Optimizarea metodei a fost realizată etapizat:

- determinarea ionului precursor și a modului optim de ionizare (ESI+/–) utilizând standarde de referință;
- identificarea ionilor produs prin experimente de fragmentare;
- ajustarea energiilor de coliziune (CE) pentru maximizarea intensității și reproductibilității tranzițiilor MRM;
- optimizarea condițiilor cromatografice pentru separarea eficientă a compușilor și reducerea interferențelor;
- compararea timpilor de retenție între probe și standarde analizate în aceleași condiții.

Criterii de identificare

Identificarea compușilor s-a realizat pe baza:

- ✓ timpului de retenție;
- ✓ tranzițiilor MRM specifice;
- ✓ raportului ionic între tranziția de cuantificare și cele de confirmare.

Pentru fiecare compus au fost utilizate cel puțin două tranziții, o tranziție principală (Q) pentru cuantificare, una sau mai multe tranziții secundare (q) pentru confirmare. Raportul q/Q a fost comparat cu cel al standardului de referință, iar încadrarea în limitele de toleranță acceptate a permis confirmarea sigură a identității compușilor.

În figura 3.4. este prezentată schema de funcționare a unui LC-MS/MS și modul de fragmentare al analiților.

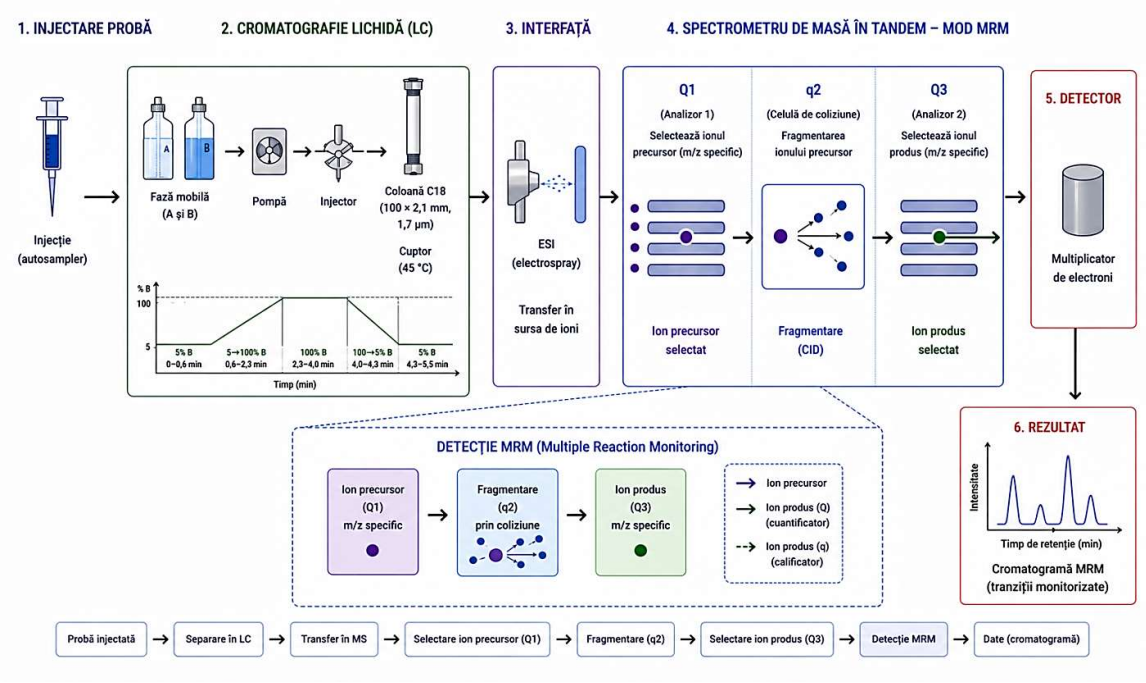


Figura 3.4. *Schema analizei LC-MS/MS (BioRender, accesat aprilie 2026)*

3.4. Rezultate și dicuții

3.4.1. Identificarea biomarkerilor specifici expunerii la agenți vezicanți și neurotoxici în probe de plasmă și urinăprin LC-MS/MS

În cadrul analizei LC-MS/MS au fost investigate mai multe categorii de biomarkeri specifici expunerii la agenți vezicanți și neurotoxici, incluzând produși de hidroliză, compuși intacți și aducți formați cu biomolecule. Strategia de identificare s-a bazat pe dezvoltarea metodelor MRM, prin selectarea ionilor precursori și a ionilor produs caracteristici, optimizarea energiilor de coliziune și compararea timpilor de retenție și a raporturilor ionice cu cele obținute pentru standardele de referință.

În cazul agenților vezicanți, analiza LC-MS/MS a vizat atât produșii de hidroliză, cât și aducții peptidici formați în urma interacțiunii compușilor cu proteinele din plasmă. Produșii de hidroliză, precum tiodiglicolul și analogii săi, au fost utilizați ca biomarkeri relevanți ai expunerii, în special datorită stabilității acestora în medii apoase. Pentru TDG, deși ionizarea teoretică ar fi trebuit să conducă la formarea ionului protonat $[M+H]^+$ cu m/z 123, în condițiile experimentale utilizate a fost evidențiat ionul m/z 105, atribuit unei structuri de tip episulfoniu, mai stabilă energetic. Acest ion a fost utilizat ca precursor pentru dezvoltarea metodei MRM, tranziția m/z 105 → 45 fiind selectată pentru cuantificare, iar tranzițiile m/z 105 → 61 și m/z 105 → 87 pentru confirmare.

Sesquiiperita hidrolizată a putut fi identificată utilizând aceeași abordare analitică, diferențierea față de iperită realizându-se în principal pe baza timpului de retenție, influențat de masa moleculară și polaritatea diferită. Analogul 1,3-bis(2-hidroxietiltio)propan a prezentat un comportament de ionizare mai stabil, fiind detectat prin ionul precursor m/z 197, iar tranziția m/z 197 → 123 a fost utilizată ca tranziție de cuantificare. Pentru trietanolamină, produs de hidroliză asociat azot-iperitelor, ionul precursor m/z 150 a fost monitorizat în ESI

pozitiv, tranziția m/z 150 → 70 fiind selectată ca tranziție principală, datorită intensității ridicate a semnalului.

Aducții peptidici ai agenților vezicanți au fost monitorizați sub formă de fragmente de tip CPF. Pentru iperită, aductul S-HETE-CPF a fost identificat prin ionul precursor m/z 470,17, iar tranziția m/z 470,17 → 105 a fost selectată pentru cuantificare, ionul produs m/z 105 fiind caracteristic fragmentului sulfurat derivat din iperită. Aducții corespunzători sesquiiperitei și analogului cu punte propil au prezentat mase moleculare mai mari, respectiv m/z 530,2 și m/z 544,2, necesitând energii de coliziune similare sau ușor mai ridicate. În cazul analogului cu punte propil, energia de coliziune mai mare indică o stabilitate crescută a structurii, probabil datorată lanțului alifatic extins. Pentru azot-iperită, aductul HN3-CPF a fost identificat prin ionul precursor m/z 497,2, tranziția m/z 497,2 → 364,1 fiind utilizată pentru cuantificare.

Pentru agenții neurotoxici, analiza LC-MS/MS a permis identificarea compușilor în forme multiple: compuși intacți, produși de hidroliză și aducți proteici. Compușii din seria A au fost analizați exclusiv prin LC-MS/MS, datorită volatilității scăzute și compatibilității reduse cu GC-MS/MS. A-230 și A-232 au fost detectați în formă intactă, prin ionii precursori m/z 195,1 și m/z 211,1, iar tranziția comună către m/z 74,1 a fost utilizată ca tranziție de cuantificare. Această observație susține stabilitatea chimică ridicată a compușilor din seria A în condițiile analizei LC-MS/MS.

Pentru A-234 a fost identificat aductul cu tirozină, monitorizat prin ionul precursor m/z 386,2. Identificarea aducților de tirozină a fost posibilă doar pentru Sarin și A-234, ceea ce sugerează o formare mai favorabilă sau o stabilitate mai bună a acestor biomarkeri în condițiile de preparare utilizate. Pentru A-230 și A-232 au fost identificați și aducți de tip nonapeptidă, observați sub formă de ioni dublu încărcați. Acest comportament este specific fragmentelor peptidice de masă mare, care conțin mai multe situsuri protonabile și pot stabiliza simultan două sarcini pozitive.

Produșii de hidroliză ai compușilor din seria A au fost, de asemenea, identificați prin LC-MS/MS. A-230-OH, A-232-OH și A-234-OH au prezentat tranziții caracteristice către ionul produs m/z 74, confirmând caracterul comun al fragmentării compușilor organofosforici din această clasă. În plus, derivații PFB ai acestor produși, deși preparați inițial pentru analiza prin GC-MS/MS, au putut fi detectați și prin LC-MS/MS, demonstrând caracterul complementar și versatil al acestei tehnici.

În cazul VX, Soman și Sarin, identificarea s-a bazat pe combinația dintre aducții nonapeptidici și produșii de hidroliză. Pentru VX-NP și GD-NP, formele dublu încărcate au fost preferate datorită răspunsului analitic mai bun și fragmentării eficiente. Pentru GB-NP, forma monoîncărcată a fost suficient de stabilă și a permis obținerea unor tranziții caracteristice. Produșii de hidroliză EMPA, PinMPA și IpMPA au fost analizați în modul ESI negativ, ca ioni de tip $[M-H]^-$, iar tranziția către m/z 95 a fost utilizată în toate cazurile ca tranziție de cuantificare, fiind caracteristică acizilor metilfosfonici.

În Tabelul 3.1 sunt prezentați principalii biomarkeri identificați, energiile de coliziune și tranzițiile principale pentru identificarea acestora prin LC-MS/MS.

Tabelul 3.1. *Principalii biomarkeri și caracteristicile acestora prin analiza LC-MS/MS*

Clasa	Compus / biomarker	Ion precursor (m/z)	Tranziție Q	Tranziții q	CE pentru Q	Obs.
Vezicanți	TDG	105	105 → 45	105 → 61; 105 → 87	13 eV	Ion episulfoniu, nu $[M+H]^+$
Vezicanți	1,3-Bis(2-hidroxietiltio) propan	197	197 → 123	197 → 136; 197 → 75	15 eV	Ion molecular protonat stabil
Vezicanți	TEA	150	150 → 70	150 → 114; 150 → 88	20 eV	Produs de hidroliză azot-iperită
Vezicanți	S-HETE-CPF	470,17	470,17 → 105	470,17 → 263,1; 470,17 → 137	35 eV	Aduct CPF al iperitei
Vezicanți	Et-[S-HETE]-CPF	530,2	530,2 → 105	530,2 → 263,1; 530,2 → 137	35 eV	Aduct CPF al sesquiiperitei
Vezicanți	Pro-[S-HETE]-CPF	544,2	544,2 → 151	544,2 → 263,1; 544,2 → 119	40 eV	Structură mai stabilă
Vezicanți	HN3-CPF	497,2	497,2 → 364,1	497,2 → 301; 497,2 → 152,1	40 eV	Aduct CPF azot-iperită
Seria A	A-230	195,1	195,1 → 74,1	195,1 → 81; 195,1 → 122	14 eV	Compus intact
Seria A	A-232	211,1	211,1 → 74,1	211,1 → 97; 211,1 → 138	14 eV	Compus intact
Seria A	A234-Tyr	386,2	386,2 → 244,3	386,2 → 285,3	20 eV	Aduct cu tirozină
Seria A	A-232-NP	493,7	493,7 → 209,1	493,7 → 673,3; 493,7 → 778,3	23 eV	Ion dublu încărcat
Seria A	A-230-NP	485,7	485,7 → 193,1	485,7 → 673,3; 485,7 → 778,3	16 eV	Ion dublu încărcat
Seria A	A-230-OH	193,0	193,0 → 74,0	193,0 → 115; 193,0 → 120	15 eV	Produs de hidroliză
Seria A	A230-OH-PFB	373,1	373,1 → 74,1	373,1 → 300	23 eV	Derivat PFB detectat și prin LC
Seria A	A-232-OH	209,1	209,1 → 74,2	209,1 → 136	14 eV	Interferență verificată prin blank
Seria A	A-232-OH-PFB	389,1	389,1 → 74,1	389,1 → 316	23 eV	Semnale secundare nespecifice excluse
Seria A	A-234-OH	223	223 → 74	223 → 150	14 eV	Produs de hidroliză
Seria A	A-234-PFB	403,1	403,1 → 74,1	403,1 → 330	14 eV	Derivat PFB detectat prin LC
Seria V	VX-NP	451,7	451,7 → 602	451,7 → 673; 451,7 → 778	25 eV	Ion dublu încărcat
Seria V	EMPA	123	123 → 95	123 → 79; 123 → 77	8 eV	ESI negativ
Seria G	GD-NP	497,7	497,7 → 673,3	497,7 → 778,3	15 eV	Ion dublu încărcat
Seria G	PinMPA	179	179 → 95	179 → 79; 179 → 77	15 eV	ESI negativ
Seria G	GB-NP	916	916 → 778	916 → 673; 916 → 602	30 eV	Ion monoîncărcat

Seria G	GB-Tyr	302	302 → 214	302 → 260; 302 → 197	25 eV	Aduct cu tirozină
Seria G	IpMPA	137	137 → 95	137 → 79; 137 → 77	17 eV	ESI negativ

Ansamblul metodelor LC-MS/MS dezvoltate a permis identificarea selectivă a biomarkerilor specifici expunerii la agenți vezicanți și neurotoxici în probe biologice. Rezultatele au evidențiat că produșii de hidroliză reprezintă biomarkeri stabili și ușor de monitorizat, în timp ce aducții proteici oferă un nivel ridicat de specificitate, dar necesită strategii de preparare mai elaborate. Pentru compușii din seria A, analiza LC-MS/MS s-a dovedit esențială, datorită stabilității ridicate și volatilității reduse a acestora. Utilizarea modului MRM, împreună cu selecția tranzițiilor de cuantificare și confirmare, a permis diferențierea compușilor și reducerea riscului de identificare fără amibuitate, inclusiv în prezența interferențelor din matrice. Astfel, LC-MS/MS s-a demonstrat a fi o tehnică versatilă și robustă pentru caracterizarea biomarkerilor formați în urma expunerii la agenți chimici de război.

3.4.2. Identificarea biomarkerilor specifici expunerii la agenți vezicanți și neurotoxici în probe de plasmă și urină prin GC-MS/MS

În completarea analizelor LC-MS/MS, tehnica GC-MS/MS a fost utilizată pentru confirmarea biomarkerilor specifici agenților vezicanți și neurotoxici în probe biologice. Această abordare a permis identificarea compușilor în formă intactă, atunci când stabilitatea și volatilitatea au permis acest lucru, precum și a produșilor de hidroliză transformați în derivați mai volatili prin reacții de derivatizare cu PFB-Br sau HFBI.

Spre deosebire de LC-MS/MS, unde ionizarea ESI favorizează formarea ionilor moleculari sau pseudomoleculari, GC-MS/MS implică frecvent procese de fragmentare mai energice, în special în modul EI. În aceste condiții, ionii selectați ca precursori pot reprezenta fragmente primare generate încă din sursa de ionizare, iar tranzițiile SRM reflectă fragmentări secundare ale acestor fragmente. Prin urmare, interpretarea datelor GC-MS/MS s-a bazat pe selectarea fragmentelor stabile, intense și reproductibile, corelate cu timpul de retenție și cu raporturile ionice specifice.

În cazul agenților vezicanți, analiza GC-MS/MS a permis identificarea iperitei, sesquiiperitei și analogului 1,3-bis(2-cloroetiltio)propan în formă clorurată, precum și a produșilor de hidroliză derivați cu HFBI. Iperita a fost identificată în modul EI-SRM prin tranzițiile m/z 109 → 73 și m/z 141 → 86, semnalul cromatografic fiind observat la aproximativ 10,59 min. Tranziția m/z 109 → 73 a fost utilizată ca tranziție principală, datorită intensității ridicate și stabilității semnalului, iar tranziția m/z 141 → 86 a oferit confirmarea identificării compusului.

Produsul principal de hidroliză al iperitei, tiodiglicolul, a fost analizat după derivatizare cu HFBI, etapă necesară pentru creșterea volatilității și stabilității termice. Derivatul TDG-HFBI a fost identificat prin tranzițiile m/z 301 → 240 și m/z 241 → 169, la un timp de retenție de aproximativ 12,16 min. Această analiză a completat identificarea prin LC-MS/MS, oferind o confirmare suplimentară a expunerii la iperită.

Sesquiiperita a fost identificată în modul EI-SRM prin ionul precursor m/z 182, cu tranzițiile m/z 182 → 123 și m/z 182 → 63, ambele optimizate la 15 eV. Tranziția m/z 182 → 123 a fost selectată ca tranziție de cuantificare, iar m/z 182 → 63 ca tranziție de confirmare. Produsul de hidroliză al sesquiiperitei a fost identificat după derivatizare cu HFBI, în modul

CI, prin tranzițiile m/z 301 → 241 și m/z 301 → 169, ambele la 8 eV. Utilizarea CI a permis o fragmentare mai blândă și mai controlată, adecvată pentru derivații polari.

Analogul 1,3-bis(2-cloroetiltio)propan a fost identificat în modul EI-SRM la un timp de retenție de aproximativ 18,71–18,72 min, prin tranzițiile m/z 169 → 73 și m/z 171 → 107. Tranziția m/z 169 → 73 a fost utilizată pentru cuantificare, iar m/z 171 → 107 pentru confirmare. Diferența dintre energiile de coliziune reflectă stabilitatea diferită a fragmentelor monitorizate, fragmentul m/z 73 necesitând un proces de fragmentare mai profund.

Pentru agenții neurotoxici, GC-MS/MS a fost utilizată atât pentru identificarea formelor regenerate prin refluorurare, cât și pentru confirmarea produșilor de hidroliză derivați. În cazul VX, procesul de refluorurare nu regenerează compusul intact, deoarece restul S-2-diizopropilaminoetil, implicat în legarea de biomolecule, rămâne asociat structurilor biologice. Prin refluorurare se reconstituie doar fragmentul fosfonic, rezultând un derivat de tip etil metilfosfonofluoridat, diferit de structura inițială a VX. Acesta a fost identificat în modul EI-SRM prin tranzițiile m/z 99 → 81 și m/z 111 → 81, la un timp de retenție de aproximativ 4,41–4,42 min.

Produsul de hidroliză al VX, EMPA, a fost analizat după derivatizare cu PFB-Br, în modul CI. Derivatizarea a fost necesară din cauza polarității ridicate și a caracterului acid al EMPA. Derivatul EMPA-PFB a fost identificat prin tranzițiile m/z 123,1 → 95 și m/z 123,1 → 79, la aproximativ 14,34 min. Identificarea atât a formei regenerate, cât și a produsului de hidroliză derivatizat a oferit confirmare complementară pentru expunerea la VX.

Somanul a fost identificat în modul EI-SRM prin tranzițiile m/z 126 → 82 și m/z 99 → 81. Prezența a două semnale cromatografice apropiate, în intervalul 8,45–8,52 min, a fost atribuită existenței izomerilor specifici Somanului, separați parțial în condițiile de cromatografie de gaze. Prezența ambelor vârfuri pe aceleași tranziții confirmă faptul că acestea aparțin aceluiași compus în forme izomerice diferite.

Sarinul a fost identificat în formă intactă prin tranzițiile m/z 125 → 99 și m/z 99 → 47, în modul EI-SRM, la aproximativ 5,11–5,14 min. Tranziția m/z 125 → 99 a fost utilizată pentru cuantificare, iar m/z 99 → 47 pentru confirmare. Produsul său de hidroliză, IpMPA, a fost analizat după derivatizare cu PFB-Br în modul CI, prin tranzițiile m/z 137 → 95 și m/z 137 → 79. Identificarea simultană a Sarinului și a IpMPA-PFB susține confirmarea expunerii, iar corelarea cu rezultatele LC-MS/MS crește gradul de certitudine analitică.

În Tabelul 3.2 sunt prezentați principalii biomarkeri identificați, energiile de coliziune și tranzițiile principale pentru identificarea acestora prin GC-MS/MS.

Tabelul 3.2. *Principalii biomarkeri și caracteristicile acestora prin analiza GC-MS/MS*

Clasa	Compus / biomarker	Mod ionizare	RT aprox.	Tranziție Q	CE Q	Tranziție q	CE q	Obs
Vezicanți	Iperită intactă	EI	10,59 min	109 → 73	5 eV	141 → 86	15 eV	Formă clorurată; fragmente EI stabile
Vezicanți	TDG-HFBI	EI	12,16 min	301 → 240	6 eV	241 → 169	20 eV	Produs de hidroliză derivatizat
Vezicanți	Sesquiiperită intactă	EI	17,51 min	182 → 123	15 eV	182 → 63	15 eV	Formă clorurată
Vezicanți	SQ-OH-HFBI	CI	7,72 min	301 → 241	8 eV	301 → 169	8 eV	Produs de hidroliză derivatizat

Vezicanți	1,3-Bis(2-cloroetiltio)propan	EI	18,71–18,72 min	169 → 73	12 eV	171 → 107	6 eV	Analog clorurat
Seria V	VX refluorurat / derivat fosfonofluoridat	EI	4,41–4,42 min	99 → 81	16 eV	111 → 81	10 eV	Reconstituire fragment fosfonic, nu VX intact
Seria G	EMPA-PFB	CI	14,34 min	123,1 → 95	18 eV	123,1 → 79	36 eV	Produs de hidroliză VX derivatizat
Seria G	Soman	EI	8,45–8,52 min	126 → 82	12 eV	99 → 81	20 eV	Două vârfuri atribuite izomerilor
Seria G	Sarin	EI	5,11–5,14 min	125 → 99	10 eV	99 → 47	28 eV	Formă intactă
Seria G	IPMPA-PFB	CI	14,62 min	137 → 95	20 eV	137 → 79	38 eV	Produs de hidroliză Sarin derivatizat

3.5. Concluzii

Studiul a dezvoltat o abordare integrată LC-MS/MS–GC-MS/MS pentru identificarea biomarkerilor agenților neurotoxici și vezicanți în plasmă și urină, evidențiind atât compușii intacți, cât și produșii de hidroliză și aducții biologici. Metodele au fost adaptate particularităților chimice ale fiecărei clase, inclusiv pentru compușii din seria A, demonstrând stabilitatea și detectabilitatea acestora. Rezultatele au fost validate prin teste interlaboratoare OPCW, confirmând robustețea și aplicabilitatea metodelor pentru analiza probelor biologice complexe.

CAPITOLUL 4

STUDIUL EXPERIMENTAL PRIVIND EVALUAREA EFICIENȚEI DE DECONTAMINARE A AGENȚILOR CHIMICI DE RĂZBOI – SOMAN ȘI IPERITĂ - UTILIZÂND SUSPENSII ORGANICE REACTIVE CARE CONȚIN NANOADSORBANȚI DIN OXID DE ZINC (ZnO), DIOXID DE TITAN (TiO_2) ȘI ZEOLIT

Rezultatele acestui studiu au fost publicate integral pe parcursul studiilor doctorale și pot fi consultate în articolul:

Raluca Elena Ginghina, Adriana Elena Bratu, Gabriela Toader, Andreea Elena Moldovan, Tudor Viorel Tiganescu, Ramona Elena Oncioiu, Panaghia Deliu, Razvan Petre, Gabriel Epure, Munizer Purica, ***Reactive Organic Suspensions Comprising ZnO, TiO_2, and Zeolite Nanosized Adsorbents: Evaluation of Decontamination Efficiency on Soman and Sulfur Mustard***, publicat în revista Toxics (MDPI), 2021, Volume 9, Issue 12, 334, ISSN 2305-6304, https://doi.org/10.3390/toxics9120334; WOS: 000738377700001, IF2021 = 4.472, Q2 (Toxicology; Environmental Sciences).

4.1. Necesitatea dezvoltării unor strategii moderne de decontaminare pentru agenți chimici de război

Necesitatea dezvoltării unor strategii bazate pe suspensii organice reactive care conțin adsorbanți nanometrici (ZnO, TiO_2, zeoliți) derivă din limitările metodelor convenționale de decontaminare, care sunt adesea nespecifice, lente sau dificil de aplicat pe suprafețe sensibile și în condiții reale. Agenții chimici de război, precum Soman și iperita, prezintă o toxicitate ridicată și pot forma interacțiuni stabile cu suprafețele sau biomaterialele, necesitând soluții care să combine eficient procesele de adsorbție și degradare chimică. Materialele nanostructurate oferă avantaje semnificative datorită suprafeței specifice mari și reactivității crescute, permițând atât captarea rapidă a agenților toxici, cât și transformarea lor în compuși mai puțin periculoși. Astfel, dezvoltarea unor astfel de sisteme multifuncționale reprezintă o direcție extrem de importantă pentru obținerea unor metode de decontaminare rapide, eficiente și aplicabile în scenarii reale.

4.2. Metode de sinteză a soluțiilor de decontaminare, caracterizarea fizico-chimică a componentei organice și verificarea compatibilității componentei organice cu nanoparticulele. Testarea eficienței de decontaminare la agenți chimici de război reali

Soluțiile de decontaminare organice (SD) au fost obținute prin amestecarea controlată a componentelor într-un sistem de reacție echipat corespunzător, la 30 °C. Formularea a inclus etilenglicol monoetil eter, monoetanolamină, NaOH și surfactant (laurilsulfat de sodiu în alcool izopropilic), adăugate secvențial. În etapa finală, adsorbanții nanometrici (ZnO, TiO_2 și zeolit) au fost dispersați prin sonicare, obținându-se suspensii cu concentrații variabile de nanoparticule (0,1–2% m/m).

Componenta organică a fost caracterizată din punct de vedere fizico-chimic (densitate și alcalinitate), iar compatibilitatea cu suprafețele a fost evaluată prin teste de coroziune și stabilitate, conform standardelor relevante. De asemenea, stabilitatea soluției a fost testată în condiții extreme de temperatură, demonstrând menținerea proprietăților de decontaminare.

Performanța SD a fost verificată preliminar pe agenți chimici de război, confirmând eficiența chiar și după expunere la condiții de mediu severe.

Eficiența decontaminării a formulărilor a fost evaluată pe agenți reali (HD și GD), prin contaminare controlată urmată de decontaminare sub agitare la temperatura camerei. Probele au fost analizate la intervale de timp variabile, utilizând extracție cu diclormetan și GC-MS, iar produșii de degradare au fost identificați după derivatizare. Performanța a fost exprimată prin factorul de decontaminare (DF), calculat pe baza diferenței dintre concentrația inițială și cea reziduală. Toate determinările au fost efectuate în triplicat, iar rezultatele raportate ca valori medii.

4.3. Caracterizare

Spectrele FT-IR ale soluțiilor de decontaminare au fost obținute la o rezoluție de 4 cm^{-1}, de la 550 la 4000 cm^{-1}, cu ajutorul unui instrument Perkin Elmer Spectrum Two, modul ATR. Analizele spectrometriei de masă prin cromatografie gazoasă au fost efectuate pe un MS triplu quadrupol GC Thermo Scientific Trace 1310–TSQ 9000. Condițiile metodei de analiză pentru GC-MS pentru cuantificarea eficienței de decontaminare ți identificare produșilor de degradare sunt descrise în tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. *Condiții de analiză GC-MS pentru cuantificarea eficienței de decontaminare și identificarea produșilor de degradare*

Parametru	**Condiții**
Gaz purtător	Heliu
Debit gaz purtător	1,5 mL/min (flux constant)
Temperatura injector	270 °C
Mod injecție	Splitless
Coloană cromatografică	TR5MS Gold
Fază staționară	5% fenil – 95% dimetilpolisiloxan
Dimensiuni coloană	30 m × 0,25 mm × 0,25 µm
Program de temperatură	40 °C → 300 °C, rampă 10 °C/min
Timp întârziere solvent	2,5 min (standard) / 8,5 min (derivatizare)
Mod ionizare MS	Impact electronic (EI)
Energie electroni	40 eV
Interval scanare	40–650 m/z

Analizele calitative și identificarea compușilor toxici și a produșilor lor de degradare au fost efectuate prin compararea spectrelor de masă ale substanțelor chimice cu bibliotecile de spectre NIST (National Institute of Standards and Technology) și OCAD (OPCW Central Analytical Database). Analizele cantitative au fost efectuate prin metoda standardului intern.

4.4. Rezultate și discuții

Primul obiectiv al studiului a fost dezvoltarea unei soluții de decontaminare organice (SD), utilizată ulterior ca mediu de dispersie pentru nanoadsorbanți. Soluția obținută a prezentat o densitate de 0,91 ± 0,02 g/cm^3 și o alcalinitate de 2,47 ± 0,5 cm^3 HCl 1 N/g, fără a produce degradarea suprafețelor metalice testate. De asemenea, aceasta și-a menținut eficiența de decontaminare chiar și după expunerea la condiții extreme de temperatură și umiditate, demonstrând stabilitate și compatibilitate operațională.În etapa următoare, au fost integrați

nanoadsorbanți de tip ZnO, TiO_2 și zeolit pentru evaluarea impactului asupra eficienței decontaminării. Analiza morfologică a evidențiat dimensiuni nanometrice pentru ZnO și TiO_2 (aprox. 60–100 nm) și o structură poroasă specifică zeolitului, cu dimensiuni mai mari (100–500 nm), ceea ce poate influența comportamentul de adsorbție.Caracterizarea chimică a soluțiilor a confirmat prezența grupărilor funcționale specifice componentelor organice, evidențiind un sistem complex în care interacțiunile dintre componente și agenții chimici influențează direct procesul de decontaminare. În ansamblu, rezultatele indică faptul că atât compoziția chimică, cât și natura nanoadsorbanților joacă un rol deosebit de important în eficiența procesului și în formarea produșilor de degradare.

Interacțiunea suspensiilor organice reactive cu agenții chimici de război HD și GD a fost evaluată prin monitorizarea scăderii concentrației agentului toxic și prin identificarea produșilor de degradare formați în timp. Agenții au fost identificați prin GC-MS pe baza ionilor caracteristici și prin compararea spectrelor obținute cu bibliotecile NIST și OCAD.

În cazul iperitei (HD), soluția organică fără nanoadsorbanți a prezentat o reacție rapidă de decontaminare, atingând o eficiență de aproximativ 76% după 2 minute și 99,99% după 24 de ore. Adăugarea nanoadsorbanților a îmbunătățit semnificativ eficiența procesului în primele minute, aspect important din punct de vedere operațional. Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru suspensiile cu TiO_2 0,1% și zeolit 0,1%, care au determinat o eficiență de aproximativ 95% după numai 2 minute și aproape 100% după 5 ore. Pentru ZnO, eficiența optimă a fost observată la concentrația de 1%, în timp ce concentrația de 2% a condus la performanțe mai reduse, cel mai probabil din cauza aglomerării nanoparticulelor și reducerii suprafeței active disponibile.

În cazul Somanului (GD), decontaminarea a fost mult mai rapidă decât în cazul HD. Soluția organică pură a atins o eficiență de 99,83% după 2 minute și peste 99,9% după 1 oră. Suspensiile cu nanoadsorbanți au accelerat și mai mult procesul, în special formulările cu TiO_2 0,1% și zeolit 0,1%, pentru care reacția a fost practic completă după aproximativ 10 minute. În cazul ZnO, eficiența a crescut odată cu concentrația până la 1%, însă la 2% s-a observat o scădere a performanței, atribuită aglomerării particulelor.

Tabel 4.2. *Sinteza eficienței de decontaminare pentru HD și GD*

Agent toxic	Formulare	Eficiență inițială	Eficiență finală relevantă	Observații
HD	SD pură	76,42% după 2 min	99,99% după 24 h	Reacție rapidă inițial, dar finalizare lentă
HD	SD + 1% ZnO	66,96% după 2 min	97,42% după 5 h	Eficiență optimă pentru ZnO la 1%; 2% reduce eficiența prin aglomerare
HD	SD + 0,1% TiO_2	94,95% după 2 min	99,90% după 5 h	Creștere majoră a eficienței inițiale față de SD
HD	SD + 0,1% zeolit	95,64% după 2 min	99,92% după 5 h	Cea mai bună eficiență pentru HD
GD	SD pură	99,83% după 2 min	99,91% după 1 h	Decontaminare foarte rapidă
GD	SD + 1% ZnO	99,91% după 2 min	99,97% după 10 min	Eficiență optimă pentru ZnO la 1%
GD	SD + 0,1% TiO_2	99,95% după 2 min	reacție completă după 10 min	Reducere importantă a timpului de decontaminare

GD	SD + 0,1% zeolit	99,96% după 2 min	reacție completă după 10 min	Cea mai bună performanță pentru GD

Comparativ cu soluția organică pură, suspensiile cu 0,1% TiO_2 și 0,1% zeolit au redus semnificativ timpul necesar pentru decontaminarea GD, de la aproximativ 1 oră la 10 minute. În cazul HD, aceste suspensii au atins în 2–10 minute eficiențe comparabile cu cele obținute de soluția pură după 5 ore. Acest rezultat confirmă ipoteza conform căreia adaosul unor cantități reduse de nanoadsorbanți poate îmbunătăți eficiența decontaminării, prin creșterea suprafeței active și prin facilitarea interacțiunii dintre agentul toxic și mediul de decontaminare.

În etapa finală, au fost identificați produșii principali de degradare formați în timpul procesului de decontaminare. Pentru HD au fost identificați patru produși majori, iar pentru GD cinci produși principali. În cazul HD, produsul predominant a fost sulfura de 2-cloroetil vinil, formată încă din primele minute și transformată ulterior în compuși secundari, precum 1,2-bis(viniltio)etan. Prezența 2-tiomorfolinoetanolului indică reacția HD cu monoetanolamina din compoziția soluției organice. În cazul GD, produsul dominant a fost esterul di(2-etoxietil) al acidului metilfosfonic, rezultat din reacția agentului cu 2-etoxietanolul, component majoritar al formulării. Acidul pinacolil metilfosfonic a fost al doilea produs important, prezentând o creștere până la aproximativ 3 ore, urmată de scădere, ceea ce sugerează transformarea sa ulterioară în alți produși de degradare.

Tabel 4.3. *Produși principali de degradare identificați pentru HD și GD*

Agent	Produs de degradare	Observație privind formarea
HD	Sulfură de 2-cloroetil vinil	Produs major; se formează la începutul procesului și crește până la aproximativ 3 h, apoi scade
HD	1,4-ditian	Prezent în concentrații mici; crește în suspensiile cu nanoadsorbanți
HD	1,2-bis(viniltio)etan	Crește în timp, mai ales după 5 h, posibil prin transformarea altor intermediari
HD	2-tiomorfolinoetanol	Rezultat din reacția HD cu monoetanolamina; atinge un maxim la începutul procesului, apoi scade
GD	Acid metilfosfonic	Apare rapid, mai ales în primele minute; ulterior scade
GD	Izopropil pinacolil metilfosfonat	Format prin reacția GD cu alcoolul izopropilic; crește ușor în timp
GD	Acid pinacolil metilfosfonic	Al doilea produs ca abundență; crește până la aproximativ 3 h, apoi scade
GD	Dipinacolil metilfosfonat	Se formează de la început și crește ușor în timp
GD	Ester di(2-etoxietil) al acidului metilfosfonic	Produs major; rezultat din reacția GD cu 2-etoxietanolul, format rapid și în cantitate mare

Produșii de degradare identificați au toxicitate estimată mai redusă decât agenții inițiali, încadrându-se în general în clase de toxicitate acută mai scăzută. Pentru unii compuși nu sunt disponibile date toxicologice complete, însă rezultatele indică transformarea agenților foarte toxici în compuși cu periculozitate semnificativ redusă. Astfel, procesul de decontaminare nu trebuie privit doar ca eliminare cantitativă a agentului inițial, ci și ca transformare chimică a acestuia în produși mai puțin periculoși.

În ansamblu, rezultatele confirmă faptul că soluția organică dezvoltată are capacitate de decontaminare ridicată pentru HD și GD, iar integrarea unor cantități reduse de

nanoadsorbanți, în special TiO_2 și zeolit la 0,1%, îmbunătățește semnificativ viteza procesului. Aceste formulări prezintă astfel potențial aplicativ pentru scenarii operaționale, unde reducerea rapidă a contaminării este esențială.

4. 5. Concluzii

În cadrul acestui capitol a fost sintetizată și caracterizată o soluție organică de decontaminare, utilizată ulterior ca mediu de dispersie pentru trei tipuri de nanoadsorbanți: ZnO, TiO_2 și zeolit. Soluția de bază a fost evaluată din punct de vedere fizico-chimic, prin determinarea densității, pH-ului și alcalinității totale, iar testele preliminare au demonstrat menținerea performanței de decontaminare după expunerea la cicluri extreme de temperatură și umiditate, conform cerințelor standardelor NATO aplicabile domeniului CBRN.

Formulările obținute au fost caracterizate prin SEM și FT-IR, evidențiind morfologia nanoadsorbanților și compatibilitatea acestora cu matricea organică. Ulterior, eficiența suspensiilor reactive a fost evaluată pe agenți chimici de război reali, respectiv soman (GD) și iperită (HD), prin monitorizarea concentrației inițiale și reziduale a agentului toxic la diferite intervale de timp, utilizând GC-MS.

Rezultatele au demonstrat că soluția organică de bază prezintă o eficiență ridicată de decontaminare, iar integrarea nanoadsorbanților contribuie la accelerarea procesului, în special în cazul GD. Pentru HD, cele mai bune rezultate au fost obținute pentru suspensiile cu TiO_2 și zeolit, care au determinat factori de decontaminare mai mari și o reacție mai rapidă comparativ cu ZnO. În cazul suspensiilor cu ZnO, concentrația optimă a fost de 1% m/m, în timp ce concentrațiile mai mari au condus la o ușoară scădere a eficienței, cel mai probabil din cauza aglomerării particulelor și reducerii suprafeței active disponibile.

Comparativ cu HD, care a necesitat intervale mai lungi pentru decontaminarea completă, GD a fost degradat mult mai rapid, procesul fiind finalizat în maximum 60 de minute. Această diferență reflectă particularitățile chimice distincte ale celor doi agenți și reactivitatea diferită față de componentele soluției de decontaminare. Monitorizarea produșilor de degradare a permis identificarea și cuantificarea a patru produși principali rezultați din decontaminarea HD și a cinci produși principali rezultați din decontaminarea GD, oferind o imagine detaliată asupra mecanismelor de transformare chimică implicate.

În ansamblu, rezultatele obținute confirmă eficiența suspensiilor organice reactive funcționalizate cu nanoadsorbanți de ZnO, TiO_2 și zeolit pentru decontaminarea agenților HD și GD. Prin combinarea unei matrice organice reactive cu materiale nanostructurate, aceste formulări permit atât reducerea rapidă a contaminării, cât și transformarea agenților toxici în produși de degradare cu periculozitate redusă, evidențiind potențialul lor aplicativ în scenarii operaționale de tip CBRN.

CAPITOLUL 5

DEZVOLTAREA UNOR HIDROGELURI PELICULOGENE DETAȘABILE PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI CARE ÎNCORPOREAZĂ STRUCTURI METALO-ORGANICE PENTRU DECONTAMINAREA IMEDIATĂ A IPERITEI

Rezultatele acestui studiu au fost publicate integral pe parcursul studiilor doctorale și pot fi consultate în articolul:

Adriana Elena Bratu, Aurel Diacon, Izabela-Cristina Stancu, Mihail Munteanu, Raluca Elena Ginghina, Gabriela Toader, ***Development of alginate–hydroxyethyl cellulose–gum arabic ternary peelable hydrogels for sulfur mustard decontamination***, acceptat pentru publicare în Carbohydrate Polymer Technologies and Applications (Elsevier), 2026, Volume 15, 101197, https://doi.org/10.1016/j.carpta.2026.101197, IF2026 = 7.6, Q1.

5.1. Necesitatea dezvoltării unor hidrogeluri funcționalizate cu structuri metalo-organice pentru decontaminarea agenților vezicanți

Hidrogelurile detașabile reprezintă o clasă emergentă de materiale cu potențial ridicat pentru aplicații de decontaminare în scenarii CBRN, datorită capacității lor de a combina proprietăți fizice și chimice favorabile într-o singură platformă funcțională. Necesitatea dezvoltării unor astfel de sisteme derivă din limitările metodelor convenționale de decontaminare, care implică adesea utilizarea unor soluții lichide agresive, dificil de controlat pe suprafețe sensibile sau în contact direct cu pielea. În cazul agenților vezicanți, precum iperita, intervenția rapidă este esențială pentru reducerea absorbției și a efectelor toxice, ceea ce impune utilizarea unor materiale capabile să acționeze simultan prin adsorbție, imobilizare și degradare chimică.

În acest context, hidrogelurile detașabile pe bază de biopolimeri oferă avantaje semnificative, inclusiv biocompatibilitate, aderență controlată la suprafață și posibilitatea îndepărtării mecanice a contaminantului prin formarea unui film continuu. Funcționalizarea acestora cu structuri metalo-organice (MOF) introduce un nivel suplimentar de eficiență, datorită suprafeței specifice ridicate și a capacității acestor materiale de a adsorbi și transforma compușii toxici. Astfel, dezvoltarea unor hidrogeluri funcționalizate reprezintă o strategie promițătoare pentru obținerea unor sisteme de decontaminare rapide, eficiente și ușor de aplicat în condiții operaționale.

5.2. Metode de preparare a formulărilor și testarea eficienței decontaminării

Au fost dezvoltate nouă formulări distincte de hidrogel pe bază de biopolimeri, funcționalizate cu structuri metalo-organice (MOF) sau nanoparticule de CeO_2, în vederea identificării compoziției optime pentru decontaminare. Prepararea a implicat dispersia inițială a nanoparticulelor prin omogenizare, urmată de incorporarea treptată a biopolimerilor și dizolvarea acestora în apă deionizată la 60 °C, obținându-se sisteme omogene, stabile, adecvate reticulării.

Formarea peliculelor hidrogelurilor a fost realizată prin reticulare ionică, prin pulverizarea unei soluții de $CaCl_2$ 10% peste formulările aplicate pe suprafață, conducând la obținerea unor filme coezive și detașabile. Pentru caracterizări fizico-chimice (SEM, XRD,

FT-IR) și mecanice, peliculele au fost obținute în condiții controlate, pe suporturi curate, pentru a asigura uniformitatea și reproductibilitatea analizelor.

Eficiența decontaminării a fost evaluată pe suprafețe model de policarbonat contaminate cu iperită, aplicată sub formă de micropicături și menținută în contact cu substratul înainte de tratament. Hidrogelurile au fost aplicate direct pe suprafața contaminată, iar după reticulare, peliculele au fost menținute pentru timpi de contact scurți (2,5 și 10 minute), apoi îndepărtate mecanic. Analiza cantitativă a iperitei a fost realizată prin extracție separată a hidrogelului și a suprafeței, urmată de determinare GC-MS.Rezultatele au permis evaluarea eficienței decontaminării prin compararea cantității de agent toxic reținută în hidrogel cu cea rămasă pe suprafață, demonstrând potențialul acestor sisteme detașabile pentru îndepărtarea rapidă și eficientă a contaminanților în condiții relevante operațional.

Tabelul 5.1. *Reactivi și detalii compoziționale pentru prepararea formulărilor testate*

Cod probă	2-Hidroxietilceluloză (HEC) (% greutate)	Gumă arabică (GA) (% greutate)	Alginat (ALG) (% greutate)	Adsorbant
F1	0	0	3	none
F2	2	0	3	none
F2_0.5% MOF-1	2	0	3	0.5 % (greutate %) Basolite Z1200
F2_1% MOF-1	2	0	3	1 % (greutate %) Basolite Z1200
F2_1.5% MOF-1	2	0	3	1.5 % (greutate %) Basolite Z1200
F3	2	1	3	-
F3_0.5% MOF-1	2	1	3	0.5 % (greutate %) Basolite Z1200
F3_1% MOF-1	2	1	3	1 % (greutate %) Basolite Z1200
F3_1.5% MOF-1	2	1	3	1.5 % greutate %) Basolite Z1200
F3_0.5% MOF-2	2	1	3	0.5 % (greutate %) Basolite C300
F3_0.5% MOF-3	2	1	3	0.5 % (greutate %) Basolite Z377
F3_0.5% CeO_2	2	1	3	0.5 % (greutate %) CeO_2 (d<25 nm)
F4	0	1	3	-

5.3. Caracterizări

Formulările de hidrogel au fost caracterizate printr-un set complex de metode fizico-chimice, morfostructurale și mecanice. Inițial, vâscozitatea formulărilor nereticulate a fost determinată cu ajutorul unui viscozimetru rotativ, pentru evaluarea comportamentului de curgere și a adecvării acestora pentru aplicare pe suprafețe contaminate. Gradul de gonflare al hidrogelurilor reticulate a fost determinat gravimetric, prin raportarea diferenței dintre masa hidrogelului gonflat la echilibru și masa xerogelului la masa xerogelului uscat.

Caracterizarea morfologică și compozițională a hidrogelurilor reticulate a fost realizată prin SEM-EDS, după spălare, gonflare, liofilizare și acoperire conductivă cu strat subțire de aur. Această analiză a permis evaluarea arhitecturii suprafeței și a secțiunii transversale, precum și distribuția elementară a componentelor anorganice în matricea hidrogelică.

Structura cristalină și prezența materialelor funcționale în hidrogeluri au fost investigate prin difracție de raze X (XRD), utilizând probe uscate și mojarate, comparate cu materialele de referință. Interacțiunile chimice dintre componentele hidrogelurilor și grupele funcționale caracteristice au fost evaluate prin FT-IR/ATR, în intervalul spectral 4000–600 cm^{-1}.

Proprietățile mecanice și viscoelastice ale hidrogelurilor reticulate au fost determinate prin analiză mecanică dinamică (DMA). Testele de tracțiune uniaxială au permis evaluarea rezistenței mecanice a filmelor, iar testele oscilatorii de forfecare au fost utilizate pentru determinarea regiunii vâscoelastice liniare, a stabilității rețelei și a comportamentului dependent de frecvență. Această abordare integrată a oferit o imagine completă asupra relației dintre compoziție, structură și performanța funcțională a hidrogelurilor dezvoltate.

5.4. Rezultate și discuții

În cadrul acestui capitol au fost dezvoltate și evaluate hidrogeluri detașabile pe bază de biopolimeri, funcționalizate cu structuri metalo-organice și nanoparticule, în vederea decontaminării rapide a iperitei. Conceptul urmărit a fost obținerea unor pelicule hibride capabile să combine captarea fizică a agentului toxic cu imobilizarea și degradarea parțială a acestuia, reducând astfel riscul de contaminare secundară după îndepărtarea materialului de pe suprafața contaminată.

Formulările au fost realizate pornind de la matrici pe bază de alginat, hidroxietilceluloză și gumă arabică, reticulate ionic cu ioni de calciu. În structura acestora au fost integrate structuri metalo-organice de tip MOF și nanoparticule de CeO_2, cu scopul de a crește capacitatea de adsorbție și de a introduce grupări funcționale reactive suplimentare. Analiza reologică a formulărilor nereticulate a evidențiat un comportament non-newtonian de tip shear-thinning, favorabil aplicării pe suprafețe contaminate, deoarece permite întinderea ușoară a materialului sub acțiunea forței mecanice, urmată de menținerea stabilității în repaus. Formulările care conțin HEC, în special sistemele F2 și F3, au prezentat proprietăți reologice mai favorabile și au fost selectate pentru investigații suplimentare.

Caracterizarea morfologică a arătat că structura hidrogelurilor este influențată atât de compoziția matricei polimerice, cât și de tipul și concentrația agentului de umplere. Sistemele fără filler au prezentat suprafețe relativ uniforme, în timp ce introducerea MOF-urilor a determinat creșterea rugozității și a heterogenității structurale. Matricea ternară HEC–GA–Alg a demonstrat o capacitate mai bună de integrare a particulelor comparativ cu sistemele mai simple, iar MOF-1 a prezentat cea mai bună compatibilitate cu rețeaua polimerică. Analizele EDS au confirmat încorporarea agenților de umplere, iar rezultatele XRD au evidențiat menținerea structurii cristaline a MOF-1 în hidrogeluri, fără transformări de fază majore. Modificările observate în difractograme sugerează existența unor interacțiuni interfaciale între particulele MOF și matricea polimerică. În mod similar, analiza FT-IR a indicat că interacțiunile dintre componente sunt predominant fizice, bazate pe legături de hidrogen și interacțiuni de suprafață.

Gradul de gonflare a fost puternic influențat de arhitectura rețelei polimerice și de natura agentului de umplere. Formularea pe bază de alginat a prezentat cea mai ridicată absorbție de apă, în timp ce sistemele care conțin HEC și gumă arabică au avut un grad de gonflare mai redus, ca urmare a formării unei rețele mai dense. Introducerea MOF-urilor a modificat suplimentar capacitatea de gonflare, în funcție de concentrație și de compatibilitatea cu matricea. Aceste rezultate confirmă faptul că echilibrul dintre densitatea rețelei, dispersia

fillerului și capacitatea de retenție a apei sunt esențiale pentru obținerea unor pelicule eficiente și stabile.

Proprietățile mecanice au evidențiat comportamentul caracteristic al unor rețele polimerice moi, capabile să suporte deformări semnificative înainte de rupere. Integrarea MOF-1 a condus la cea mai importantă îmbunătățire a rezistenței mecanice și a ductilității, în special la concentrații intermediare, unde s-a obținut un echilibru favorabil între rigiditate și flexibilitate. Testele de forfecare au confirmat caracterul vâscoelastic al hidrogelurilor, cu un răspuns dominat de componenta elastică, aspect important pentru menținerea integrității peliculei în timpul aplicării și îndepărtării de pe suprafața contaminată.

Evaluarea eficienței de decontaminare a demonstrat că matricile biopolimerice fără agenți de umplere au o capacitate moderată de îndepărtare a iperitei, cu valori apropiate între formulări. Introducerea MOF-1 a crescut semnificativ performanța, în special în matricea ternară HEC–GA–Alg, unde eficiența de decontaminare a depășit 80% după 10 minute pentru formulările cu 1–1,5% MOF-1. Comparativ, MOF-3 și CeO_2 au favorizat în principal migrarea iperitei în peliculă, fără o reducere semnificativă a cantității totale de agent intact recuperat. În schimb, formulările cu MOF-1 au condus la o scădere importantă a iperitei totale recuperate, ceea ce sugerează nu doar captarea fizică a agentului, ci și retenția puternică sau degradarea parțială a acestuia.

Rezultatele demonstrează că hidrogelurile ternare HEC–GA–Alg funcționalizate cu MOF-1 suntcele mai eficiente sisteme dintre formulările investigate, datorită combinației dintre procesabilitate, stabilitate mecanică, capacitate de captare și potențial de degradare a iperitei. Această abordare evidențiază potențialul hidrogelurilor detașabile funcționalizate ca platforme moderne de decontaminare rapidă, aplicabile în scenarii CBRN în care îndepărtarea eficientă și controlată a contaminantului este esențială.

5.5. Concluzii

În cadrul acestui capitol a fost dezvoltată o platformă de hidrogel detașabil reticulat ionic cu Ca^{2+}, bazată pe o matrice ternară de biopolimeri (HEC–GA–Alg), capabilă să integreze eficient structuri metalo-organice și să asigure o decontaminare rapidă a iperitei de pe suprafețe solide. Arhitectura ternară s-a dovedit esențială pentru obținerea unei combinații optime între vâscozitate, capacitate de formare a filmului și coeziune mecanică, permițând în același timp dispersia uniformă a particulelor de tip MOF la concentrații mai ridicate, fără apariția fenomenelor de aglomerare observate în sistemele binare. Aceste caracteristici sunt susținute de comportamentul reologic de tip vâscoelastic dominant elastic ($G' > G''$) și de proprietățile mecanice adecvate, hidrogelurile prezentând rezistență la deformare în intervalul 30–35%.

Rezultatele testelor de decontaminare au evidențiat un avantaj clar al MOF-1 (Basolite Z1200) în cadrul sistemului ternar F3 (HEC–GA–Alg). În timp ce matricile exclusiv polimerice au atins eficiențe de decontaminare de aproximativ 67–72% după 10 minute, formulările care conțin 1–1,5% MOF-1 au prezentat valori semnificativ mai ridicate, de 80,1–82,9%, manifestând totodată o absorbție rapidă încă din primele minute de contact. Comparativ, sistemele bazate pe MOF-3 și CeO_2 au determinat doar îmbunătățiri moderate. Un aspect important este reducerea cantității totale de iperită recuperată în cazul formulărilor cu MOF-1 (aproximativ 41–45%), comparativ cu valorile mai ridicate observate pentru ceilalți agenți de umplere (≥54–65%), ceea ce indică faptul că aceste sisteme nu doar transferă agentul toxic în peliculă, ci contribuie și la retenția sau transformarea parțială a acestuia.

Identificarea compușilor de degradare, precum 1,4-oxatian și 1,4-ditian, confirmă acest mecanism mixt de adsorbție și conversie chimică.

Analiza relației structură–proprietăți evidențiază rolul compoziției matricei polimerice și al concentrației de filler. În sistemul binar F2, proprietățile mecanice prezintă o dependență de tip „volcano”, cu un maxim în jurul concentrației de 1% MOF-1, în timp ce sistemul ternar F3 demonstrează o creștere progresivă a performanței până la 1,5% MOF-1, sugerând că prezența gumei arabice favorizează atât stabilizarea dispersiei, cât și transferul eficient al tensiunii în rețea. Observațiile morfologice confirmă aceste tendințe, evidențiind o distribuție mai uniformă a particulelor și o structură granulară mai omogenă în cazul formulărilor ternare.

Comportamentul de gonflare reflectă, la rândul său, influența arhitecturii rețelei și a agenților de umplere, valorile variind semnificativ între formulări. Introducerea MOF-1 determină inițial o creștere a capacității de hidratare la concentrații reduse, urmată de o limitare a expansiunii rețelei la concentrații mai mari, ca urmare a efectului de constrângere indus de particulele dispersate.

Sistemul HEC–GA–Alg funcționalizat cu MOF-1 se evidențiază ca o platformă de decontaminare detașabilă de înaltă performanță, capabilă să combine îndepărtarea rapidă a iperitei cu reducerea cantității de agent recuperat. Această abordare oferă un avantaj clar față de sistemele bazate exclusiv pe adsorbție și deschide perspective pentru dezvoltarea unor materiale avansate destinate aplicațiilor CBRN. Studiile viitoare vor urmări optimizarea suplimentară a încărcării de MOF, extinderea domeniului de aplicare către alți agenți chimici și îmbunătățirea eficienței de decontaminare peste 90%, menținând în același timp proprietățile mecanice și compatibilitatea biologică ale materialelor.

CAPITOLUL 6

HIDROGELURI PENTRU ELIBERAREA CONTROLATĂ A ATROPINEIÎN SCENARII DE EXPUNERE LA AGENȚI CHIMICI DE RAZBOI

Rezultatele acestui studiu au fost publicate integral pe parcursul studiilor doctorale și pot fi consultate în articolul:

Adriana Elena Bratu, Izabela-Cristina Stancu, Aurel Diacon, Gabriela Toader, Ana Mihaela Gavrila, Raluca Elena Ginghina, Sebastian Stefan Pricop, Tudor-Viorel Tiganescu, ***Hydrogels for controlled release of atropine in chemical warfare agents threat scenarios***, publicat în Sci. Bull., Series B, Vol. 88, Iss. 2, 2026, ISSN 1454-2331, IF2026=0.5, Q4.

6.1. Necesitatea dezvoltării hidrogelurilor pentru eliberarea controlată a agenților terapeutici în scenarii de expunere la agenți chimici de război

În contextul expunerii la agenți chimici de război, în special la agenți neurotoxici din seria compușilor organofosforici, intervenția rapidă și eficientă este esențială pentru reducerea efectelor toxice acute și pentru creșterea șanselor de supraviețuire. Atropina reprezintă unul dintre antidoturile principale utilizate în astfel de situații, acționând ca antagonist al receptorilor muscarinici și contracarând efectele excesului de acetilcolină generate prin inhibarea acetilcolinesterazei. Cu toate acestea, administrarea convențională a atropinei, de tip injectabil, prezintă limitări semnificative, incluzând necesitatea intervenției rapide de către personal specializat, dificultăți în menținerea unor concentrații terapeutice constante și riscul apariției reacțiilor adverse asociate supradozării.

În acest context, dezvoltarea unor sisteme alternative de administrare, capabile să asigure o eliberare controlată și susținută a substanței active, devine o direcție de cercetare de interes major. Hidrogelurile reprezintă o platformă promițătoare pentru astfel de aplicații, datorită structurii lor tridimensionale, biocompatibilității și capacității de a încorpora și elibera molecule active într-un mod controlat. Prin ajustarea compoziției hidrogelului, a gradului de reticulare și a interacțiunilor dintre matrice și substanța activă, este posibilă modularea profilului de eliberare al atropinei, permițând obținerea unor sisteme adaptate cerințelor specifice scenariilor de urgență.

Mai mult, utilizarea hidrogelurilor în acest context poate contribui la dezvoltarea unor soluții terapeutice ușor de administrat, inclusiv sub formă topică sau transdermică, reducând dependența de administrarea parenterală și facilitând utilizarea în condiții operaționale dificile. În plus, aceste sisteme pot oferi protecție locală și pot fi integrate în materiale multifuncționale, capabile să combine roluri de decontaminare și tratament, reprezentând astfel o abordare integrată în managementul expunerii la agenți chimici.

Prin urmare, dezvoltarea hidrogelurilor pentru eliberarea controlată a atropinei se înscrie într-o direcție strategică de cercetare, orientată către creșterea eficienței intervențiilor medicale în situații CBRN, prin obținerea unor sisteme sigure, eficiente și ușor de utilizat, adaptate condițiilor reale de utilizare.

6.2. Metode de sinteză a hidrogelurilor funcționalizate pentru eliberarea controlată a sulfatului de atropină

În acest studiu au fost dezvoltate hidrogeluri funcționalizate destinate eliberării controlate a sulfatului de atropină, utilizând un sistem polimeric obținut prin fotopolimerizare radicalică indusă UV. Matricea hidrogelurilor a fost bazată pe HEAA și NVP, în prezența PVA, folosind DVE ca agent de reticulare și Irgacure 2959 ca fotoinițiator. Pentru optimizarea proprietăților funcționale, formulările au fost modificate prin introducerea unor aditivi specifici, precum dioxid de titan și nanotuburi de halloysit, pentru îmbunătățirea rezistenței mecanice, respectiv β- și γ-ciclodextrine, pentru facilitarea interacțiunii cu molecula de atropină și obținerea unui profil de eliberare susținut.

Procesul de sinteză a implicat dizolvarea prealabilă a PVA în apă, urmată de încorporarea aditivilor și a monomerilor, obținându-se un amestec omogen de prepolimeri. Fotopolimerizarea a fost realizată în condiții controlate, în mediu inert, pentru a evita inhibarea reacției de către oxigen, conducând la formarea unor filme de hidrogel cu proprietăți structurale bine definite. Probele au fost ulterior prelucrate în forme adecvate pentru testări mecanice, de gonflare și pentru evaluarea capacității de încărcare și eliberare a substanței active.

Încărcarea sulfatului de atropină a fost realizată prin metoda imersiei hidrogelurilor liofilizate într-o soluție apoasă, proces bazat pe difuzia substanței active în rețeaua poroasă a materialului. Condițiile de încărcare au fost optimizate pentru a permite o impregnare uniformă, iar cantitatea de atropină încorporată a fost determinată indirect prin analiza soluției reziduale, utilizând metode spectrofluorimetrice. Uscarea ulterioară a probelor a asigurat stabilizarea sistemului și pregătirea acestuia pentru studiile de eliberare.

Evaluarea cineticii de eliberare a fost realizată în soluție tampon fosfat (PBS, pH 7,4), la temperatura fiziologică, pentru a simula condițiile biologice relevante. Rehidratarea hidrogelurilor a permis difuzia controlată a sulfatului de atropină din matrice, proces influențat de parametri precum gradul de reticulare, porozitatea rețelei și natura interacțiunilor polimer–substanță activă. Probele au fost analizate la intervale regulate prin metode UV-Vis și spectrofluorimetrice, asigurând monitorizarea profilului de eliberare în timp.

Rezultatele obținute demonstrează că aceste hidrogeluri reprezintă sisteme eficiente pentru livrarea controlată a atropinei, oferind posibilitatea ajustării profilului de eliberare prin modificarea compoziției și a structurii rețelei polimerice. Astfel, platforma dezvoltată prezintă un potențial semnificativ pentru aplicații terapeutice în scenarii de expunere la agenți neurotoxici, unde este necesară o administrare rapidă, dar controlată, a antidotului.

6.3. Caracterizări

Caracterizarea hidrogelurilor funcționalizate pentru eliberarea controlată a sulfatului de atropină a fost realizată printr-un set de metode fizico-chimice și mecanice, menite să evidențieze atât structura materialelor, cât și comportamentul lor funcțional. Analiza morfologică a hidrogelurilor liofilizate a fost efectuată prin microscopia electronică de baleiaj, evidențiind arhitectura poroasă a rețelei polimerice și distribuția uniformă a componentelor în cadrul matricei.

Structura chimică și interacțiunile dintre componente au fost investigate prin spectroscopie FT-IR, care a permis identificarea grupărilor funcționale caracteristice și confirmarea formării rețelei polimerice reticulate. Stabilitatea structurală a hidrogelurilor a

fost evaluată prin determinarea fracției de gel, calculată pe baza rezistenței materialului la extracție în apă, acest parametru reflectând gradul de reticulare și integritatea rețelei formate.

Gradului de gonflare a fost determinat utilizând metoda gravimetrică, rezultatele indicând capacitatea hidrogelurilor de a absorbi apă și de a se rehidrata în condiții fiziologice. Acest comportament este esențial pentru aplicațiile de livrare controlată, deoarece influențează direct difuzia substanței active din matrice.

Proprietățile mecanice au fost evaluate prin teste de compresie și tracțiune, evidențiind rezistența materialelor la deformare și capacitatea acestora de a-și menține integritatea structurală sub solicitare. În plus, comportamentul vâscoelastic a fost investigat prin teste de forfecare dependente de frecvență și de deformare, oferind informații asupra stabilității rețelei și a răspunsului acesteia în condiții dinamice.

Evaluarea cineticii de eliberare a sulfatului de atropină a fost realizată prin metode spectrofotometrice și spectrofluorimetrice, utilizând măsurători UV-Vis și fluorescență pentru determinarea concentrației de substanță activă eliberată în timp. Curbele de calibrare au permis cuantificarea precisă a atropinei, metoda bazată pe fluorescență fiind preferată datorită sensibilității ridicate și reproductibilității.

Aceste metode de caracterizare au oferit o imagine completă asupra proprietăților structurale, mecanice și funcționale ale hidrogelurilor, evidențiind parametrii cheie care influențează performanța acestora ca sisteme de eliberare controlată a atropinei.

6.4. Rezultate și discuții

Rezultatele obținute evidențiază faptul că tipul de aditiv utilizat influențează în mod direct morfologia și proprietățile funcționale ale hidrogelurilor destinate eliberării controlate a sulfatului de atropină. Analizele morfologice au arătat că hidrogelurile care conțin ciclodextrine prezintă structuri poroase bine organizate și interconectate, favorabile pentru procese de eliberare controlată, în timp ce sistemele care includ halloysit sau TiO_2 dezvoltă rețele mai fragmentate și neregulate, asociate cu mecanisme de eliberare mai rapidă. Hidrogelul martor a evidențiat o structură mai dezorganizată, confirmând rolul esențial al aditivilor în controlul arhitecturii interne.

Analiza FT-IR a confirmat formarea rețelei polimerice și integrarea cu succes a aditivilor în matrice, fără modificări majore ale structurii de bază, dar cu variații subtile în regiunea amprentei spectrale, asociate interacțiunilor specifice dintre componente. Din punct de vedere structural, toate hidrogelurile au prezentat valori ridicate ale fracției de gel, indicând un grad avansat de reticulare. Proba care conține halloysit a evidențiat cea mai mare fracție de gel și cel mai redus grad de gonflare, sugerând o rețea mai densă și mai rigidă, în timp ce hidrogelurile cu ciclodextrine au prezentat un comportament de gonflare mai pronunțat, favorabil difuziei controlate a substanței active.

Proprietățile mecanice au evidențiat diferențe semnificative între formulări. Hidrogelul cu halloysit a prezentat cea mai ridicată rezistență mecanică și rigiditate, în timp ce sistemele cu β- și γ-ciclodextrine au demonstrat un echilibru optim între flexibilitate și stabilitate structurală. În contrast, hidrogelul cu TiO_2 și proba martor au prezentat performanțe mecanice inferioare, fiind caracterizate printr-un comportament predominant vâscos și o integritate structurală redusă, motiv pentru care formularea cu TiO_2 a fost exclusă din studiile ulterioare.

Studiile de eliberare au arătat că toate formulările urmează un mecanism dominant de difuzie, descris cel mai bine de modelul Korsmeyer–Peppas, cu un comportament de tip non-Fickian, sugerând implicarea simultană a difuziei și a relaxării rețelei polimerice. Dintre toate

formulările, hidrogelul care conține β-ciclodextrină s-a evidențiat ca fiind cel mai promițător, datorită capacității sale de a combina o cinetică de eliberare favorabilă cu stabilitate structurală și compatibilitate moleculară. Acest comportament este atribuit formării de complexe de incluziune stabile între β-ciclodextrină și atropină, care permit o eliberare mai controlată și o biodisponibilitate îmbunătățită.

6.5. Concluzii

Au fost obținute hidrogeluri de tip IPN prin fotopolimerizare, cu incorporarea unor aditivi funcționali (halloysit, TiO_2, β- și γ-ciclodextrine), pentru controlul eliberării sulfatului de atropină. Analiza FT-IR a confirmat integrarea acestora în rețeaua polimerică. Halloysitul a condus la creșterea rezistenței mecanice și la reducerea gradului de gonflare, indicând formarea unei structuri mai compacte. Hidrogelurile cu ciclodextrine au prezentat o rezistență mecanică bună și valori ridicate ale G′, sugerând o rețea stabilă și flexibilă.

Hidrogelul pe bază de β-ciclodextrină a evidențiat cea mai lentă eliberare a atropinei, datorită formării de complexe de incluziune stabile. Modelul Korsmeyer–Peppas a indicat o difuzie non-Fickian, implicând atât difuzia, cât și relaxarea rețelei polimerice. În ansamblu, rezultatele demonstrează că alegerea aditivilor permite ajustarea proprietăților mecanice și a cineticii de eliberare, evidențiind potențialul hidrogelurilor sIPN pentru aplicații biomedicale și de apărare.

CAPITOLUL 7

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

7.1. Importanța tezei

Importanța temei este susținută în primul rând de necesitatea identificării rapide și fără ambiguitate a agenților chimici și a biomarkerilor acestora în matrici biologice complexe. În scenariile reale de expunere, detecția nu se limitează la compușii inițiali, ci implică și identificarea produșilor de hidroliză și a aducților biologici, ceea ce impune dezvoltarea unor metodologii analitice integrate, robuste și sensibile. În acest sens, utilizarea combinată a tehnicilor LC-MS/MS și GC-MS/MS, optimizate specific pentru diferite clase de compuși, devine esențială pentru asigurarea unui grad ridicat de certitudine analitică, conform cerințelor internaționale, inclusiv cele impuse de OPCW.

Pe de altă parte, tema abordează o problemă critică legată de limitările metodelor convenționale de decontaminare, care pot fi agresive pentru suprafețe sau pot genera contaminare secundară. Dezvoltarea unor soluții de decontaminare eficiente, rapide și compatibile cu utilizarea în teren, reprezintă un obiectiv decisiv în domeniul apărării chimice. În acest context, utilizarea nanoadsorbanților și a materialelor hibride, precum suspensiile reactive sau hidrogelurile care încorporează compuși cu proprietăți active împotriva armelor chimice de război, oferă o direcție inovatoare, bazată pe mecanisme combinate de adsorbție și degradare chimică.

De asemenea, importanța temei este amplificată de integrarea componentelor de tip hidrogel pentru aplicații duale, atât în decontaminare, cât și în livrarea controlată a antidoturilor. În cazul expunerii la agenți neurotoxici, administrarea rapidă și controlată a atropinei este critică pentru supraviețuire. Astfel, dezvoltarea unor sisteme de eliberare controlată bazate pe hidrogeluri reprezintă o contribuție relevantă atât pentru domeniul medical, cât și pentru cel al apărării.

Teza răspunde unor nevoi reale și actuale, contribuind la dezvoltarea unor soluții integrate care acoperă întregul lanț de intervenție: identificare – decontaminare – tratament. Prin abordarea multidisciplinară și prin utilizarea unor tehnologii moderne, lucrarea aduce un aport semnificativ la consolidarea capacităților analitice și operaționale în domeniul securității chimice.

7.2. Concluzii finale

Rezultatele obținute în cadrul prezentei teze demonstrează eficiența unei abordări integrate în investigarea, identificarea și neutralizarea agenților chimici de război, precum și în dezvoltarea unor platforme avansate pentru protecție și tratament.

În prima etapă, au fost dezvoltate și optimizate metode analitice bazate pe LC-MS/MS și GC-MS/MS pentru identificarea biomarkerilor specifici agenților neurotoxici și vezicanți în probe biologice de plasmă și urină. Abordarea diferențiată a matricilor și utilizarea tehnicilor complementare au permis identificarea compușilor atât în formă intactă, cât și sub formă de produși de hidroliză sau aducți biologici. Studiul a evidențiat în mod particular

comportamentul compușilor din seria A, demonstrând stabilitatea lor crescută și oferind metode analitice adaptate pentru detectarea acestora.

În continuare, au fost dezvoltate suspensii organice reactive care conțin nanoadsorbanți de tip ZnO, TiO_2 și zeolit, destinate decontaminării agenților chimici reali, precum soman (GD) și iperită (HD). Rezultatele au arătat că aceste sisteme prezintă o eficiență ridicată de decontaminare, în special în cazul GD, unde degradarea a fost aproape instantanee. Pentru HD, procesul a fost mai lent, dar semnificativ accelerat prin utilizarea anumitor tipuri și concentrații de nanoadsorbanți. Studiul a evidențiat existența unor concentrații optime, precum și influența fenomenelor de aglomerare asupra performanței.

O contribuție importantă a fost reprezentată de dezvoltarea hidrogelurilor detașabile peliculogene care înglobează structuri metalo-organice (MOF), capabile să combine captarea fizică a agentului toxic cu degradarea chimică parțială. Sistemele bazate pe matricea ternară HEC–GA–Alg și MOF-1 au demonstrat cele mai bune performanțe, atingând eficiențe de decontaminare ridicate într-un timp scurt, concomitent cu reducerea cantității de agent intact recuperat.

În ultima etapă, au fost dezvoltate hidrogeluri pentru eliberarea controlată a sulfatului de atropină, evidențiindu-se rolul aditivilor în controlul morfologiei, proprietăților mecanice și cineticii de eliberare. Hidrogelurile care conțin β-ciclodextrină au prezentat cele mai bune rezultate, oferind un echilibru optim între stabilitate structurală și eliberare controlată.

Rezultatele confirmă că utilizarea materialelor hibride și a nanostructurilor permite dezvoltarea unor sisteme eficiente și versatile pentru gestionarea expunerii la agenți chimici de război.

7.3. Sinteza integrativă a rezultatelor experimentale privind identificarea, decontaminarea și tratarea în scenarii de expunere la agenți chimici de război

Datele experimentale obținute în cadrul tezei demonstrează atingerea obiectivelor propuse prin dezvoltarea unor strategii integrate de identificare, decontaminare și protecție în scenarii de expunere la agenți chimici de război. Prima direcție experimentală a vizat dezvoltarea și aplicarea unor metode analitice LC-MS/MS și GC-MS/MS pentru identificarea biomarkerilor specifici agenților neurotoxici și vezicanți în probe de plasmă și urină. În funcție de matrice și de natura compusului, au fost aplicate strategii de preparare distincte, incluzând extracția pe fază solidă, derivatizarea cu PFB-Br sau HFBI, digestia enzimatică, refluorurarea, precipitarea proteinelor și diluția directă. Această abordare a permis evidențierea compușilor în formă intactă, sub formă de produși de hidroliză sau ca aducți biologici, oferind o confirmare analitică multiplă a expunerii.

Prin LC-MS/MS au fost identificați biomarkeri relevanți pentru expunerea la agenții vezicanți. Au fost raportați compuși precum produși de hidroliză ai iperitei, analogul 1,3-bis(2-hidroxietiltio)propan, trietanolamina , cât și aducții de tip CPF ai produșilor intacți. Pentru TDG, deși ionul teoretic protonat ar fi fost $[M+H]^+$ cu m/z 123, în condițiile experimentale a fost observat ionul m/z 105, atribuit unei structuri de tip episulfoniu, utilizat ulterior ca ion precursor. Tranziția 105 → 45 a fost selectată ca tranziție de cuantificare, iar 105 → 61 și 105 → 87 ca tranziții de confirmare. Pentru aducții peptidici ai iperitei,

sesquiiperitei și analogului cu punte propil au fost monitorizați ionii precursori m/z 470,17, 530,2 și 544,2, cu tranziții caracteristice către fragmente specifice sulfurate sau peptidice. Pentru azot-iperită, aductul HN3-CPF a fost identificat prin ionul precursor m/z 497,2, tranziția 497,2 → 364,1 fiind utilizată pentru cuantificare.

În cazul agenților neurotoxici, tehnica LC-MS/MS a permis identificarea compușilor din seria A în formă intactă și sub formă de biomarkeri derivați. A-230 și A-232 au fost detectați prin ionii precursori m/z 195,1 și 211,1, ambele utilizând tranziția către m/z 74,1 ca tranziție de cuantificare, ceea ce confirmă un comportament comun de fragmentare pentru această clasă. Produșii de hidroliză A-230-OH, A-232-OH și A-234-OH au prezentat, de asemenea, tranziții caracteristice către m/z 74, iar derivații PFB corespunzători au fost detectați inclusiv prin LC-MS/MS, deși metoda de derivatizare fusese utilizată inițial pentru GC-MS/MS. Pentru biomarkerii peptidici ai compușilor A-230 și A-232 au fost observați ioni dublu încărcați, la m/z 485,7 și 493,7, comportament specific aducților de tip nonapeptidă. De asemenea, pentru Sarin și A-234 au fost identificați aducți de tirozină, GB-Tyr la m/z 302 și A234-Tyr la m/z 386,2.

Complementar, prin GC-MS/MS au fost confirmați compuși intacți sau derivați volatili ai produșilor de hidroliză. Iperita intactă a fost identificată în modul EI prin tranzițiile 109 → 73 și 141 → 86, la un timp de retenție de aproximativ 10,59 min, iar TDG derivatizat cu HFBI a fost identificat prin tranzițiile 301 → 240 și 241 → 169, la aproximativ 12,16 min. Sesquiiperita a fost identificată prin tranzițiile 182 → 123 și 182 → 63, la aproximativ 17,51 min, iar produsul său de hidroliză derivatizat prin tranzițiile 301 → 241 și 301 → 169. Pentru Sarin, identificarea moleculei intacte s-a realizat prin tranzițiile 125 → 99 și 99 → 47, la 5,11–5,14 min, iar produsul de hidroliză IpMPA-PFB prin tranzițiile 137 → 95 și 137 → 79. Somanul a prezentat două semnale apropiate, la 8,45–8,52 min, atribuite izomerilor, monitorizate prin tranzițiile 126 → 82 și 99 → 81. Astfel, prin corelarea LC-MS/MS cu GC-MS/MS, identificarea biomarkerilor a fost realizată pe baza timpilor de retenție, tranzițiilor Q/q și raporturilor ionice, reducând riscul de atribuire eronată.

A doua direcție experimentală a urmărit dezvoltarea suspensiilor organice reactive pentru decontaminarea agenților reali HD și GD. Soluția organică de bază a prezentat o densitate de 0,91 ± 0,02 g/cm^3 și o alcalinitate de 2,47 ± 0,5 cm^3 HCl 1 N/g, fără degradarea suprafețelor metalice testate și cu menținerea eficienței după expunere la condiții extreme de temperatură și umiditate. Prin integrarea nanoadsorbanților ZnO, TiO_2 și zeolit au fost obținute suspensii cu concentrații de 0,1–2% m/m. Pentru HD, soluția organică pură a atins 76,42% eficiență după 2 minute și 99,99% după 24 de ore. Prin comparație, suspensia cu 0,1% TiO_2 a atins 94,95% după 2 minute și 99,90% după 5 ore, iar suspensia cu 0,1% zeolit a atins 95,64% după 2 minute și 99,92% după 5 ore, demonstrând o accelerare majoră a procesului. Pentru ZnO, concentrația optimă a fost 1%, cu 97,42% eficiență după 5 ore, în timp ce 2% a condus la scăderea performanței, atribuită aglomerării particulelor.

Pentru GD, procesul de decontaminare a fost considerabil mai rapid. Soluția organică pură a atins 99,83% după 2 minute și 99,91% după 1 oră, în timp ce suspensiile cu 0,1% TiO_2 și 0,1% zeolit au condus la reacție practic completă după 10 minute. Suspensia cu 1% ZnO a atins 99,91% după 2 minute și 99,97% după 10 minute. Monitorizarea produșilor de degradare a confirmat transformarea agenților toxici în compuși cu periculozitate redusă.

Pentru HD au fost identificați patru produși principali: sulfura de 2-cloroetil vinil, 1,4-ditian, 1,2-bis(viniltio)etan și 2-tiomorfolinoetanol. Pentru GD au fost identificați cinci produși principali: acid metilfosfonic, izopropil pinacolil metilfosfonat, acid pinacolil metilfosfonic, dipinacolil metilfosfonat și esterul di(2-etoxietil) al acidului metilfosfonic. Aceste rezultate demonstrează că formulările dezvoltate nu acționează doar prin îndepărtarea agentului inițial, ci și prin conversia acestuia în produși de degradare mai puțin periculoși.

A treia direcție experimentală a vizat dezvoltarea hidrogelurilor peliculogene detașabile HEC–GA–Alg care încorporează structuri metalo-organice pentru decontaminarea rapidă a iperitei. Au fost realizate formulări pe bază de alginat, HEC și gumă arabică, reticulate ionic cu Ca^{2+} și încărcate cu MOF-1, MOF-2, MOF-3 sau CeO_2. Formulările au prezentat comportament reologic de tip shear-thinning, adecvat aplicării pe suprafețe contaminate, iar răspunsul vâscoelastic dominat de componenta elastică a susținut integritatea filmelor în timpul aplicării și îndepărtării. Hidrogelurile polimerice fără filler au avut eficiențe de decontaminare de aproximativ 67–72% după 10 minute, în timp ce integrarea MOF-1 în matricea ternară F3 a crescut eficiența la 80,1–82,9% pentru concentrații de 1–1,5% MOF-1. În plus, cantitatea totală de iperită recuperată a scăzut la aproximativ 41–45% pentru aceste formulări, comparativ cu ≥54–65% pentru MOF-3 și CeO_2, ceea ce indică un mecanism dual: captare fizică și transformare parțială. Identificarea 1,4-oxatianului și 1,4-ditianului confirmă contribuția proceselor de degradare chimică.

A patra direcție experimentală a constat în dezvoltarea hidrogelurilor sIPN pentru eliberarea controlată a sulfatului de atropină. Matricea a fost obținută prin fotopolimerizare UV a HEAA și NVP în prezența APV, utilizând DVE ca agent de reticulare și Irgacure 2959 ca fotoinițiator. Aditivii utilizați au fost halloysit, TiO_2, β-ciclodextrină și γ-ciclodextrină. Hidrogelurile cu ciclodextrine au prezentat structuri poroase organizate, favorabile eliberării controlate, în timp ce halloysitul a condus la cea mai mare fracție de gel, 90,85%, și la cel mai redus grad de gonflare indicând o rețea mai densă și mai rigidă. Formulările cu β- și γ-ciclodextrină au prezentat o combinație favorabilă între flexibilitate, stabilitate structurală și capacitate de difuzie. Studiile de eliberare au fost descrise cel mai bine de modelul Korsmeyer–Peppas, cu $R^2 > 0,97$, indicând un mecanism non-Fickian, bazat pe difuzie și relaxarea rețelei polimerice. Dintre formulări, hidrogelul cu β-ciclodextrină s-a evidențiat ca fiind cel mai promițător pentru eliberarea controlată a atropinei, datorită capacității de formare a complexelor de incluziune stabile cu molecula activă.

Prin corelarea acestor rezultate, teza demonstrează atingerea obiectivelor experimentale propuse: dezvoltarea unor metode analitice robuste pentru identificarea biomarkerilor în probe biologice, formularea unor suspensii reactive eficiente pentru decontaminarea HD și GD, obținerea unor hidrogeluri detașabile capabile să reducă rapid contaminarea cu iperită și dezvoltarea unor sisteme pe bază de hidrogel pentru eliberarea controlată a atropinei. Totalitatea datelor experimentale evidențiază caracterul integrat al cercetării, orientat către identificare, intervenție și protecție în scenarii CBRN reale.

7.4. Contribuții personale

Dezvoltarea unei abordări integrate pentru gestionarea expunerii la agenți chimici de război

Cea mai importantă contribuție originală a prezentei teze constă în conceperea și demonstrarea fezabilității unei abordări integrate dedicate gestionării expunerii la agenți chimici de război, construită pe principiul continuității dintre identificarea analitică, decontaminarea și intervenția terapeutică. În literatura de specialitate, aceste componente sunt abordate, de regulă, ca direcții de cercetare independente, fiind dezvoltate separat de comunități științifice diferite. În schimb, cercetarea realizată în cadrul prezentei teze propune o viziune unitară asupra întregului proces de răspuns CBRN, în care fiecare etapă este dependentă de cea precedentă și condiționează succesul următoarei etape.

Astfel, identificarea biomarkerilor specifici reprezintă etapa primordială pentru confirmarea expunerii și caracterizarea agentului implicat, furnizând informațiile necesare inițierii măsurilor de răspuns. Decontaminarea urmărește limitarea absorbției și prevenirea contaminării secundare, iar administrarea controlată a antidoturilor completează intervenția prin diminuarea consecințelor fiziopatologice ale expunerii. Prin integrarea acestor componente într-un singur flux experimental și conceptual, teza depășește abordarea clasică bazată pe studii individuale și demonstrează că eficiența sistemului global este rezultatul optimizării fiecărei etape.

Originalitatea lucrării nu se limitează doar în dezvoltarea unor metode analitice și materiale noi, ci și în definirea unei platforme multidisciplinare care reflectă modul real de desfășurare a intervențiilor în scenarii CBRN. Această perspectivă integrativă constituie una dintre principalele contribuții ale tezei și poate reprezenta un model pentru dezvoltarea viitoare a strategiilor operaționale dedicate protecției împotriva amenințărilor chimice.

Dezvoltarea unor strategii analitice integrate pentru identificarea biomarkerilor specifici agenților chimici de război

O contribuție personală majoră a prezentei teze constă în optimizarea unor strategii analitice complementare bazate pe tehnicile LC-MS/MS și GC-MS/MS pentru identificarea biomarkerilor specifici agenților neurotoxici și vezicanți în matrici biologice complexe, precum plasma și urina. Originalitatea acestei direcții nu constă exclusiv în utilizarea celor două tehnici analitice, ci în conceperea unei metodologii integrate, adaptată particularităților fiecărei clase de compuși și fiecărui tip de biomarker.

Au fost dezvoltate și optimizate proceduri distincte de preparare a probelor, precum extracția pe fază solidă, digestia enzimatică, derivatizarea cu PFB-Br și HFBI, refluorurarea, precipitarea proteinelor și diluția directă, în funcție de natura analitului urmărit. Această abordare a permis identificarea simultană a compușilor intacți, a produșilor de hidroliză și a aducților biologici, oferind o confirmare analitică multiplă și reducând riscul identificărilor eronate.

Prin corelarea informațiilor obținute prin LC-MS/MS și GC-MS/MS au fost dezvoltate strategii robuste de confirmare analitică, bazate pe timpul de retenție, raporturile ionice și

tranzițiile precursor–produs, compatibile cu cerințele actuale privind identificarea agenților chimici de război. Rezultatele obținute demonstrează că utilizarea complementară a celor două tehnici conduce la creșterea selectivității și a nivelului de încredere al identificării, reprezentând o contribuție relevantă pentru laboratoarele implicate în analiza probelor CBRN.

- **Contribuții privind investigarea agenților din seria A (Novichok)**

Una dintre cele mai valoroase contribuții originale ale prezentei teze este reprezentată de investigarea compușilor din seria A (Novichok), categorie de agenți neurotoxici care a atras atenția comunității științifice în ultimii ani, ca urmare a incidentelor internaționale recente și a includerii acestor substanțe în programele de monitorizare ale OPCW. Comparativ cu agenții organofosforici clasici, informațiile disponibile privind comportamentul acestor compuși în fluidele biologice, stabilitatea lor și biomarkerii rezultați sunt încă limitate.

În acest context, cercetarea realizată a urmărit dezvoltarea unor metode analitice dedicate pentru identificarea compușilor A-230, A-232 și A-234 atât în formă intactă, cât și sub formă de produși de hidroliză și aducți biologici. Au fost obținute date experimentale privind comportamentul acestora în condițiile analizelor LC-MS/MS și GC-MS/MS, fiind evidențiată stabilitatea chimică ridicată a acestor agenți și posibilitatea identificării lor directe în probe biologice.

Un element cu caracter de noutate îl reprezintă demonstrarea faptului că derivații PFB, utilizați tradițional în analiza GC-MS/MS, pot fi integrați cu succes și în strategiile LC-MS/MS, obținându-se semnale intense, stabile și reproductibile. Relevanța și robustețea acestei abordări au fost confirmate în cadrul testelor interlaboratoare organizate sub egida OPCW (Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons), unde metodele de preparare a probelor și strategiile analitice dezvoltate în cadrul prezentei teze au demonstrat un nivel ridicat de fiabilitate și acuratețe în identificarea biomarkerilor specifici agenților chimici de război, în conformitate cu standardele internaționale aplicabile laboratoarelor desemnate. Aceste rezultate confirmă nu doar caracterul inovator al metodologiei propuse, ci și potențialul acesteia de implementare în laboratoare specializate implicate în verificarea respectării Convenției privind Armele Chimice și în investigarea incidentelor CBRN.

Această abordare extinde posibilitățile analitice existente și contribuie la dezvoltarea unor metodologii adaptate unei clase de agenți pentru care literatura de specialitate este încă într-o etapă de consolidare.

- **Dezvoltarea suspensiilor organice reactive pentru decontaminarea agenților chimici de război**

O contribuție originală importantă constă în dezvoltarea și optimizarea unor suspensii organice reactive care încorporează nanoadsorbanți de tip ZnO, TiO_2 și zeolit, destinate decontaminării agenților chimici reali, respectiv soman (GD) și iperită sulfuroasă (HD). Cercetarea a urmărit depășirea limitărilor sistemelor convenționale de decontaminare prin proiectarea unor formulări capabile să combine procesele de adsorbție și degradare chimică într-un singur material.

Prin investigarea sistematică a tipului și concentrației nanoadsorbanților a fost demonstrată existența unor concentrații optime de utilizare și a fost evidențiat impactul fenomenelor de aglomerare asupra eficienței de decontaminare. Spre deosebire de numeroase studii care raportează exclusiv gradul de eliminare al contaminantului, cercetarea realizată a inclus și identificarea produșilor de degradare rezultați în urma reacțiilor de detoxifiere, oferind informații suplimentare privind mecanismele implicate.

Rezultatele demonstrează că formulările dezvoltate nu acționează doar prin îndepărtarea fizică a agentului toxic, ci și prin transformarea acestuia în compuși cu toxicitate redusă, aspect deosebit de important în evaluarea performanței unui sistem de decontaminare destinat aplicațiilor CBRN.

- **Dezvoltarea hidrogelurilor peliculogene detașabile care încorporează structuri metalo-organice**

O contribuție cu un pronunțat caracter inovator este reprezentată de dezvoltarea unei noi generații de hidrogeluri peliculogene detașabile pe bază de HEC–GA–Alg, capabile să încorporeze structuri metalo-organice în vederea decontaminării rapide a agenților vezicanți. Concepția acestor materiale a avut la bază limitările identificate în formulările existente, care asigurau fie proprietăți mecanice adecvate, fie activitate chimică asupra contaminantului, însă rareori combinau aceste caracteristici într-un singur sistem.

Pornind de la experiența acumulată în dezvoltarea hidrogelurilor reticulate ionic fără structuri metalo-organice, prezentată anterior în literatura de specialitate, în cadrul prezentei teze a fost propusă o nouă arhitectură bazată pe integrarea MOF-urilor într-o matrice ternară de biopolimeri. Această abordare a permis obținerea unor materiale care îmbină proprietățile filmogene, capacitatea de detașare rapidă, adsorbția eficientă și degradarea chimică parțială a iperitei.

Caracterizarea reologică, mecanică și morfologică a demonstrat existența unui efect sinergic între matricea polimerică și structurile metalo-organice, reflectat prin îmbunătățirea performanțelor de decontaminare și reducerea cantității de agent toxic recuperat după aplicarea hidrogelului. Prin urmare, cercetarea nu propune doar o nouă formulare, ci introduce un concept nou de material multifuncțional destinat intervenției imediate în scenarii CBRN.

- **Dezvoltarea hidrogelurilor pentru eliberarea controlată a atropinei**

Ultima direcție experimentală a extins aplicabilitatea hidrogelurilor dezvoltate către domeniul intervenției medicale, prin proiectarea unor sisteme de eliberare controlată a sulfatului de atropină. Această abordare depășește conceptul clasic al hidrogelurilor utilizate exclusiv pentru decontaminare și demonstrează potențialul acestora de a contribui și la etapa terapeutică a răspunsului CBRN.

Prin utilizarea diferiților aditivi, precum halloysitul, β-ciclodextrina, γ-ciclodextrina și TiO_2, au fost investigate relațiile dintre arhitectura rețelei polimerice, proprietățile mecanice și profilul de eliberare al substanței active. Rezultatele au demonstrat că modificarea controlată a compoziției permite ajustarea cineticii de eliberare și dezvoltarea unor sisteme capabile să asigure o administrare susținută a atropinei.

Dincolo de caracterizarea materialelor, cercetarea propune o direcție alternativă de administrare a antidoturilor, cu potențial de utilizare în situații în care accesul la administrarea injectabilă este limitat sau întârziat. În acest sens, hidrogelurile dezvoltate reprezintă mai mult decât simple sisteme de livrare a medicamentelor, constituind o posibilă platformă pentru dezvoltarea unor tehnologii moderne destinate intervenției rapide în scenarii de expunere la agenți neurotoxici.

7.5. Direcții de cercetare deschise de teză

Rezultatele obținute deschid multiple direcții de cercetare în viitor. În domeniul analitic, se pot dezvolta metode extinse pentru identificarea altor clase de agenți chimici și pentru integrarea tehnicilor de screening rapid.

În ceea ce privește materialele avansate pentru decontaminare, cercetările viitoare pot viza optimizarea suplimentară a compozițiilor, explorarea altor tipuri de nanomateriale și evaluarea performanței în condiții reale de teren.

Pentru hidrogelurile care înglobează structuri cu proprietăți active, direcțiile viitoare includ creșterea încărcării de MOF, îmbunătățirea stabilității și evaluarea biocompatibilității pentru aplicații directe pe piele.

În cazul sistemelor de eliberare controlată, pot fi investigate alte substanțe active, mecanisme de eliberare stimuli-răspuns și integrarea în dispozitive portabile pentru utilizare în situații de urgență.

În concluzie, teza creează o bază solidă pentru dezvoltarea unor tehnologii avansate în domeniul protecției împotriva agenților chimici, cu potențial de aplicare atât în domeniul civil, cât și militar.

Lista lucrărilor publicate și a participărilor la conferințe

Au rezultat 7 articole ISI (IF cumulat – 28.447, 4 Q1 și 1 Q2) dintre care 3 articole ISI ca autor principal (IF cumulat – 11.272, 1 Q1 și 1 Q2) și 9 prezentări la conferințe naționale/internaționale dintre care 3 ca autor principal.

Activitățile de cercetare au fost finanțate prin 5 proiecte de cercetare dezvoltare (2 proiecte naționale și 3 proiecte internationale), dintre care la 1 proiect național autoarea este director de proiect.

Publicații indexate in Web of Science Core Collection rezultate în urma cercetărilor din teza de doctorat

Autor principal (IF cumulat – 12.572)

1. **Adriana Elena Bratu**, Aurel Diacon, Izabela-Cristina Stancu, Mihail Munteanu, Raluca Elena Ginghina, Gabriela Toader, *Development of alginate–hydroxyethyl cellulose–gum arabic ternary peelable hydrogels for sulfur mustard decontamination*, Carbohydrate Polymer Technologies and Applications (Elsevier), 101197 pre-proof online; **(IF 2026 – 7.6, Q1)**

2. **Adriana Elena Bratu**, Izabela-Cristina Stancu, Aurel Diacon, Gabriela Toader, Ana Mihaela Gavrila, Raluca Elena Ginghina, Sebastian Stefan Pricop, Tudor-Viorel Tiganescu, *Hydrogels for controlled release of atropine in chemical warfare agents threat scenarios,* publicat în Sci. Bull., Series B, Vol. 88, Iss. 2, 2026, WoS, ISSN 1454-2331; **(IF 2026 – 0.5, Q4)**

3. **A. Bratu**, R.E. Ginghina, G. Toader, A. Moldovan, T.V. Tiganescu, R. Oncioiu, P. Deliu, R. Petre, G. Epure, M. Purica, *Reactive organic suspensions comprising ZnO, TiO2 and zeolite nanosized adsorbents: evaluation of decontamination efficiency on soman and sulfur mustard*, Toxics 2021, 9 (12), 334; **(IF 2022 - 4.472, Q2)**

Co-autor (IF cumulat – 15.875)

4. G. Toader, R.E. Ginghina, **A.E. Bratu,** A.I. Podaru, D. Pulpea, T. Rotariu, A.M. Gavrilă, A. Diacon, *Ionic Crosslinked Hydrogel Films for Immediate Decontamination of Chemical Warfare Agents,* Gels **2024**,10, 428; **(IF 2024 – 5.3, Q1)**

5. G. Toader, R.E. Ginghina, A. Diacon, E. Rusen, **A.E. Bratu,** A. Podaru, T. Rotariu, *Design and Application of Photocrosslinkable Hydrogel Films for Fast and Efficient Decontamination of Chemical Warfare Agents*, ACS Appl. Polym. Mater. 2022; **(IF 2022 – 4.7, Q1)**

6. R.E. Ginghina, G. Toader, M. Purica, **A. Bratu**, C. Lazaroaie, T.V. Tiganescu, R. Oncioiu, O. Iorga, F. Zorila, M. Constantin, G. Craciun, F. Comanescu, C. Romanitan, *Antimicrobial activity and degradation ability study on nanoparticle-enriched formulations specially designed for the neutralization of real and simulated biological and chemical warfare agents*, Pharmaceuticals 2022, 15 (1), 97; **(IF 2022 - 5.575, Q1)**

7. T.V. Țigănescu, R.E. Ginghină, N. Grigoriu, A. Pretorian, R. Petre, **A. Bratu**, O. Hoza, *Decontamination Efficiency Of Nerve Agent Soman (GD) With A New Amino-Alcoholic Solution,* U.P.B. Sci. Bull., Series B, 83 (4), 2021, 75-84; **(IF 2021 – 0.3)**

Conferinte internationale / proceedings / Volume conferinte

8. **A. Bratu,** I.C. Stancu, R.E. Ginghină, G. Toader, O. Hoza, F.L. Zorila, T.V. Tigănescu, *Hydrogels for wounds caused by blister agents,* PRIOCHEM 18th Edition, Bucharest 2022; **(poster presentation)**

9. **A.E. Bratu,** R.E. Ginghina, A.E. Modovan, T.V. Tiganescu, G. Toader, R.E. Oncioiu, P. Deliu, G. Epure, *Zinc oxide nanoparticles for the decontamination of chemical warfare nerve agents and blister agents*, Chem. Proc. 2022, 7, 78; **(articol în volum de conferință)**

10. **A. Bratu**, R. Ginghina, A. Moldovan, T.V. Tiganescu, G. Toader, R. Oncioiu, P. Deliu, G. Epure, *The influence of the zinc oxide nanoparticles over decontamination efficiency of soman and sulfur mustard,* PRIOCHEM 17th Edition, Bucharest 2021, ISSN 2601 - 4203 and ISSN-L 2601 - 4181; **(poster presentation)**

11. R. Ginghina, G. Toader, **A. Bratu,** I. A. Stoian, *Emerging Technologies and Solutions for Chemical Warfare Agents Decontamination*, The 28th International Scientific Conference Knowledge-Based Organization

KBO 2022, Conference proceedings, ISSN: 1843-682X, 28 (3), 2022, 39 – 43;**(articol în volum de conferință)**

12. R.E. Ginghină, **A.E. Bratu,** G. Toader, T.V. Tigănescu, *Nanoparticles - Enriched Compositions with Applications in Chemical Warfare Agents Neutralization*, 9th International Conference on Materials Science and Technologies – RoMAT 2022, Bucharest 2022; **(oral presentation)**

13. O. Hoza, A. Podaru, R. Ginghina, G. Toader, M. Alexandru, **A. Bratu**, A.M. Gavrila, B. Trica, *Hydrogel coatings for CBRN applications,* PRIOCHEM 18th Edition, Bucharest 2022; **(poster presentation)**

14. R.E. Ginghină, G. Toader, T.V. Tigănescu, M. Purica, **A. Bratu**, C. Lazaroaie, F. Zorila, M. Constantin, *Antimicrobial activity of the natural zeolites and titanium dioxide nanoparticles embedded in organic decontaminants*, 9th International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices" BIOMMEDD'2022, Bucharest, 2022, p. 200; **(poster presentation)**

15. R.E. Ginghină, T.V. Țigănescu, A.E. Moldovan, R. Oncioiu, O. Hoza, **A. Bratu,***Zinc oxide nanoparticles – amino alcoholic solution for biological decontamination*, 2nd Bucharest Polymer Conference, Bucharest, 2021; **(poster presentation)**

16. T. V. Țigănescu, R.E. Ginghină, N. Grigoriu, A. Pretorian, R. Petre, **A. Bratu**, O. Hoza, *Decontamination efficiency of nerve agent soman (GD) with amino-alcoholic solution*, The 8th International Conference on Materials Science and Technologies – RoMat 2020, Bucharest, 2020; **(poster presentation)**

Proiecte în cadrul cărora s-au desfășurat activități de cercetare din teza de doctorat.

1. *National capabilities for chemical warfare agents specific biomarkers identification from biomedical samples*, MoD R&D plan**, 2025 –2027– director proiect;**

2. *Ultrasonic continuous flow technology catalyzed by advanced nanomaterials for waste-free destruction of chemical warfare agents and highly toxic compositions***,** PN-IV-P7-7.1-PED-2024-0980, **2025-2026 - membru echipă**

3.*Hybrid supramolecular hydrogels for CBRN (chemical, biological, radiological and nuclear) fast decontamination applications,* PN-IV-P2-2.1-TE-2023-0806, **2025-2026** – **membru echipă**;

4.*Antimicrobial patches with bacterial cellulose and plant extracts-emerging technologies for controlled release medical devices*, PN-IV-P7-7.1-PTE-2024-0305, **2025 – 2027** – **membru echipă**;

5. *Deterring the Russian Federation's further use of chemical weapons through enhancing romania's sophisticated detection capabilities of environmental samples*, US Grant **2025-2026 – membru echipă;**

6. *Deterring WMD Assassinations by Developing State of the Art Detection Capabilities for CWC Related Analysis on Biotoxins and New Schedule 1 Chemicals from Environmental Samples in Romania*,US Grant,**2024-2025– membru echipă;**

7. *Deterring State-Based WMD assassinations by Developing Detection and Analysis Capabilities from Biomedical samples in Romania*, US Grants SISNCT21CA3040, 2022-2023; SISNCT22CA0059, **2023-2024– membru echipă;**

8. *Active gels: eco-friendly tools for immediate chemical and biological decontamination of sensitive surfaces*, PN-III-P2-2.1-PED-2021-3415, **2022 – 2024– membru echipă.**

Teza prezinta 222 pagini.

Referințe bibliografice

1. Chauhan, S.; Chauhan, S.; D'Cruz, R., Chemical Warfare Agents. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2020**.
2. Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R., *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*. Wiley: 2007.
3. John, H.; Thiermann, H., Analysis of Chemical Warfare Agents. *Journal of Chromatography A* **2021**.
4. Franjesevic, A. J., Mechanisms of Sulfur Mustard Toxicity. *Toxics* **2020**.
5. Balali-Mood, M., Vesicant Agents: Toxicity and Mechanisms. *Toxics* **2021**.
6. Gupta, R. C., *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier: 2020.
7. Noort, D.; Hulst, A. G., Biomarkers of Exposure to Chemical Warfare Agents. *Toxics* **2021**.
8. Tang, C.; Matz, D.; Koblentz, G. D.; Trapp, R. *The Chemical Universe: Scheduled and Unscheduled*; Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW): The Hague, Netherlands, 2018/07/10, 2018.
9. Nair, A.; Yadav, P.; Behl, A.; Sharma, R. K.; Kulshrestha, S.; Butola, B. S.; Sharma, N., Toxic blister agents: Chemistry, mode of their action and effective treatment strategies. *Chemico-Biological Interactions* **2021,** *350*, 109654.
10. Noort, D.; Hulst, A. G., Biomarkers of exposure to chemical warfare agents: a review. *Toxics* **2022**.
11. John, H.; Thiermann, H., Recent advances in analysis of chemical warfare agent biomarkers. *Journal of Chromatography A* **2021**.
12. Li, B.; Schopfer, L. M.; Lockridge, O., Mass spectrometry detection of organophosphate adducts to proteins. *Chemical Research in Toxicology* **2021**.
13. Black, R. M.; Read, R. W., Biomarkers of exposure to sulfur mustard. *Archives of Toxicology* **2021**.
14. Balali-Mood, M., Sulfur mustard toxicity and biomarkers. *Toxics* **2021**.
15. Gunderson, E. W., Advances in LC-MS/MS analysis of chemical warfare agents. *Trends in Analytical Chemistry* **2022**.
16. van der Schans, M. J., Sample preparation and analysis of chemical warfare agent biomarkers. *Journal of Chromatography B* **2022**.
17. Zurer, P., LC-MS/MS approaches for biomarker identification in toxicology. *Analytical Chemistry* **2021**.
18. Petrovic, M., Recent developments in GC-MS/MS for toxic chemical detection. *Toxics* **2023**.
19. Opravil, J.; Pejchal, J.; Finger, V.; Korabecny, J.; Rozsypal, T.; Hrabinova, M.; Muckova, L.; Hepnarova, V.; Konecny, J.; Soukup, O.; Jun, D., A-agents, misleadingly known as "Novichoks": a narrative review. *Archives of Toxicology* **2023,** *97* (10), 2587-2607.
20. Charejoo, A.; Arabfard, M.; Jafari, A.; Hasani Nourian, Y., A complete, evidence-based review on novichok poisoning based on epidemiological aspects and clinical management. *Frontiers in Toxicology* **2023,** *4*, 1004705.
21. Organisation for the Prohibition of Chemical, W. OPCW Provides Technical Assistance to Germany Regarding Allegations of Chemical Weapons Use Against Alexei Navalny. https://www.opcw.org/media-centre/news/2020/09/opcw-provides-technical-assistance-germany-regarding-allegations-chemical.
22. Gupta, R.; Parmar, M., Pralidoxime. In *StatPearls*, StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
23. Schaffer, D. H.; Hayoun, M. A., Nerve Agents. In *StatPearls*, StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2025.

24. Food, U. S.; Drug, A. FDA Approves Pyridostigmine Bromide as Pretreatment Against Nerve Gas. https://www.fda.gov/drugs/bioterrorism-and-drug-preparedness/fda-approves-pyridostigmine-bromide-pretreatment-against-nerve-gas.
25. Li, H.; Lu, C.; Liu, Z.; Xiang, F.; Liu, B.; Wang, H.; Chang, J.; Pan, L.; Chen, Y.; Chen, J., Advancements in bioscavenger mediated detoxification of organophosphorus poisoning. *Toxicol Res (Camb)* **2024,** *13* (3), tfae089.
26. Organisation for the Prohibition of Chemical, W. Chemical Agents and Medical Response. https://www.opcw.org.
27. Sidell, F. R.; Takafuji, E. T.; Franz, D. R., *Medical Aspects of Chemical Warfare*. Borden Institute: 2008.
28. Etemad, L.; Moshiri, M.; Balali-Mood, M., Advances in treatment of sulfur mustard poisoning. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **2018,** *11* (10), 1039-1050.
29. Khazdair, M. R.; Boskabady, M. H., The effects of sulfur mustard on respiratory system: A review. *Frontiers in Medicine* **2022,** *9*, 791914.
30. Shakarjian, M. P.; Laskin, J. D., Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure. *Toxicological Sciences* **2010**.
31. Sadeghi, M., Immunopathological mechanisms of sulfur mustard lung injury. *International Immunopharmacology* **2020**.
32. Snider, V. G.; Hill, C. L., Functionalized reactive polymers for the removal of chemical warfare agents. *Journal of Hazardous Materials* **2023**.
33. Ginghina, R. E.; Bratu, A. E., Reactive organic suspensions with ZnO, TiO2 and zeolite for chemical warfare agent decontamination. *Toxics* **2021**.
34. Huang, T., MOF-based materials for degradation of chemical warfare agents. *Nanomaterials* **2024**.
35. Sura, P.; Popiel, S., Selected decontamination methods of chemical warfare agents. *Biuletyn Wojskowej Akademii Technicznej* **2023**.
36. Shumeiko, A. E., Chemical warfare agents: structure, properties and decontamination. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry* **2023**.
37. Snider, V. G.; Hill, C. L., Functionalized reactive polymers for removal of chemical warfare agents. *Journal of Hazardous Materials* **2023**.
38. Segneanu, A.-E.; Bejenaru, L. E.; Bejenaru, C.; Blendea, A.; Mogoşanu, G. D.; Biţă, A.; Boia, E. R., Advancements in Hydrogels: A Comprehensive Review of Natural and Synthetic Innovations for Biomedical Applications. *Polymers* **2025,** *17* (15), 2026.
39. Gao, M.; Yang, J.; Zhang, Y.; Gao, M.; Zhang, M.; Wang, X.; Xu, L.; Wang, Z.; Shen, B., Adsorption of chemical warfare agents and their simulants by metal-organic frameworks: GCMC and DFT studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2025,** *13* (3), 116628.
40. Dwivedi, R.; Singh, A. K.; Dhillon, A., pH-responsive drug release from dependal-M loaded polyacrylamide hydrogels. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* **2017,** *2* (1), 45-50.
41. Durán-Egido, V.; García-Giménez, D.; Martínez-López, J. C.; Pérez-Vidal, L.; Carretero-González, J., Metal–Organic Frameworks as Fillers in Porous Organic Polymer-Based Hybrid Materials: Innovations in Composition, Processing, and Applications. *Polymers* **2025,** *17* (14), 1941.
42. DeFalco, A. P., Chemical warfare agents and delivery systems. In *Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition)*, Wexler, P., Ed. Academic Press: Oxford, 2024; pp 761-768.
43. Esposito, R.; Musteata, V.; Chisca, S.; Nunes, S. P., Rheology of Polytriazole/ZIF-8 Solutions and Dynamics of Mixed-Matrix Composite Films. *ACS Applied Polymer Materials* **2021,** *3* (12), 6045-6055.

44. Feng, K.; Zhang, J. A.; Shen, W. T.; Leng, T.; Zhou, Z.; Yu, Y., Recent Development of Nanoparticle Platforms for Organophosphate Nerve Agent Detoxification. *Langmuir* **2025,** *41* (4), 2124-2140.
45. Toader, G.; Diacon, A.; Rotariu, T.; Alexandru, M.; Rusen, E.; Ginghină, R. E.; Alexe, F.; Oncioiu, R.; Zorila, F. L.; Podaru, A.; Moldovan, A. E.; Pulpea, D.; Gavrilă, A. M.; Iordache, T. V.; Șomoghi, R., Eco–Friendly Peelable Active Nanocomposite Films Designed for Biological and Chemical Warfare Agents Decontamination. *Polymers* **2021,** *13* (22), 3999.
46. Toader, G.; Ginghina, R.-E.; Bratu, A. E.; Podaru, A. I.; Pulpea, D.; Rotariu, T.; Gavrilă, A. M.; Diacon, A., Ionic Crosslinked Hydrogel Films for Immediate Decontamination of Chemical Warfare Agents. *Gels* **2024,** *10* (7), 428.
47. Olteanu, G.; Neacșu, S. M.; Joița, F. A.; Musuc, A. M.; Lupu, E. C.; Ioniță-Mîndrican, C. B.; Lupuliasa, D.; Mititelu, M., Advancements in Regenerative Hydrogels in Skin Wound Treatment: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* **2024,** *25* (7).
48. Peppas, N. A.; Hoffman, A. S., 1.3.2E - Hydrogels. In *Biomaterials Science (Fourth Edition)*, Wagner, W. R.; Sakiyama-Elbert, S. E.; Zhang, G.; Yaszemski, M. J., Eds. Academic Press: 2020; pp 153-166.
49. Rafieian, S.; Mirzadeh, H.; Mahdavi, H.; Masoumi, M. E., A review on nanocomposite hydrogels and their biomedical applications. *Science and Engineering of Composite Materials* **2019,** *26* (1), 154-174.