

ANA MARGARIDA OLEIRO NUNES

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

AVALIAÇÃO DA TEMOZOLOMIDA COMO AGENTE RADIOSENSIBILIZADOR EM ESTUDOS DE INTERAÇÃO DE ELETRÕES DE BAIXA ENERGIA

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
Janeiro, 2021



AVALIAÇÃO DA TEMOZOLOMIDA COMO AGENTE RADIOSENSIBILIZADOR EM ESTUDOS DE INTERAÇÃO DE ELETRÕES DE BAIXA ENERGIA

ANA MARGARIDA OLEIRO NUNES

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Orientadora: Doutora Mónica Filipa dos Santos Mendes
Professora Auxiliar Convidada, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

Coorientador: Professor Doutor Filipe Ferreira da Silva
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

- Presidente:** Doutora Célia Maria Reis Henriques, Professora Associada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa
- Arguente:** Doutor Mauro António Moreira Guerra, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa
- Orientador:** Doutora Mónica Filipa dos Santos Mendes, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

Avaliação da temozolomida como agente radiosensibilizador em estudos de interação de eletrões de baixa energia

Copyright © Ana Margarida Oleiro Nunes, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

"Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara"

José Saramago

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Mónica, pela paciência e compreensão, bem como por toda a partilha de conhecimentos ao longo desta jornada. Agradeço também ao Professor Filipe pela coorientação e valiosos conselhos disponibilizados.

Não poderia deixar de agradecer a todos aqueles com quem tive a oportunidade de partilhar o laboratório, Rodrigo, João Ameixa, João Silva, Sarvesh e Professor Paulo Limão-Vieira.

Um obrigada do tamanho do mundo ao meu João, por seres o meu apoio em todas as horas, por teres sempre a palavra certa e por me inspirares todos os dias a ser melhor. Que sorte a minha poder ser tua namorada!

Obrigada aos melhores amigos que podia ter, Henrique, André, Bruno, Alex "o melhor padrinho" e um especial obrigada ao meu amigo Carlos, que nunca me deixa sozinha numa aventura. A ti, Inês, obrigada por estares sempre ao meu lado e seres a melhor amiga e madrinha que a vida me deu.

Agradeço também à família que o João me deu, a minha "família emprestada", que me acarinharam da forma mais especial que poderia pedir e um obrigada ainda maior à Paula, Zé e Dona Carma, por terem sempre um lugar para mim.

Por fim, obrigada aos meus pais, avós e irmão por torcerem por mim incansavelmente ao longo destes anos. Sem eles nada seria possível!

RESUMO

O cancro representa maior a causa de morte no mundo e, tanto a incidência como a taxa de mortalidade têm vindo a crescer rapidamente. Uma grande parte dos doentes são tratados com recurso a radiação ionizante, mas sabe-se também que tumores agressivos apresentam ainda muita resistência aos tratamentos, nomeadamente aos tratamentos de radioterapia. Consequentemente, o uso de agentes radiosensibilizadores tem despertado o interesse da comunidade científica e médica.

Com este trabalho pretende-se estudar os mecanismos físicos e químicos que são desencadeados após a interação dos eletrões de baixa energia com o radiosensibilizador temozolomida. Os estudos foram desenvolvidos usando um dos metabolitos finais da cadeia de ação da temozolomida, a molécula 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC). Os trabalhos foram realizados com recurso a um equipamento de feixes cruzados de colisões eletrão-molécula, composto por um monocromador trocoidal de eletrões acoplado a um espectrómetro de massa tipo tempo-de-voo refletor. Foi possível estudar em fase gasosa, os canais dissociativos para a formação de iões negativos e positivos da molécula AIC em diferentes gamas de energia de eletrões (0-100 eV). Através deste estudo foi possível obter o padrão de fragmentação da molécula AIC a 70 eV, e determinar a energia de ionização experimental (8.17 ± 0.02 eV). Verificou-se a formação do anião pai ($C_4H_6N_4O^-$) com duas ressonâncias a 0 e 0.7 eV. Estes resultados sugerem que o papel radiosensibilizador da temozolomida pode estar associado à ação do seu metabolito AIC após a interação com a radiação.

Palavras chave: Cancro, Radiosensibilizador, Eletrões de baixa energia, Temozolomida, 5-aminoimidazol-4-carboxamida, Captura eletrónica dissociativa, Ionização

ABSTRACT

Cancer represents a major cause of death in the world, and both incidence and mortality rate have been growing rapidly worldwide. A large proportion of patients are treated with ionizing radiation, but it is also known that aggressive tumors are still very resistant to treatments, particularly radiotherapy. Consequently, the use of radiosensitizing agents has aroused the interest of the scientific and medical community.

With this work we intend to study and understand the physical and chemical mechanisms that are triggered after the interaction of low energy electrons with the radiosensitizer temozolomide. In the present thesis, the studies were developed using one of the final metabolites of the action chain of temozolomide, the molecule 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC). The work was carried out using a crossed beam electron-molecule collision setup, composed of a trochoidal electron monochromator coupled to a time-of-flight reflectron mass spectrometer. It was possible to study the dissociative channels for the formation of negative and positive ions of the AIC molecule in different electron energy ranges (0-100 eV) in the gas phase. Through this study it was possible to obtain the fragmentation pattern of the AIC molecule at 70 eV, and determine the experimental ionization energy (8.17 ± 0.02 eV). The formation of the parent anion ($C_4H_6N_4O^-$) was observed with two resonances at 0 and 0.7 eV. These results suggest that the radiosensitizing role of temozolomide may be associated with the action of its metabolite AIC after interaction with radiation.

Keywords: Cancer, Radiosensitizer, Low energy electrons, Temozolomide, 5-aminoimidazole-4-carboxamide, Dissociative electron attachment, Ionization

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Motivação	1
1.2	Organização da dissertação	3
2	CONCEITOS TEÓRICOS.....	5
2.1	Cancro	5
2.1.1	Tratamentos.....	6
2.2	Efeitos Biológicos da Radiação	7
2.3	Interação de eletrões de baixa energia com o meio biológico	11
2.3.1	Captura eletrónica dissociativa (CED).....	12
2.3.2	Ionização	14
2.4	Radiosensibilizadores	16
2.4.1	Temozolomida e AIC	18
2.5	Estado da arte.....	20
2.5.1	Estudos de impacto de eletrões em radiosensibilizadores.....	20
2.5.2	Temozolomida	22
3	EQUIPAMENTO EXPERIMENTAL	25
3.1	TEM.....	27
3.2	ToF-Ref.....	28
3.3	Sistema de vácuo	29

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1	AIC – Caracterização da molécula	31
4.2	Formação de iões positivos por processos de ionização em impacto eletrónico.....	32
4.2.1	Moléculas de calibração	33
4.2.2	AIC	36
4.3	Formação de iões negativos em colisões com eletrões de baixa energia	44
4.3.1	Calibração em energia	44
4.3.2	AIC	46
5	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	51
5.1	Conclusões.....	51
5.2	Trabalho Futuro	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Taxas de incidência de novos casos de cancro a nível mundial em 2020, para ambos os sexos e todas as idades. Imagem adaptada da referência [1].	6
Figura 2.2 - Classificação dos efeitos da radiação em função da dose de radiação. Imagem adaptada da referência [23].	8
Figura 2.3 - Estágios dos efeitos da radiação na matéria. Imagem adaptada das referências [24],[25].	9
Figura 2.4 - Esquema dos efeitos diretos e indiretos da interação da radiação ionizante. Imagem adaptada da referência [31].	11
Figura 2.5 - Diagrama de energia potencial para a molécula MX. Estão representadas as curvas de energia potencial para a molécula neutra (MX), para o ião pai (MX^+) e para o ITN (MX^{*+}). A seta vertical espessa representa o processo de transição dentro da região Franck-Condon, assinalada pela área sombreada. À direita: a área sombreada escura assinala a secção eficaz do processo de CED. Imagem adaptada da referência [38].	14
Figura 2.6 - Secção eficaz total de ionização de diferentes compostos aromáticos. Imagem adaptada da referência [39].	15
Figura 2.7 - Estrutura química TMZ [46].	18
Figura 2.8 - Cadeia de hidrolisação da TMZ para MTIC e os seus metabolitos AIC e ião metildiazónio. Imagem adaptada da referência [52].	18
Figura 2.9 - Mecanismo de ação da molécula TMZ. Imagem adaptada da referência [51].	19
Figura 3.1 - Equipamento experimental. A) Esquemático do equipamento experimental: monocromador trocoidal de eletrões acoplado ao espectrómetro de massa; (B) Esquema amplificado do monocromador trocoidal de eletrões [57].	26
Figura 3.2 - Equipamento experimental. Câmaras de alto vácuo.	26
Figura 3.3 - Equipamento Experimental. Forno de sublimação molecular.	27

Figura 3.4 - Representação esquemática do funcionamento do refletor. Os círculos coloridos representam dois fragmentos aniônicos da mesma espécie e com a mesma massa, formados com diferentes energias cinéticas iniciais. Os potenciais repulsivos aplicados através dos defletores retardam os aniões e focam-nos para chegar ao detetor ao mesmo tempo, aumentando a resolução de massa. As setas negras são representativas da velocidade relativa de cada fragmento ao longo da trajetória. Imagem adaptada da referência [60].	29
Figura 3.5 - Esquema do sistema de vácuo. 1-Câmara TOF; 2-Câmara TEM; 3-Manómetro Penning; 4-Válvula; 5-Bomba Turbomolecular; 6-Bomba Membrana; 7-Bomba Rotatória; 8-Manómetro Pirani; 9-Manómetro cabeça mista.	30
Figura 4.1 - Estrutura química AIC.	31
Figura 4.2 - Espectro de massa de ionização de interação de eletrões acelerados a 70 eV com SF ₆ .	33
Figura 4.3 - Energia de aparecimento do ião Ar ⁺ .	35
Figura 4.4 - Espectro de massa de ionização de interação de eletrões acelerados a 70 eV com AIC.	36
Figura 4.5 - Energia de aparecimento do ião 126 m/z (C ₄ H ₆ N ₄ O ⁺ /ião pai). Calibração feita com Árgon.	38
Figura 4.6 - Energia de aparecimento do ião 28 m/z (N ₂ ⁺ ; CH ₂ N ⁺). Calibração feita com Árgon.	40
Figura 4.7 - Energia de aparecimento do ião 44 m/z (CH ₂ NO ⁺). Calibração feita com Árgon.	40
Figura 4.8 - Energia de aparecimento do ião 54 m/z (C ₂ H ₂ N ₂ ⁺). Calibração feita com Árgon.	41
Figura 4.9 - Energia de aparecimento do ião 71 m/z (C ₃ H ₅ NO ⁺). Calibração feita com Árgon.	41
Figura 4.10 - Energia de aparecimento do ião 110 m/z (C ₄ H ₃ N ₃ ⁺). Calibração feita com Árgon.	42
Figura 4.11 - Energia de aparecimento do ião 109 m/z (C ₄ H ₅ N ₄ ⁺). Calibração feita com Árgon.	42
Figura 4.12 - Energia de aparecimento do ião 110 m/z (C ₄ H ₄ N ₃ O ⁺ ; C ₄ H ₆ N ₄ ⁺). Calibração feita com Árgon.	43
Figura 4.13 - Secções eficazes para formação de SF ₆ ⁻ e outros fragmentos aniônicos produzidos através de CED. Imagem adaptada da referência [8].	44
Figura 4.14 - Gráfico da intensidade de SF ₆ medido por captura eletrónica dissociativa em função da energia para a massa 146, resolução em energia de 180 meV.	45

Figura 4.15 - Gráfico da intensidade de CCl_4 medido por captura eletrónica dissociativa em função da energia para a massa 35, (Cl^-), com uma resolução de 210 meV.	46
Figura 4.16 - Gráfico da intensidade de AIC medido por captura eletrónica dissociativa em função da energia para a massa 126 (ião pai/ $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}^-$).....	47
Figura 4.17 - Isómeros da molécula AIC. À esquerda o isómero 1 e à direita o isómero 2.....	48
Figura 4.18 - Gráfico da intensidade de AIC medido por captura eletrónica dissociativa em função da energia para a massa 108 ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4^-$).....	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 - Energia de aparecimento do gás de calibração Ar	35
Tabela 4.2 - Identificação dos iões positivos formados após interação de eletrões com a molécula AIC a 70 eV.....	37
Tabela 4.3 - Intensidades relativas dos iões formados por interação de eletrões acelerados a 70 eV com AIC.....	37
Tabela 4.4 - Energias de Aparecimento experimentais.....	43

SIGLAS

4NI	4-nitroimidazol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIC	5-aminoimidazol-4-carboxamida
BDE	Energia de dissociação da ligação (do inglês <i>bond dissociation energy</i>)
CED	Captura eletrónica dissociativa
EBE	Elétrões de baixa energia
EI	Energia de ionização
EUA	Estados Unidos da América
ITN	lão transiente negativo
MCP	Do inglês <i>Microchannel plate</i>
MTIC	5-(3-Metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OMS	Organização Mundial de Saúde
TEM	Monocromador trocoidal de elétrões (do inglês <i>trochoidal electron mono-chromator</i>)
TMZ	Temozolomida
ToF-Ref	Espectrómetro de massa tipo tempo-de-voo refletor
VFR	Do inglês <i>Vibrational feshback resonance</i>

INTRODUÇÃO

Neste capítulo é introduzida uma contextualização do trabalho desenvolvido, bem como a motivação e objetivos. Por fim, é descrita de forma sumária a organização da dissertação.

1.1 Motivação

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) [1], estima-se que em 2040 existam 30,2 milhões casos de cancro a nível mundial, um aumento de aproximadamente 36% relativamente a 2020. Em Portugal, a incidência de novos casos de cancro tem aumentado cerca de 3% por ano [2]. Os dados mais recentes divulgados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) [3], indicam uma incidência de 492 por 100 mil habitantes, ultrapassando os 50 mil novos casos, em 2018. Esta previsão impulsiona a constante procura de novos tratamentos e a melhoria dos já existentes.

De acordo com o Comité BEIR VII da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América (EUA) [4], aproximadamente 50% dos doentes com cancro são tratados com radiação ionizante. Por outro lado, tumores agressivos apresentam ainda muita resistência aos tratamentos, nomeadamente, aos tratamentos de radioterapia [4],[5]. Deste modo, estudos com radiosensibilizadores têm despertado o interesse da comunidade científica e médica, uma vez que o seu uso permite uma melhoria significativa dos tratamentos com radiação. A utilização do radiosensibilizador como agente quimioterapêutico em quimioradioterapia, tratamento combinado de quimioterapia e radioterapia, torna as células tumorais mais sensíveis à radiação, potenciando assim os resultados da radioterapia [1].

Na radioterapia, partículas de alta energia são depositadas aquando da interação da radiação ionizante com o meio biológico. Uma grande porção da energia é canalizada para a libertação de elétrões secundários com distribuição de energia cinética inferior a 20 eV, elétrões de baixa energia (EBE) [6]. Após a sua formação, os EBE perdem energia cinética

através de uma série de colisões inelásticas com o meio envolvente, antes de atingirem um estado de solvatação e se tornarem quimicamente inativos [6].

Os EBE desempenham um papel fundamental no dano ao nível dos constituintes macromoleculares das células, sendo capazes de induzir quebras nas ligações simples e duplas da cadeia da molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) [7]. Atualmente, propõe-se que o mecanismo associado ao dano do ADN é iniciado com a ligação de um EBE a uma das bases da molécula, através de um processo ressonante que leva à formação de um ião transiente negativo (ITN) com um tempo de vida $\sim 10^{-16}$ segundos [8]. O ITN é muito instável, e consequentemente, pode decair levando à dissociação, com quebra das ligações entre os átomos, o que resulta na formação de um ião negativo e, uma ou mais espécies neutras. Este processo é conhecido como captura eletrónica dissociativa (CED) [9].

Recentemente, o fármaco temozolomida (TMZ) tem sido alvo de estudo em tratamentos de quimiorradioterapia para doenças oncológicas. Os ensaios clínicos têm revelado um aumento na taxa de sobrevivência em doentes com gliomas devido à capacidade da TMZ em maximizar os efeitos da radiação [10],[11],[12]. Partindo do interesse científico desta molécula e, da previsão do aumento dos casos de cancro nos próximos 20 anos, constrói-se a motivação para o presente tema de tese.

O tema “Interação de eletrões de baixa energia com radiosensibilizador temozolomida” surge da necessidade de compreender quais os mecanismos físicos e químicos desencadeados pela interação dos EBE com o radiosensibilizador TMZ. E, deste modo, perceber de que forma os EBE contribuem para o efeito radiosensibilizador da TMZ em tratamentos de radioterapia.

Deste modo, o objetivo principal desta tese é o estudo de processos de captura eletrónica dissociativa e de ionização dissociativa da molécula 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC), um dos metabolitos finais da cadeia de ação da TMZ no organismo humano. O trabalho experimental será realizado num equipamento de feixes cruzados de colisões eletrão-molécula, composto por um monocromador trocoidal de eletrões (TEM) acoplado a um espectrómetro de massa tipo tempo-de-voo refletor (ToF-Ref). Através deste sistema experimental, foram analisados os canais dissociativos em fase gasosa para a formação de iões negativos da molécula AIC numa gama de energia de 0 a 12 eV, e a formação de iões positivos entre 11 e

100 eV. Desta forma, é possível caracterizar a molécula em estudo, e aferir sobre o seu carácter como agente radiosensibilizador.

1.2 Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se subdivida em cinco capítulos: Introdução, Conceitos Teóricos, Equipamento Experimental, Resultados e Discussão, Conclusões e Recomendações.

No capítulo de Conceitos Teóricos (capítulo 2) são descritos os conceitos teóricos necessários para a integração do leitor na temática do estudo. É também introduzida uma pequena contextualização de estudos de impacto de elétrões em radiosensibilizadores já realizados por diferentes autores, bem como um resumo de ensaios clínicos com TMZ.

No terceiro capítulo é feita uma breve descrição do equipamento experimental que foi utilizado ao longo do trabalho.

No capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos, suportados por cálculo teórico, bem como as condições experimentais em que os mesmos foram alcançados.

No último capítulo, Conclusões e Recomendações, são descritas as conclusões retiradas através do presente estudo e apresentadas hipótese de continuação do mesmo.

CONCEITOS TEÓRICOS

No presente capítulo serão apresentadas as principais temáticas ao longo deste documento: o cancro e respetivos tratamentos, os efeitos biológicos da radiação, a interação de elétrons de baixa energia (EBE) com o meio biológico e os radiosensibilizadores. É também feito um enquadramento do estado da arte.

2.1 Cancro

Cancro pode ser definido como um conjunto de doenças, podendo ter origem em qualquer órgão ou tecido do corpo humano, caracterizado pelo crescimento anormal de células que sofreram uma ou mais mutações (células tumorais) [1]. As células tumorais podem migrar para diferentes partes do organismo humano através da corrente sanguínea ou da linfa num processo denominado metástase. Estas células proliferam rapidamente no organismo e consomem nutrientes e oxigénio em competição com as células saudáveis, sendo mais difíceis de controlar, e por isso, conduzindo à morte [1],[13].

Tanto a incidência como a taxa de mortalidade devido a doenças cancerígenas têm vindo a crescer rapidamente em todo o mundo, sendo que o cancro representa a maior causa de morte todo o mundo [14]. Na Figura 2.1 está representada a taxa de incidência de cancro por 100 000 habitantes, a nível mundial.

A probabilidade de desenvolver cancro pode estar associada tanto a fatores genéticos, como a fatores externos ou até mesmo uma combinação de ambos. Os fatores externos podem ser divididos em três tipos de carcinogénicos: físicos, onde se inclui a radiação ultravioleta e ionizante; químicos, como por exemplo o fumo de tabaco e contaminação de água e comida; e por fim os biológicos, tais como infeções de certos vírus, bactérias ou parasitas. É também

relevante referir que a taxa de incidência aumenta com a idade, uma vez que os riscos para cancros específicos aumentam com a idade, e também porque os mecanismos de reparação celular tendem a ser menos eficazes com o avançar da idade [1],[15].

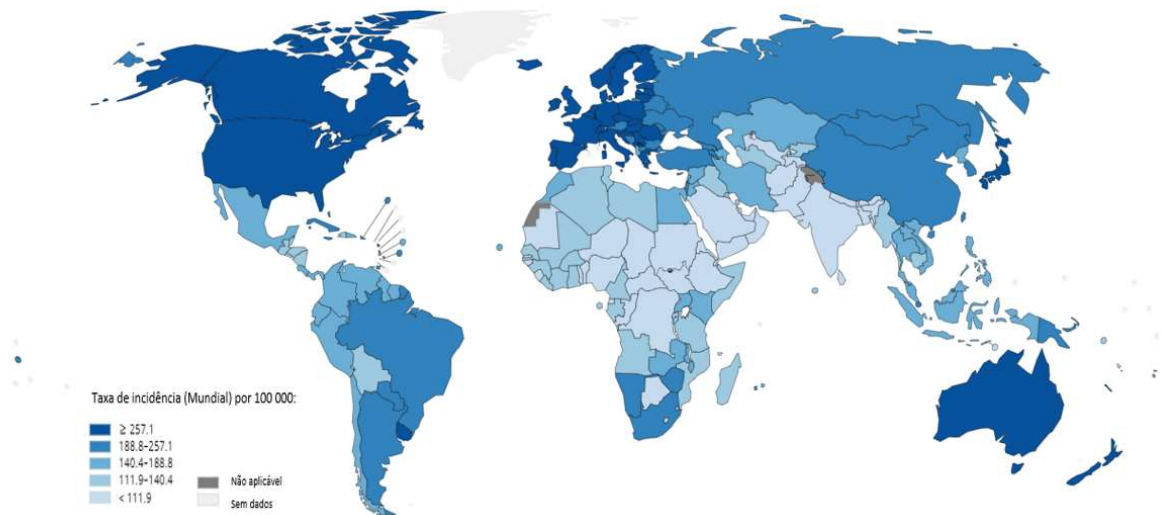


Figura 2.1 - Taxas de incidência de novos casos de cancro a nível mundial em 2020, para ambos os sexos e todas as idades. Imagem adaptada da referência [1].

2.1.1 Tratamentos

Atualmente, o tratamento do cancro inclui diferentes tipos de terapêuticas, tais como hormonoterapia, imunoterapia, terapêutica-alvo, quimioterapia, cirurgia e radioterapia, sendo que as três últimas são as terapias oncológicas mais utilizadas. A escolha do tratamento varia de caso para caso, sendo uma decisão que se baseia em diversos fatores, entre os quais o tamanho, tipo e localização do tumor, idade do doente, estado de saúde e, existência ou não de metastização [16]. Independentemente do tipo de tratamento, o objetivo principal de todas as terapêuticas é destruir e impedir a proliferação de células cancerígenas.

A cirurgia é o tratamento oncológicos mais comum, na qual se remove, total ou parcialmente, o tumor. O segundo tratamento mais utilizado é a radioterapia, onde se faz uso da radiação para destruição das células cancerígenas, podendo a radiação ser aplicada externamente ao paciente (radioterapia externa) ou através de pequenos implantes com material radioativo (radioterapia interna ou braquiterapia). A quimioterapia faz também parte das terapêuticas às quais mais se recorre para o tratamento do cancro e consiste na administração de fármacos que têm como objetivo a destruição das células cancerígenas [11],[12].

Por vezes, são necessárias diferentes estratégias para melhorar a terapia e o seu resultado final, podendo passar pela combinação da quimioterapia com radioterapia. Ao

tratamento combinado dá-se o nome de quimiorradioterapia, onde se faz uso de agentes quimioterapêuticos (radiosensibilizadores) para a sensibilização das células tumorais à radiação [18]. Vários ensaios clínicos e estudos científicos têm demonstrado a eficácia desta terapêutica, levando a um aumento da taxa de sobrevivência em pacientes que recebem este tipo de tratamento [10],[11],[12].

2.2 Efeitos Biológicos da Radiação

O ser humano é exposto, ao longo da sua vida, a uma constante dose de radiação eletromagnética, quer devido à presença de radioatividade natural, mas também a radiação de origem artificial. Desta última são exemplos os tratamentos e métodos de diagnóstico médico, testes nucleares, guerras, produção de energia nuclear, e acidentes nucleares, tais como Fukushima e Chernobyl [9]. As fontes de radiação naturais são diversas e podem ser provenientes de radiação cósmica, sol, minerais e materiais do solo, ou até mesmo de comida, como é o caso do potássio-40 presente nas bananas [6],[14]. Apesar de poder ser utilizada para benefício do ser humano, a radiação pode apresentar efeitos negativos na saúde, mesmo quando as doses utilizadas são reduzidas [20].

Os efeitos causados pela radiação no corpo humano podem levar a dois tipos diferentes de danos, sendo eles classificados como determinísticos e estocásticos [21]. No caso dos efeitos determinísticos, abaixo de um limiar de dose, a quantidade de células afetadas não é suficiente para que a função dos órgãos seja comprometida e consequentemente não existirão efeitos visíveis. No entanto, se o limiar for ultrapassado, será possível observar efeitos, e a sua severidade aumenta rapidamente com o aumento da dose [16],[17]. No segundo caso, efeitos estocásticos, a alteração de apenas uma célula pode resultar em cancro, ou até mesmo em danos transmitidos geneticamente a gerações seguintes (efeito hereditário) se o dano ocorrer numa célula reprodutiva [21]. Para estes efeitos, embora a probabilidade de resultarem em cancro aumentar de forma linear com a dose de radiação a que o indivíduo é sujeito, a sua gravidade é independente da dose de radiação [22].

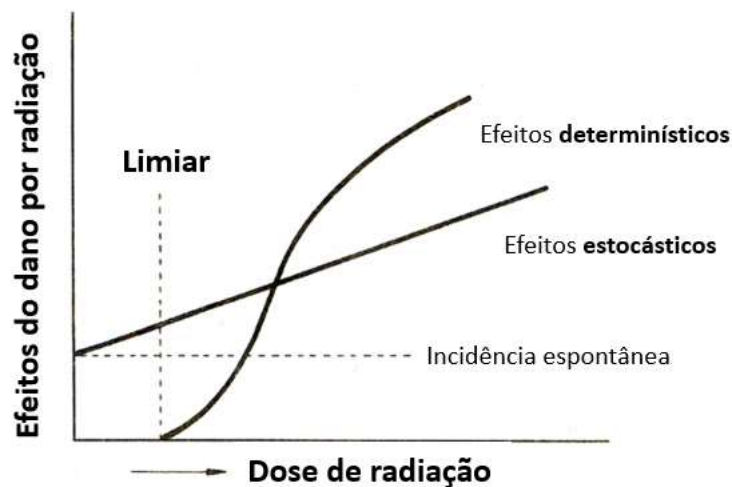


Figura 2.2 - Classificação dos efeitos da radiação em função da dose de radiação. Imagem adaptada da referência [23].

No gráfico presente na Figura 2.2 encontra-se representada a relação, para os dois tipos de efeitos, entre a dose a que o indivíduo é exposto e os efeitos que surgem do dano celular provocado pela radiação. É possível concluir que os efeitos estocásticos por vezes manifestam-se espontaneamente, e que apresentam uma resposta linear em relação à quantidade de radiação. No que diz respeito aos efeitos determinísticos, verifica-se a existência do limiar de dose, tal como referido anteriormente [23].

Os processos físicos e químicos, ao nível molecular, resultantes da interação da radiação envolvidos no dano do tecido biológico, têm representado um grande tópico de investigação para comunidade científica [9]. Quando o tecido biológico absorve radiação desencadeiam-se processos de excitação e ionização nos átomos e moléculas que o compõem. A excitação eletrónica é definida pela transição de um eletrão, num átomo ou molécula, para um nível de energia superior sem que exista a libertação de um eletrão. Enquanto o processo de ionização acontece quando a energia absorvida pela interação da radiação é suficiente para provocar a libertação de um ou mais eletrões da orbital do átomo ou molécula, sendo esta radiação designada por radiação ionizante [22]. A exposição de tecido biológico à radiação ionizante, como é o caso de raios-X, partículas α , prótons, iões e eletrões, pode causar danos celulares que são resultado de uma sequência de mecanismos desencadeados desde o instante inicial da exposição à radiação [9].

Na Figura 2.3 estão apresentados de forma esquemática os estágios dos danos biológicos causados pela irradiação da matéria biológica desde o primeiro contacto. Nos primeiros

instantes, na ordem dos 10^{-15} - 10^{-12} s, são desencadeados os processos físicos e físico-químicos, tais como a formação de radicais livres, ionização e excitação eletrônica, que podem levar a danos nas biomoléculas, como por exemplo o ADN. Como consequência, ocorrem processos ao nível biológico que, a longo prazo, podem levar à morte celular, ao desenvolvimento de cancros e/ou mutações [9].

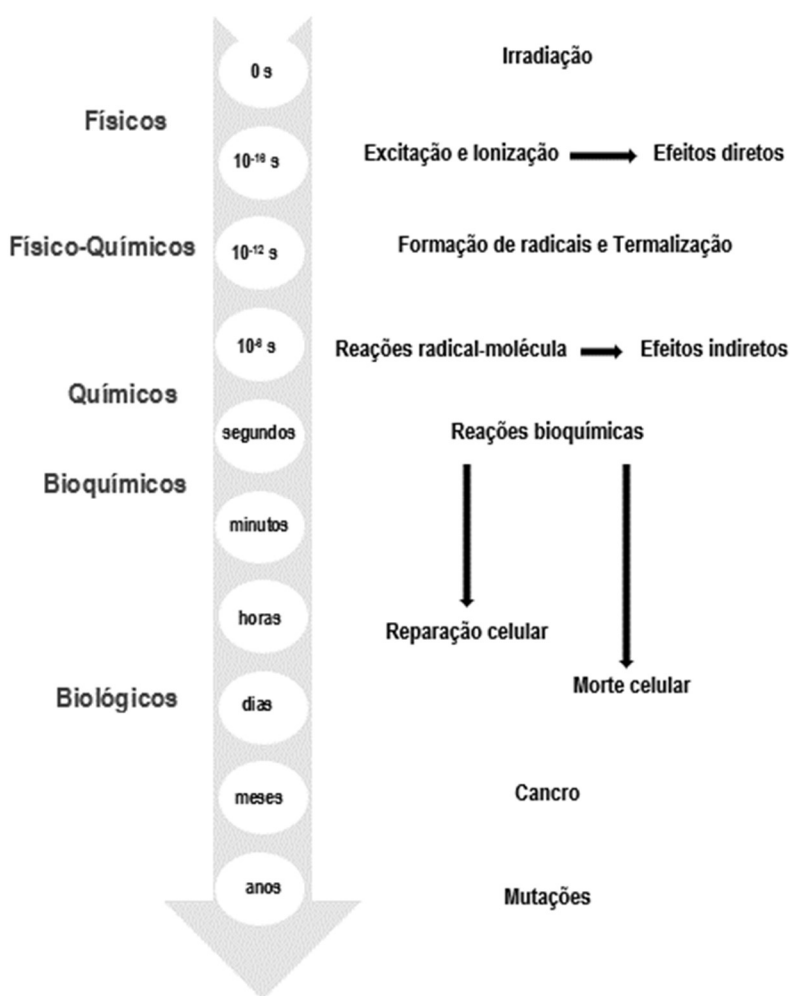


Figura 2.3 - Estágios dos efeitos da radiação na matéria. Imagem adaptada das referências [24],[25].

A interação da radiação com o meio biológico pode ser utilizada para benefício médico, como é o caso dos tratamentos de cancro, uma vez que as interações desencadeadas a nível celular podem culminar em apoptose celular. Este tipo de tratamento com recurso a radiação, tem como finalidade a destruição local das células tumorais, evitando ao máximo danificar os tecidos saudáveis que envolvem o tumor. Contudo, apesar da evolução científica e tecnológica que se tem observado nos últimos anos, o tecido saudável acaba também por ser parcialmente

danificado. O crescente e melhor conhecimento da interação da radiação com a matéria, contribui para a diminuição e melhoria do rácio de tecido tumoral e tecido saudável danificado nos tratamentos de cancro com radiação [8],[25].

A relação que existe entre o aparecimentos de novos casos de cancro e a dose de radiação absorvida nos órgãos, foi comprovada através de estudos epidemiológicos realizados com sobreviventes das bombas atómicas de Hiroshima e Nakasaki [27]. As consequências da exposição a altas doses de radiação a longo prazo, foram estudadas também através da relação de outros desastres nucleares, Chernobyl e Fukushima, com o aparecimento de doenças oncológicas [28].

As lesões mais frequentes e também mais letais que acontecem ao nível celular, perturbando ou parando a função celular, são aquelas que mais afetam o genoma humano e incluem quebras simples e duplas da cadeia de ADN. O dano pode ser causado pela interação direta da radiação com a matéria biológica, ou então por efeitos indiretos, que dizem respeito à interação da radiação com ambiente molecular que rodeia a molécula de ADN [29]. Os efeitos indiretos da interação da radiação ionizante de alta energia com o meio biológico são essencialmente causados pelas espécies secundárias que se formam ao longo do percurso da irradiação. Os EBE, espécies radioativas de oxigénio, e radicais livres resultantes da radiólise da água, enquadram-se nas espécies secundárias, onde os primeiros representam o produto mais abundante dessa interação. Sabe-se que 70% dos danos na molécula de ADN estão relacionados com os efeitos causados pelos EBE e radicais livres [7].

Os EBE podem interagir com outras moléculas presentes no ambiente biológico, tais como água e oxigénio, e gerar radicais livres (por exemplo $H^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ e $O^{\bullet}$), que por sua vez são conhecidos por serem altamente reativos e responsáveis por danificar o ADN de forma muitas vezes irreversível [30],[31]. Na Figura 2.4 encontra-se esquematizado o mecanismo de ação da radiação ionizante. No caso dos efeitos diretos, a radiação ionizante danifica diretamente o ADN, o que pode resultar em morte celular ou paragem permanente do crescimento. No caso de efeito indireto, são formados radicais livres, resultantes essencialmente da interação de EBE com moléculas de água ou oxigénio presentes no ambiente celular, que irão depois provocar dano no ADN. Existem muitos tipos de danos na molécula de ADN, tais como mudança de base, quebra simples ou dupla, ligação covalente com proteínas ou com outras moléculas de ADN [31].

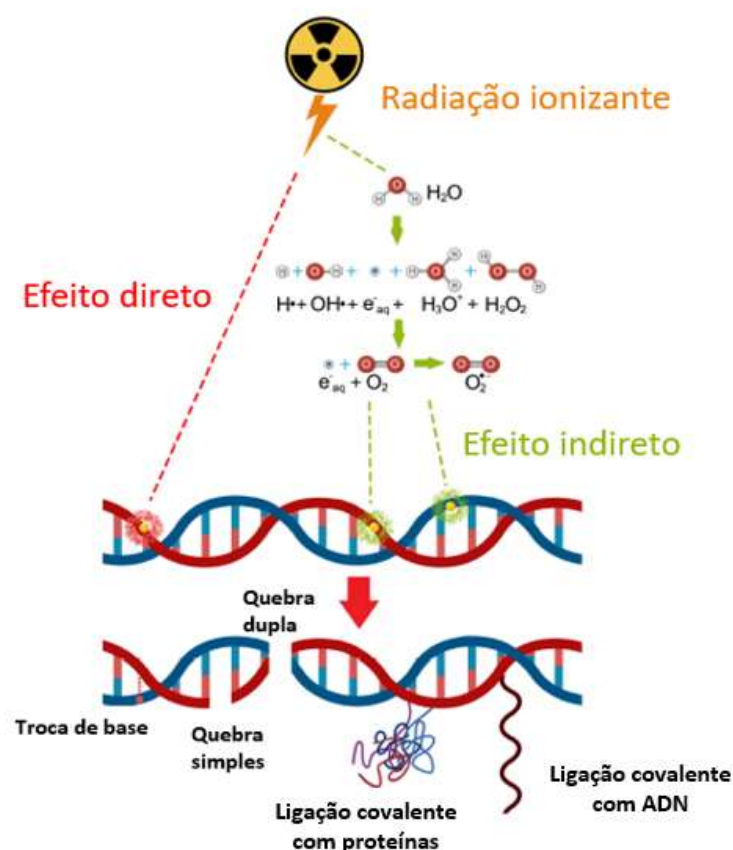


Figura 2.4 - Esquema dos efeitos diretos e indiretos da interação da radiação ionizante. Imagem adaptada da referência [31].

2.3 Interação de elétrons de baixa energia com o meio biológico

Tal como referido anteriormente, o produto mais abundante que resulta da irradiação da matéria biológica com radiação ionizante, são os EBE que possuem uma distribuição de energia de 0 a 20 eV, sendo que a maioria das energias se encontra abaixo do limiar de ionização (~10 eV) [7]. A produção de elétrons secundários é, tipicamente, de 5×10^4 elétrons por MeV de radiação primária [32].

Os elétrons secundários gerados pela interação da radiação com o meio biológico vão perdendo a sua energia cinética durante as sucessivas colisões ao longo do seu percurso de irradiação, até atingirem uma energia próxima de 0 eV (termalização). Durante um curto período de tempo, na ordem dos 10^{-12} segundos, desencadeiam diversas reações químicas e físicas no meio celular [24],[29]. Estas reações irão resultar na fragmentação de estruturas celulares fundamentais aos sistemas vivos, como é o caso das moléculas de ADN.

Boudaiffa *et al.* [7] verificaram que os EBE podem causar a quebra de ligações simples e duplas do ADN, bem como a perda da dupla hélice da molécula, para energias abaixo do limiar de ionização. Neste mesmo estudo, foi verificado que os mecanismos de dano em ADN dependem tanto da energia absorvida como da natureza da partícula que deposita energia [7]. Este estudo pioneiro, desencadeou um crescente interesse na investigação detalhada dos mecanismos ao nível atómico e molecular resultantes da interação dos EBE em diferentes tipos de compostos moleculares [29],[33],[34].

Durante a interação dos EBE com uma molécula existem diversos processos físicos que podem causar a fragmentação da molécula alvo, desde CED, excitação eletrónica e ionização.

2.3.1 Captura eletrónica dissociativa (CED)

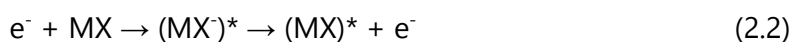
A captura de um eletrão por uma molécula é um processo ressonante onde o eletrão é capturado durante um determinado período de tempo numa orbital molecular vazia com carácter anti-ligante, levando à formação de um ITN, com um tempo de vida de aproximadamente 10^{-16} s. O ITN é termodinamicamente instável, e pode decair, libertando o excesso de energia interna, por emissão do eletrão adicional (autolibertação), ou através de fragmentação com produção de um anião, e uma ou mais espécies neutras (num processo designado por CED). Este processo é considerado ressonante, uma vez que a quantidade de energia do eletrão incidente deve ser exatamente a energia necessária para formar o ITN, ou seja, a energia da orbital. Desta forma, este processo representa uma transição eletrónica do estado contínuo ($MX + e^-$) para o estado discreto ("*quasi bound*") do anião (MX^-). Por esta razão, os termos ITN e ressonância são usados como sinónimos [35],[36],[37].

O processo de CED é responsável pela maioria dos danos causados em meio biológico e compete diretamente com o processo de autolibertação. A equação 2.1 representa o processo de CED, onde * indica que o ITN é formado num estado eletrónico excitado.



Este processo pode ocorrer a valores de energia muito baixos, podendo acontecer a energias perto de 0 eV, numa escala temporal de 10^{-14} s a 10^{-12} s, com uma probabilidade denominada de secção eficaz da CED. Esta secção eficaz pode ser consideravelmente maior do que as secções eficazes de outros processos, o que reflete a alta eficácia da dissociação induzida pelos EBE [32],[34].

No processo concorrente, autolibertação, ITN tende a perder a sua energia através da libertação do elétron adicional, e encontra-se representado na equação 2.2. Este é um processo inelástico, onde o elétron se liberta da molécula deixando-a num estado excitado (eletrónico e/ou vibracional) diferente do fundamental. [37].



O processo de CED pode ser compreendido como um cruzamento das funções de onda da molécula neutra e do estado dos ião negativo, dentro de uma gama de energia definida na região de Franck-Condon (região delimitada a cinzento na Figura 2.5), e pode ser representado num diagrama bidimensional de energia potencial (Figura 2.5) [33],[37],[38]. Na figura 2.5, o processo de CED é representado ao longo da curva de energia potencial puramente repulsiva para o estado eletronicamente excitado MX^* , levando à formação de um anião estável (X^-) e um fragmento radical neutro (M). O estado fundamental aniónico, MX^- , por outro lado, é representado como um estado ligado, com seu estado fundamental abaixo do estado fundamental da molécula neutra.

A captura do elétron numa orbital molecular vazia resulta numa quebra de ligação, se a energia de ligação do elétron (eletroafinidade) é suficientemente elevada para compensar a energia de dissociação da ligação, $D(M-X)$. Por conseguinte, a energia mínima para que ocorra CED é dada pela equação 2.3 [33],[37],[38].

$$\Delta H_0 = D(M-X) - EA(X) \quad (2.3)$$

Considerando as transições eletrónicas, é possível fazer a aproximação de que elas ocorrem sem alterações na posição dos núcleos envolvidos, preservando a geometria molecular. Esta aproximação é conhecida como a aproximação de Born-Oppenheimer.

No caso da autolibertação, esta pode ocorrer para distâncias internucleares menores que r_c , que é o ponto de cruzamento das duas curvas de energia potencial [33],[37].

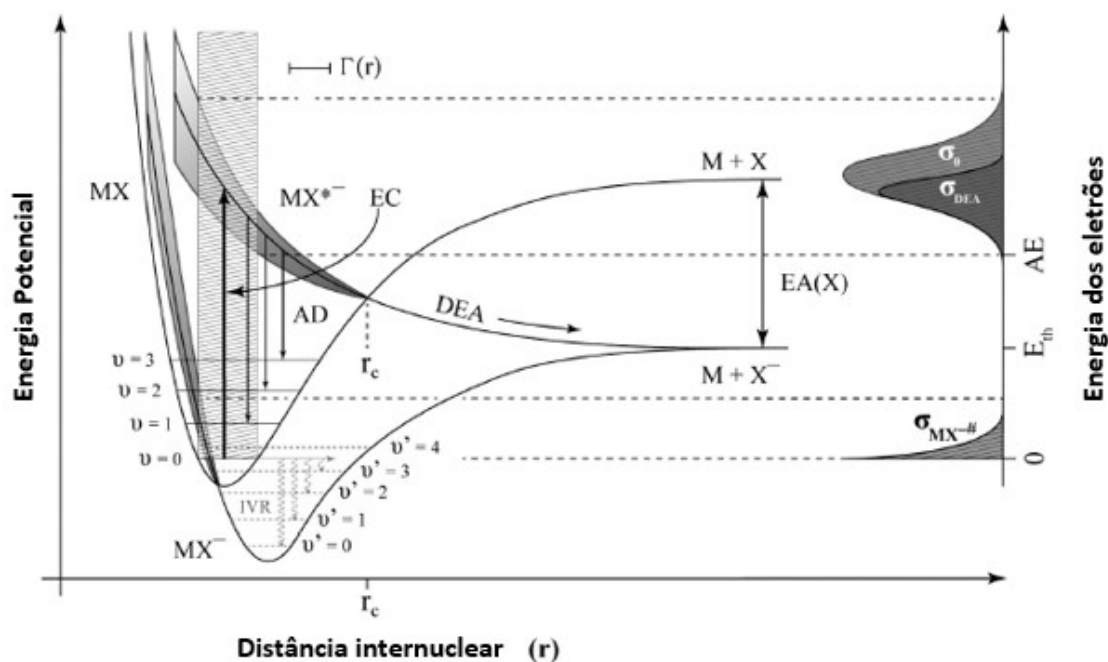
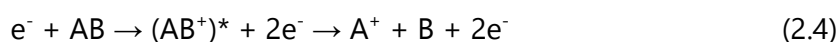


Figura 2.5 - Diagrama de energia potencial para a molécula MX. Estão representadas as curvas de energia potencial para a molécula neutra (MX), para o ião pai (MX⁻) e para o ITN (MX*⁻). A seta vertical espessa representa o processo de transição dentro da região Franck-Condon, assinalada pela área sombreada. À direita: a área sombreada escura assinala a secção eficaz do processo de CED. Imagem adaptada da referência [38].

2.3.2 Ionização

Quando a transferência de energia do eletrão incidente leva à remoção de um eletrão ligado da molécula alvo (AB), e subsequentemente, à formação de um catião (AB⁺), este processo é denominado ionização. Se a energia incidente na colisão eletrão-molécula exceder a energia de ionização da respetiva molécula, o excesso de energia irá ser transferido para a molécula, deixando assim o catião num estado vibracional excitado, que posteriormente poderá levar à sua dissociação, resultando na formação de um fragmento carregado positivamente (A⁺), e um ou mais fragmentos neutros (B) [37]. Este processo é denominado ionização dissociativa (equação 2.4) [37].



Na ionização dissociativa de uma molécula diatómica AB, o limiar de energia para que ocorra a quebra de uma ligação atómica, é geralmente dado pela soma da respetiva energia

de dissociação da ligação (D) e energia de ionização (EI) da molécula neutra. Desta forma, o limiar de energia para a formação de A^+ é dado pela equação 2.5.

$$E_{th} = D(A - B) + EI(A) \quad (2.5)$$

O limiar de energia para a ionização dissociativa está por norma ligeiramente acima da energia de ionização da molécula alvo. À medida que a energia aumenta, é possível o aparecimento de mais canais dissociativos, uma vez que o catião pai é formado com excesso de energia interna. A Figura 2.6 representa a secção eficaz total de ionização em função da energia dos elétrões para diferentes compostos moleculares, onde é possível observar um *plateau* em cerca de 70-100 eV, que vai decaindo gradualmente. Em experiências de espectrometria de massa, é usual medir o padrão de fragmentação das moléculas para identificar os diferentes compostos formados a 70 eV [39].

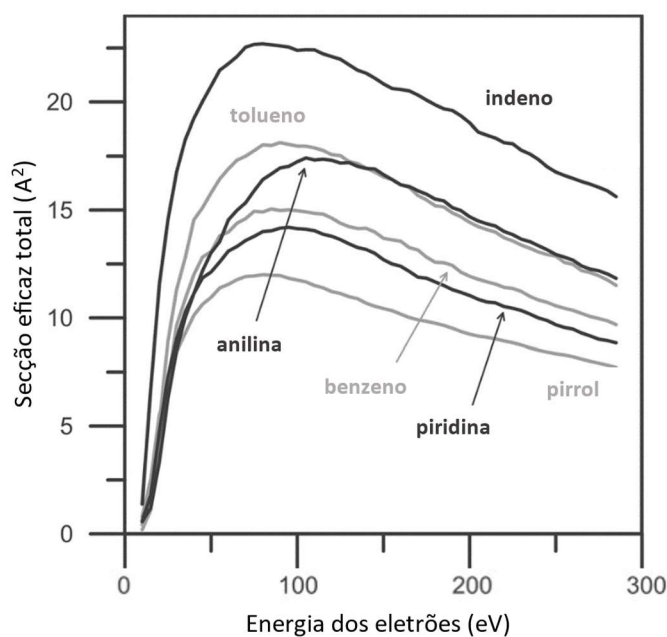


Figura 2.6 - Secção eficaz total de ionização de diferentes compostos aromáticos. Imagem adaptada da referência [39].

2.4 Radiosensibilizadores

Grande parte das doenças oncológicas recorrem ao uso da radiação numa determinada fase do tratamento. No entanto, existem tumores sólidos que apresentam muita resistência ao tratamento de radioterapia, causada por células estaminais tumorais, heterogeneidade do tumor, angiogénese e vasculogénese, alterações metabólicas e outras complicações [40]. Consequentemente, existe necessidade na prática clínica de potencializar o efeito da radiação em tecidos tumorais. Isto pode ser alcançado pelo uso de agentes químicos (designados por radiosensibilizadores) que aumentam o dano causado pela radiação no tecido tumoral. Mesmo que a radioterapia concentre a radiação na massa tumoral, a dose que pode ser administrada ainda é limitada, uma vez que as células do tecido normal circundante também são afetadas pela radiação. Logo, qualquer que seja o radiosensibilizador, este deve ser mais eficaz nas células tumorais [41].

Os radiosensibilizadores podem ser definidos como agentes químicos utilizados para potenciar e aumentar a resposta celular à radiação, promovendo quer os efeitos diretos, quer os efeitos indiretos [41]. Na maioria dos casos, a terapia combinada de radiação e compostos radiosensibilizadores (quimioradioterapia) tem menos efeitos nos tecidos normais quando comparada com o tratamento de radioterapia. Atualmente, têm sido exploradas diferentes estratégias para desenvolver radiosensibilizadores altamente eficazes e com baixa toxicidade [31].

A eficácia de um radiosensibilizador é medida através do rácio entre a dose de irradiação para um determinado efeito biológico na ausência do sensibilizador e a dose de irradiação para alcançar o mesmo efeito na presença do sensibilizador, traduzindo-se na equação 2.5 [42].

$$\text{Eficácia} = \frac{\text{Dose de irradiação para um determinado efeito biológico na ausência do sensibilizador}}{\text{Dose de irradiação para alcançar o mesmo efeito na presença do sensibilizador}} \quad (2.5)$$

Dentro da etapa físico-química de dano por radiação (Figura 2.3), os radiosensibilizadores podem ser ativados por EBE libertados devido à irradiação do meio biológico. Apesar do modo exato de ação da radiosensibilização a nível molecular ainda não estar completamente esclarecido, a sinergia observada entre a radiação e o radiosensibilizador pode ser atribuída às reações conduzidas pelos EBE, especialmente através de CED [25].

Os tumores sólidos podem conter áreas deficientes em oxigênio, também designados por tumores hipóxicos, sendo que a existência destas células podem tornar o tumor resistente à radiação [43]. A hipóxia está diretamente relacionada com a agressividade tumoral e também à resistência aos tratamentos [44]. Este tipo de tumores está, por isso associado à resistência à radioterapia, tornando-a menos eficiente visto que a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres após a interação com EBE é muito diminuta, e também a tipos de quimioterapia que são baseados na geração de espécies oxidante [45]. No caso dos tumores que crescem em ambientes hipóxicos, os radiosensibilizadores podem desempenhar um papel fundamental semelhante ao oxigênio, e, portanto, o seu uso pode aumentar a sensibilidade para a radioterapia [45].

Os radiosensibilizadores podem ser divididos em diferentes categorias dependendo do seu mecanismo de ação. Podem atuar como sensibilizadores de células hipóxicas, aumentando a sensibilidade à radiação das células tumorais deficientes em oxigênio, e por consequência induzir a formação e estabilização de radicais tóxicos do ADN, mimetizando o efeito do oxigênio, onde se inclui por exemplo o nimorazol [18],[46]. A radiosensibilização pode também atuar levando à apoptose seletivamente das células hipóxicas, que são geralmente mais resistentes à radiação, sendo estes radiosensibilizadores incluídos na categoria de citotoxinas hipóxicas, que parte o radiosensibilizador tirapazamina. Existem também radiosensibilizadores não hipóxicos, por exemplo as piridinas halogenadas, que funcionam como análogos de base de ADN, incorporando-se no ADN recentemente sintetizado, e tornando os tumores mais sensíveis à radiação ionizante [46]. A temozolomida (TMZ), molécula que motivou a presente tese, é um agente alquilante. Estes são compostos que funcionam através da adição de um grupo alquilo à base de guanina da molécula de ADN, impedindo que as cadeias da dupla hélice se liguem como deveriam, causando a quebra das cadeias de ADN e por consequência afeta a capacidade da célula cancerígena de se multiplicar [46].

A melhor compreensão dos mecanismos físico-químicos subjacentes à radiosensibilização resulta na eficiente otimização e formulação de novos agentes radiosensibilizadores utilizados nos tratamentos para o cancro [47],[48].

2.4.1 Temozolomida e AIC

TMZ é uma molécula lipofílica que tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (barreira protetora do cérebro), propriedade que juntamente com a sua estabilidade a valores de pH ácidos, facilitam a sua administração oral. A sua estrutura química encontra-se representada na Figura 2.7 [49],[50]. A TMZ e os seus metabolitos são excretados através dos rins [51].

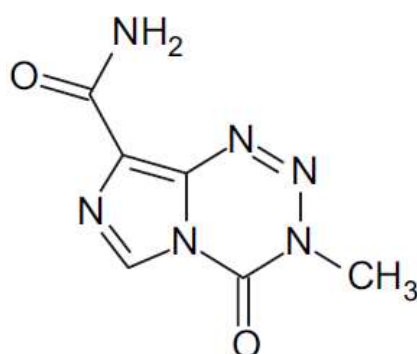


Figura 2.7 - Estrutura química TMZ [46].

Esta molécula é um fármaco anticancerígeno que em pH fisiológico se converte espontaneamente no composto 5-(3-Metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida (MTIC). Posteriormente, o MTIC reage com moléculas de água, levando a formação dos metabolitos finais da cadeia de ação da TMZ, a molécula 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e ao ião metildiazónio, tal como esquematizado na Figura 2.8 [7],[49],[50].

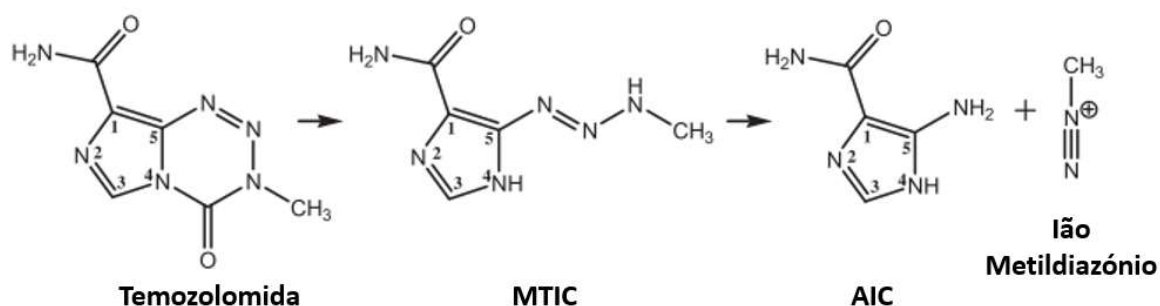


Figura 2.8 - Cadeia de hidrolisação da TMZ para MTIC e os seus metabolitos AIC e ião metildiazónio. Imagem adaptada da referência [52]

O ião metildiazônio é a espécie alquilante ativa que atua através da metilação das bases da molécula de ADN, preferencialmente, nas posições N₇ da guanina, mas também no átomo N₃ da adenina e O₆ da guanina [50]. A formação de O₆-metilguanina pode resultar no emparelhamento incompatível com a timina durante os ciclos subsequentes de replicação do ADN, levando a quebra de ligações do ADN e, eventualmente morte celular. Deste modo, a atividade antitumoral da TMZ é atribuída à metilação do ADN que, tal como descrito anteriormente, depende da formação do ião reativo metildiazônio, uma vez que os mecanismos de reparação celular não têm capacidade de se ajustar, resultando em última análise na apoptose celular [42],[43]. O mecanismo de ação descrito pode ser ilustrado através da Figura 2.9.

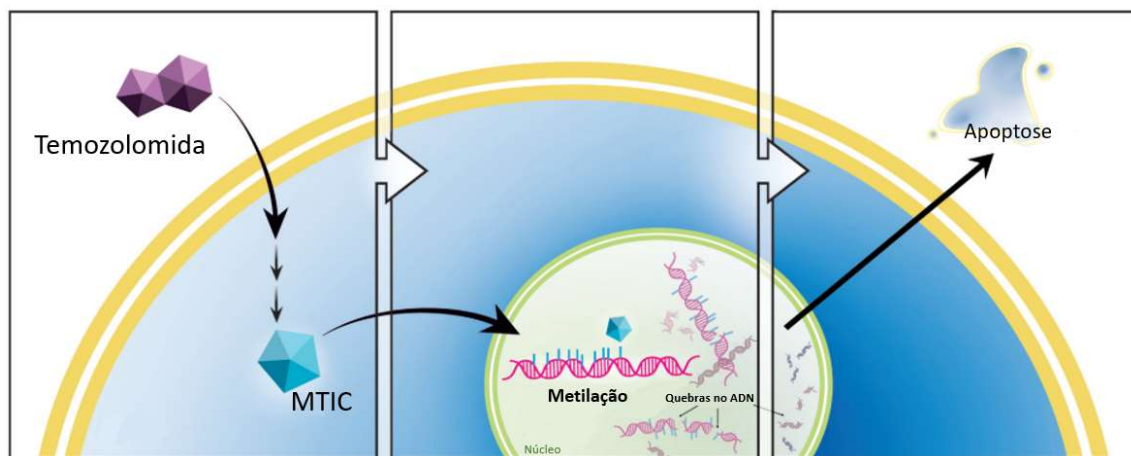


Figura 2.9 - Mecanismo de ação da molécula TMZ. Imagem adaptada da referência [51].

A TMZ (Figura 2.7) tem sido bastante estudada em tumores de células gliais, células que circundam e suportam neurónios cerebrais, também designados por gliomas. Glioblastoma, tumor de células gliais do tipo astrocitoma, é o glioma mais comum e maligno, e apresenta uma taxa de sobrevivência de 2 anos pós-diagnóstico inferior a 40% e de 5 anos inferior a 10% [53]. O facto de este tipo de tumor apresentar taxas de sobrevivências tão baixas, representa um impulso para o estudo da TMZ e da sua ação como agente radiosensibilizador.

Esta molécula pode ser administrada apenas como composto quimioterapêutico e, neste caso, atua através do seu efeito citotóxico metilando as bases da molécula de ADN, ou pode também atuar como radiosensibilizador, através da inibição da reparação das quebras simples e duplas na cadeia de ADN, potenciando o fenómeno de catástrofe mitótica [49],[50]. Na presente tese, pretende-se investigar e compreender qual o papel dos EBE nos mecanismos físico-químicos que são desencadeados no processo de radiosensibilização.

2.5 Estado da arte

Tal como foi referido no subcapítulo anterior, em quimioradioterapia os radiosensibilizadores são administrados ao doente para aumentar a sensibilidade das células tumorais à radiação ionizante. Comparativamente à radioterapia isolada, o uso de radiosensibilizadores promove o controlo do tumor sem maiores danos ao tecido saudável. Apesar do mecanismo de ação da radiosensibilização a nível molecular ainda não estar esclarecido, a sinergia observada entre a radiação e o radiosensibilizador pode ser atribuída a reações conduzidas por EBE, especialmente através de CED.

2.5.1 Estudos de impacto de eletrões em radiosensibilizadores

Num estudo publicado por Zheng *et al.* [54], filmes sólidos de ADN com e sem o agente quimioterapêutico cisplatina ligado a guanina, foram bombardeados com eletrões de 1, 10, 100 e 60000 eV, levando a quebras simples e duplas na cadeia de ADN das células cancerígenas. Verificou-se que na presença de cisplatina o dano foi aumentado por fatores que vão de 1,3 a 4,4, devido ao aumento da dissociação de ligações desencadeadas pela formação de aniões transientes. O aumento na secção eficaz de ionização do eletrão secundário, devido à presença dos átomos de platina também aumenta a quantidade de EBE junto à cisplatina e, portanto, contribui indiretamente para um enorme aumento dos danos locais. Os autores propõem este mecanismo como a base da eficiência da terapia com uso simultâneo de radiação e cisplatina [54].

Num estudo realizado por Kopyra *et al.* [47] foram observados experimentalmente diferentes canais competitivos para captura eletrónica em bases e açúcares da molécula de ADN. Para isso, compararam o espectro de CED em três moléculas diferentes, 2'-deoxicitidina, 2'-deoxi-5-fluorocitidina e gemcitabina. As três moléculas em estudo fazem parte do grupo de radiosensibilizadores mais amplamente aplicados em quimioradioterapia, sendo o seu efeito biológico a inibição da replicação de ADN. Apesar da gemcitabina, um derivado da 2'-deoxicitidina, ser bastante utilizada na prática clínica devido à sua abrangência para diversos tipos de tumores, o seu efeito radiosensibilizador causado pela interação direta com eletrões secundários nunca foi considerado. Para a molécula gemcitabina, os autores esperavam uma radiosensibilização específica da unidade de açúcar, ao contrário das purinas e pirimidinas halogenadas, nas quais é sensibilizada a nucleobase. Foi também demonstrado, pela primeira vez, uma maior reatividade da molécula gemcitabina em relação aos EBE, o que pode explicar as

suas propriedades como radiosensibilizador. Neste estudo publicado em 2013, Kopyra *et al.* [47] concluíram que a fluoração origina um aumento nas taxas de fragmentação, que é atribuído a um melhoramento da secção transversal da captura de eletrão correspondente. O estudo representa um ponto de partida para a compreensão molecular e físico-química, do efeito radiosensibilizador dos agentes terapêuticos [47].

Derivados de pirimidina, em particular pirimidinas halogenadas, foram também propostos como potenciais agentes radiosensibilizadores. Num estudo publicado em 2001 com diferentes 5-halouracilos, Abdoul-Carime *et al.* [55], demonstraram que a natureza radiosensibilizadora destas moléculas está diretamente relacionada com a dissociação ressonante que leva à formação de vários radicais genotóxicos durante o processo de captura de elétrons com energias entre 0 e 3 eV. A substituição da timina pelo 5-halouracilo na sequência genética do ADN leva a um aumento da sensibilidade à radiação ionizante, sem alterar a expressão genética das células que não são irradiadas. Embora as potenciais aplicações clínicas dos 5-halouracilos como radiosensibilizadores prometam terapias contra o cancro em doses significativamente reduzidas e, portanto, com menos efeitos colaterais para o doente, os mecanismos subjacentes aos efeitos da radiação nas biomoléculas ainda não são inteiramente conhecidos [55].

Em 2015, num estudo realizado por Tanzer *et al.* [30] de interação de elétrons com a molécula 4-nitroimidazol (4NI) observou-se que são formados iões negativos via CED com alta eficiência a energias abaixo dos 2 eV. A interação de elétrons a este conjunto de moléculas desencadeia uma variedade de reações unimoleculares incluindo a quebra de ligações simples, e reações complexas que envolvem toda a molécula, gerando assim novos compostos. Por outro lado, a metilação do 4NI bloqueia por completo as reações de CED para gamas de energia abaixo de 2 eV. Os autores verificaram ainda que, apenas os compostos metilados formam iões negativos progenitores metaestáveis com uma ressonância bem definida a 0 eV. Este estudo veio demonstrar a capacidade desta molécula em formar eficazmente radicais a energias muito baixas, o que é uma possível chave para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao papel como radiosensibilizador [30].

No seguimento deste estudo, surge mais recentemente uma investigação levado a cabo por Meissner *et al.* [56]. Os autores reportam que os EBE causam, de forma eficaz, a redução do radiosensibilizador nimorazol através de um processo de CED, com uma secção eficaz superior à maioria das moléculas conhecidas. Isto suporta a tese de que o nimorazol é seletivamente citotóxico para as células tumorais devido à redução da molécula como pré-requisito para a acumulação da molécula nas células neoplásicas. Deste modo, estes resultados demonstram que a formação do radical anião livre pela ligação de um eletrão de baixa energia, pode

ser o processo chave para a radiosensibilização das células tumorais hipóxicas por radiosensibilizadores [56].

Nos últimos anos, a tirapazamina tem sido também utilizada em ensaios clínicos de quimiorradioterapia devido ao seu caráter de toxicidade altamente seletiva em tumores hipóxicos. Num estudo recente realizado por Baidoo *et al.* [6], foi gerado um feixe de elétrons bem definido utilizando um monocromador de elétrons, com o objetivo de investigar as reações químicas subjacentes à ligação de um elétron à tirapazamina em fase gasosa. Baidoo *et al.* [6] observaram que a formação do anião (tirapazamina-OH)⁻ acompanhada da dissociação do radical hidroxilo, é o caminho de reação predominante. Foi ainda proposto um novo mecanismo de reação, ainda pouco estudado atualmente, que designaram de mecanismo "*OH roaming*", um processo competitivo com a dissociação direta de OH. Resumidamente, este mecanismo refere que quando o OH se forma após interação de um elétron com a tirapazamina, pode permanecer na vizinhança da molécula e ligar-se a outro átomo. Quando se liga a um átomo de carbono, por exemplo, forma um complexo mais estável e, após reações de transferência de prótons pode dissociar o átomo de hidrogénio, ficando o oxigénio no anel de benzeno. Neste estudo concluiu-se que a natureza eletrofílica da tirapazamina é a chave do seu potencial como agente radiosensibilizador [6].

2.5.2 Temozolomida

Em 2005, foi conduzido um estudo com o objetivo de determinar se a combinação de TMZ com o tratamento de radioterapia produz melhores resultados, no que diz respeito à probabilidade de sobrevivência, em comparação com o uso apenas de radioterapia [10]. Este ensaio clínico foi realizado para doentes com glioblastoma primário multifome recentemente diagnosticado, os quais no prazo de seis semanas após o diagnóstico foram aleatoriamente atribuídos para receber apenas radioterapia focal padrão (o grupo de controlo), ou radioterapia padrão mais TMZ. Foi concluído que a utilização de TMZ combinada com tratamento de radioterapia, traduz-se num aumento significativo de sobrevivência em comparação com aqueles tratados apenas com radioterapia [10].

Os gliomas malignos estão entre os cancros mais incontroláveis e fatais. Por isso, Parisi *et al.* [11] publicaram também, em 2014, um outro estudo com o objetivo de comparar a sobrevivência a longo prazo (> 10 anos) de doentes com glioma tratados apenas com radioterapia, e com radioterapia e TMZ. Foram incluídos os resultados de 128 doentes com diagnóstico de glioma entre 1994 e 2001, sendo que metade recebeu apenas tratamento de radioterapia

e a outra metade radioterapia com TMZ. Neste estudo, os autores confirmaram que o tratamento combinado de radiação com o radiosensibilizador TMZ pode prolongar a sobrevivência a longo prazo dos pacientes com glioma [11].

Adicionalmente, em 2017, Nachbichler *et al.* [12] realizaram um estudo onde foram comparados os resultados, em termos de sobrevivência, num total de 432 doentes diagnosticados entre 2002 e 2021, divididos em três grupos. O primeiro grupo que não recebeu TMZ, o segundo que recebeu TMZ durante os tratamentos de radioterapia apenas em dias de tratamento, e ao último grupo de doentes, que também realizou radioterapia, foi administrada TMZ durante os sete dias da semana. Após apenas 6 meses, no grupo que recebeu TMZ todos os dias, 82% dos doentes sobreviveram, em comparação com 79% do grupo que apenas recebe TMZ em dias de tratamento, e 56% no grupo que não recebeu TMZ. As taxas de sobrevivência registadas ao fim de 30 meses eram de 21%, 10% e 8% respetivamente. Nachbichler *et al.* [12] concluíram que a administração de TMZ diária em conjunto com radioterapia pode ser usada como terapia padrão para o glioblastoma.

EQUIPAMENTO EXPERIMENTAL

Este capítulo é dedicado à descrição do equipamento experimental que foi utilizado ao longo do trabalho.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Colisões Atômicas e Moleculares, CEFITEC, FCT/UNL utilizando um sistema de feixes cruzados de colisões eletrão-molécula, composto por um monocromador trocoidal de eletrões (TEM) acoplado a um espectrómetro de massa tipo tempo-de-voo refletor (ToF-Ref) (Figura 3.1).

O TEM e o ToF-Ref estão colocados em duas câmaras diferentes, em alto vácuo, separados por um orifício de 1 mm de diâmetro, responsável pelo bombeamento diferencial, garantindo segurança no controlo da pressão (Figura 3.2).

Resumidamente, um feixe de eletrões de energia bem definida é gerado a partir de um filamento de tungsténio e direcionado através de um conjunto de lentes de focagem e dispersão, que constituem o TEM, até à zona de interação onde se cruza ortogonalmente com um feixe molecular efusivo da molécula alvo. Na zona de dispersão, os eletrões atravessam uma região onde existe a combinação de um campo elétrico e um campo magnético externo uniforme, produzido por um par de bobinas de Helmholtz. Desta forma os eletrões adquirem um movimento circular em torno de um ponto fixo (movimento trocoidal) criando um feixe de eletrões com uma baixa dispersão energética, melhorando a resolução em energia do feixe original. Na zona de interação, os iões negativos e positivos, formados após a colisão, são extraídos por um pequeno campo elétrico em direção à entrada do espectrómetro de massa ToF-Ref, onde são separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e detetados num detetador do tipo *microchannel plate*.

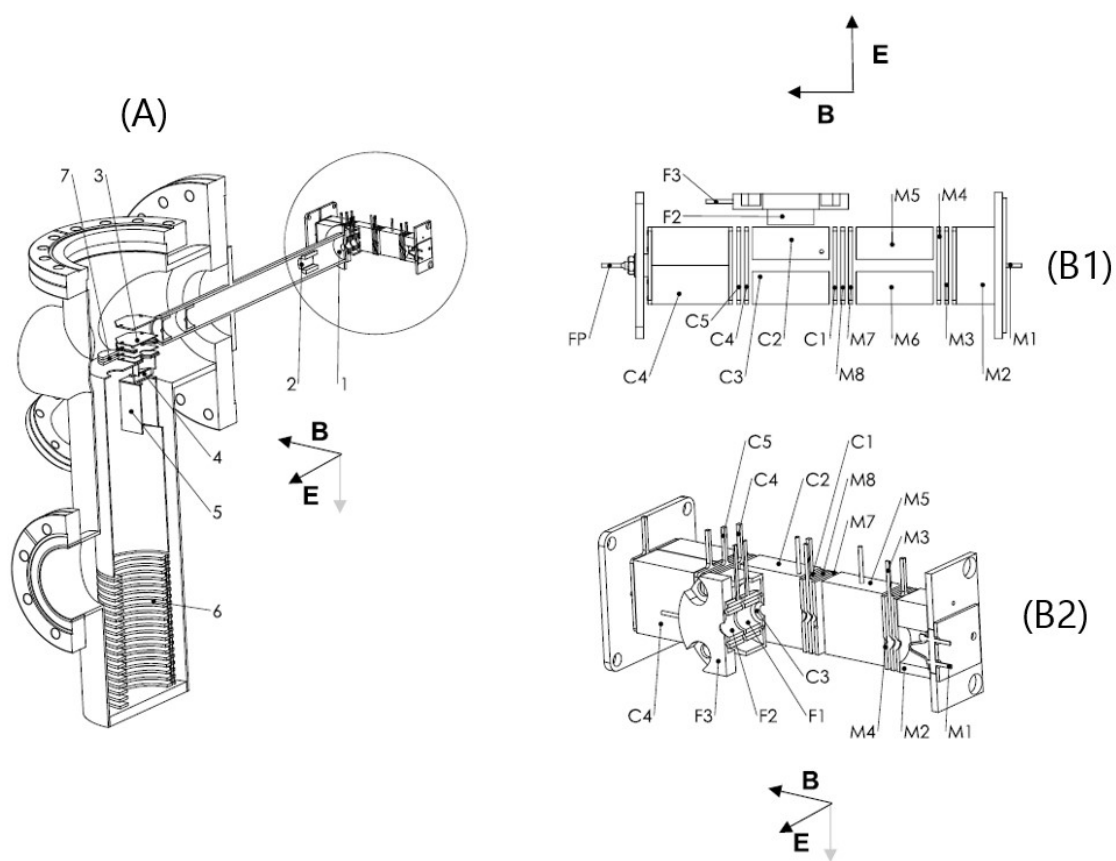


Figura 3.1 - Equipamento experimental. A) Esquemático do equipamento experimental: monocromador trocoidal de elétrons acoplado ao espectrômetro de massa; (B) Esquema amplificado do monocromador trocoidal de elétrons [57].

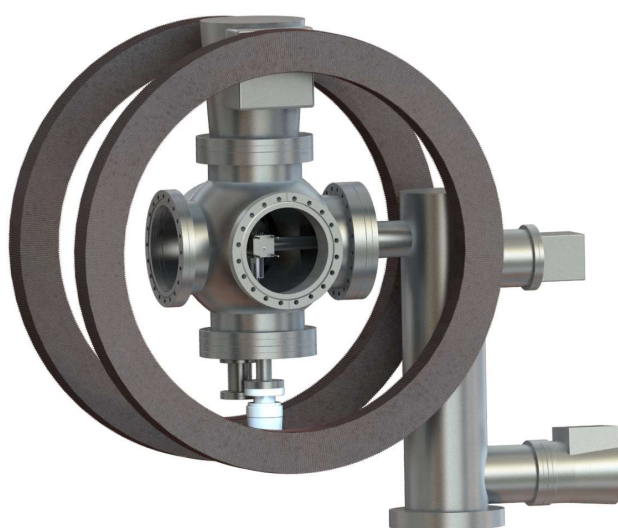


Figura 3.2 - Equipamento experimental. Câmaras de alto vácuo.

Este equipamento possui ainda um sistema de introdução de amostras, que é constituído por duas entradas separadas da câmara de vácuo por válvulas de agulha, uma entrada direta de gás na câmara, onde podem ser introduzidos os gases de calibração (CCl_4 e SF_6), e uma outra entrada, onde é introduzida a amostra em estudo, diretamente na zona de colisão. Este sistema foi dimensionado e montado para as moléculas que são adquiridas em estado gasoso ou líquido. Quando as amostras em estudo são adquiridas em estado sólido (pó ou cristais), estas são colocadas num forno de sublimação dentro da câmara de vácuo (Figura 3.3).

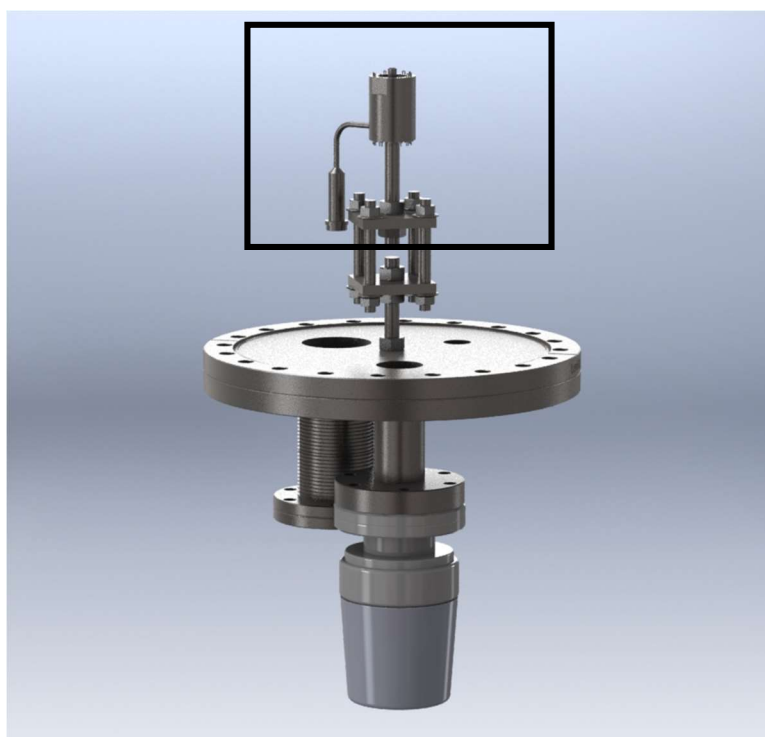


Figura 3.3 - Equipamento Experimental. Forno de sublimação molecular.

3.1 TEM

O TEM é constituído por três conjuntos de lentes eletrostáticas, M, C e F. O conjunto de lentes M é responsável pela focagem, colimação e dispersão do feixe de elétrons desde o filamento até à zona de colisão. Os elétrons são produzidos por emissão termiônica a partir de um filamento de tungsténio com formato em V invertido. Após emissão, os elétrons são focados através de um conjunto de três lentes eletrostáticas (M2-M4) até à zona de dispersão delimitada pelas lentes M5 e M6. Na zona de dispersão a trajetória do feixe de elétrons é alterada devido à ação de um campo elétrico (E) ortogonal a um campo magnético uniforme (B) de 40 G de intensidade, tal como ilustrado na Figura 3.1, criado por um par de bobinas de

Helmholtz de raio 70 cm. Nesta zona os eletrões movem-se com uma trajetória trocoidal devido à combinação dos dois campos, levando à diminuição da dispersão em energia do feixe, garantindo um feixe monoenergético colimado.

Depois de passarem pela última lente do conjunto M, a M8, os eletrões atravessam a lente C1, atingindo a zona onde interagem com o feixe molecular alvo em fase gasosa. Esta zona, constituída pelas lentes C2 e C3, é denominada de zona de colisão, e é onde ocorre a produção de espécies iónicas, resultado de processos de CED e ionização dissociativa. A molécula em estudo é introduzida a partir de um sistema de introdução de amostras que está alinhado de forma perpendicular com as lentes C2 e C3. Os iões formados na zona de colisão são extraídos através da aplicação de um campo elétrico (~ 1 V/cm), por uma pequena abertura na lente C3, e de seguida focados pelo conjunto de três lentes F (F1-F3), em direção ao espectrómetro de massa.

Após a zona de colisão, existe um conjunto de lentes (C4-C5), que são responsáveis por focar e direcionar o feixe de eletrões até à gaiola de Faraday (C6), que está conectada a um eletrómetro, onde é possível monitorizar a corrente de eletrões.

3.2 ToF-Ref

Um espectrómetro de massa é composto por um analisador, uma fonte de ionização, um detetor e um sistema de aquisição. A espetrometria de massa do tipo tempo de voo é um método em que a relação entre a massa e a carga do ião é determinada através da medição do tempo de voo que o ião leva a atingir o detetor desde o instante em que é extraído. Os iões são acelerados por um campo elétrico aplicado na zona de extração. A velocidade atingida pelo ião depende da relação entre a sua massa e carga, sendo que iões mais pesados adquirem velocidades mais baixas [58]. Os espectrómetros de massa do tipo tempo de voo, podem dividir-se em duas categorias, do tipo linear ou do tipo refletor. A vantagem do último, é o aumento da resolução em massa, uma vez que este princípio de reflexão diminui a distribuição de tempo de voo para cada razão m/z , e aumenta a distância percorrida no mesmo tempo de voo, tal como está representado na Figura 3.4 [59].

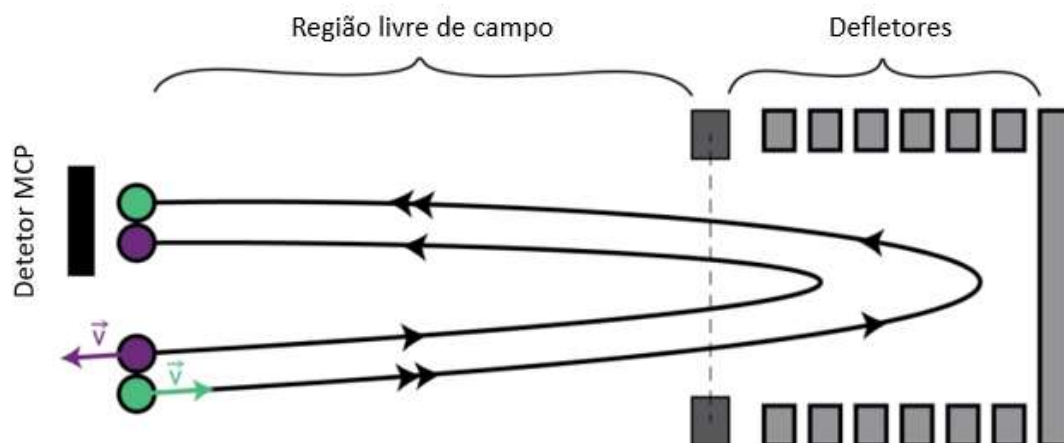


Figura 3.4 - Representação esquemática do funcionamento do refletor. Os círculos coloridos representam dois fragmentos aniônicos da mesma espécie e com a mesma massa, formados com diferentes energias cinéticas iniciais. Os potenciais repulsivos aplicados através dos defletores retardam os aniões e focam-nos para chegar ao detector ao mesmo tempo, aumentando a resolução de massa. As setas negras são representativas da velocidade relativa de cada fragmento ao longo da trajetória. Imagem adaptada da referência [60].

No presente equipamento experimental, no interior do ToF-Ref, a região de extração é composta por dois elétrodos circulares localizados a 245 mm da entrada da zona de guia de íões. Estes elétrodos produzem um campo elétrico pulsado transversal ao feixe de íões. O pulso aplicado tem uma frequência de 80 kHz, $\pm 400V$ de amplitude e 3 μs de largura. Através deste pulso, os íões são defletidos para a região livre de campo, em direção à zona de reflexão (ou refletor), composta por 24 elétrodos circulares. Após serem refletidos, os íões atingem o detector do tipo *microchannel plate* (MCP). O sinal resultante é pré-amplificado, e depois transmitido para o sistema de aquisição de dados [57].

3.3 Sistema de vácuo

Em estudos de colisões elétron-molécula, é essencial garantir que o livre percurso médio dos elétrons seja superior ao tamanho da câmara para que ocorram apenas colisões binárias. Para isso, é necessário que as medidas experimentais se realizem em condições de alto vácuo (1×10^{-6} - 1×10^{-8} mbar), alcançado através de bombas turbomoleculares. No presente sistema experimental, o regime de alto vácuo foi conseguido através de duas bombas turbomoleculares, *Pfeiffer Hipace 80* (velocidade de bombeamento a 67 l/s) para a câmara do TOF, e *Pfeiffer TC400* (velocidade de bombeamento de 260 l/s) para a câmara do TEM, atingindo-se desta forma uma pressão base na ordem de 1×10^{-8} mbar. O vácuo primário é atingido através de

uma bomba rotatória com velocidade de bombeamento de 6 l/s, e de uma bomba membrana, *Pfeiffer MVP 015-4* (velocidade de bombeamento a 0,15 l/s). A pressão de trabalho após introdução de gás foi de $\sim 5 \times 10^{-6}$ mbar. O sistema de introdução de amostras para gases e líquidos é bombeado através de uma bomba rotatória (velocidade de bombeamento de 6 l/s). O esquema do sistema de vácuo do equipamento experimental está representado na Figura 3.5.

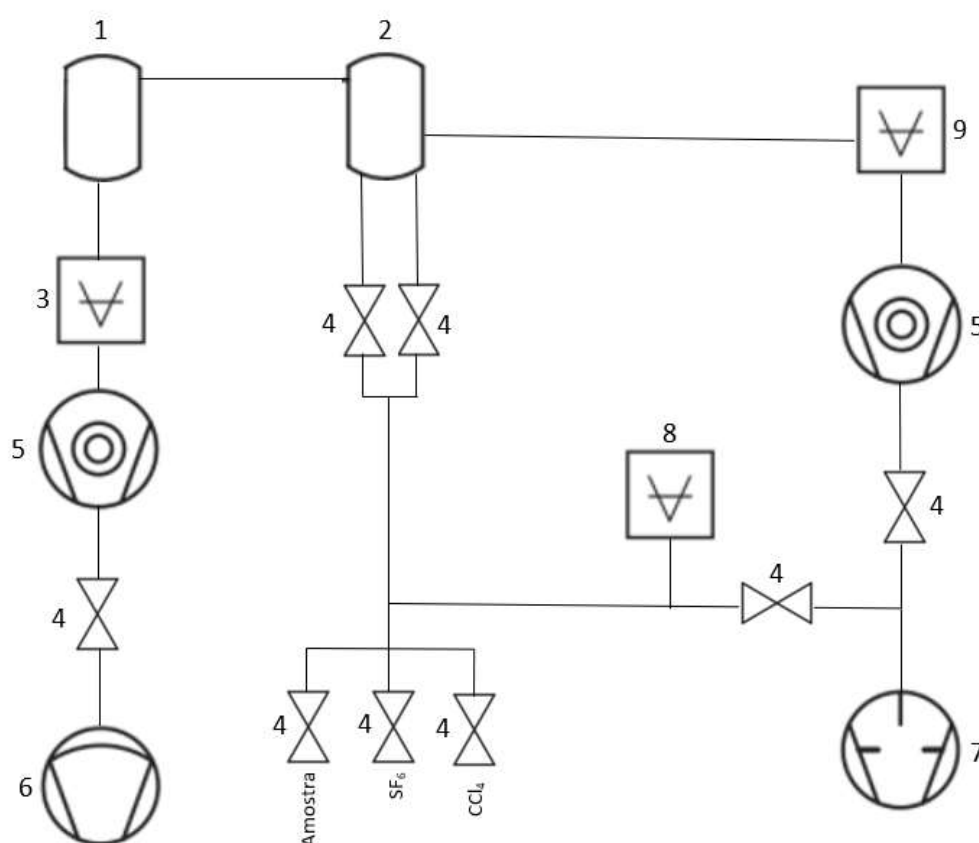


Figura 3.5 - Esquema do sistema de vácuo. 1-Câmara TOF; 2-Câmara TEM; 3-Manômetro Penning; 4-Válvula; 5-Bomba Turbomolecular; 6-Bomba Membrana; 7-Bomba Rotatória; 8-Manômetro Pirani; 9-Manômetro cabeça mista.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos, suportados por cálculo teórico, bem como as condições experimentais em que os mesmos foram alcançados.

4.1 AIC – Caracterização da molécula

A molécula AIC foi adquirida no laboratório Biosynth Carbosynth[®] com um grau de pureza $\geq 95\%$, sendo identificada com o número CAS 360-97-4, e pelo nome 5-amino-1H-imidazole-4-carboxamide. A molécula tem a fórmula química $C_4H_6N_4O$, um peso molecular de 126,12 g/mol, e apresenta-se como um pó cristalino entre o branco, o roxo e o cinzento. A sua estrutura química encontra-se representada na Figura 4.1.

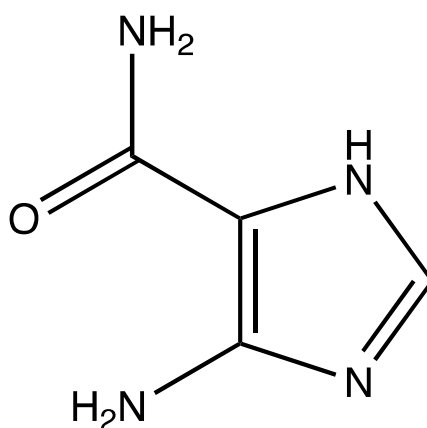


Figura 4.1 - Estrutura química AIC.

Uma vez que o composto AIC é adquirido em estado sólido, é necessário garantir a passagem ao estado gasoso para realizar as medidas experimentais. Para tal, é utilizado um forno de sublimação que se encontra dentro da câmara de alto vácuo, em que o aquecimento é feito de forma resistiva com recurso a um filamento de tungsténio. No interior da câmara existe também uma lâmpada de halogéneo com a finalidade de manter a temperatura da câmara e do TEM o mais próxima possível da temperatura do forno, de forma a evitar a condensação da molécula nas lentes do TEM. O processo de aquecimento é gradual e controlado, sendo a molécula aquecida até à sua temperatura de sublimação. As medidas feitas com a molécula AIC foram realizadas a aproximadamente 100°C. Através de uma fonte de corrente, a temperatura no interior do forno molecular é aumentada gradualmente, e simultaneamente a temperatura da câmara através da lâmpada de halogénio. Durante o progressivo aumento de temperatura são adquiridos espetros de massa, e é controlada a pressão na câmara.

4.2 Formação de iões positivos por processos de ionização em impacto eletrónico

A interação eletrão-molécula desencadeia um conjunto de processos moleculares, como referido em 2.3, sendo um deles a ionização. Tal como concluído na secção 2.3.2, através da Figura 2.6, o máximo da secção eficaz de ionização da generalidade dos compostos varia entre 50 e 100 eV de energia de eletrões incidentes, sendo que em experiências de espectrometria de massa, é usual medir o padrão de fragmentação das moléculas para identificar os diferentes compostos formados a 70 eV [39].

Para os estudos de ionização eletrónica reportados na presente dissertação foram realizadas medidas a 70 eV com o objetivo de identificar o padrão de fragmentação da molécula em estudo. As energias de aparecimento para os diferentes catiões formados foram determinadas experimentalmente por varrimento de energia entre 5 eV e 50 eV, com passos de 0,01 eV, adquirindo espetros de massa em cada passo de energia.

4.2.1 Moléculas de calibração

4.2.1.1 Calibração em massa

A calibração em massa foi realizada utilizando a molécula hexafluoreto de enxofre (SF_6) em fase gasosa, procedendo-se à interação eletrónica e extração dos iões positivos resultantes dessa interação. A escolha desta molécula reside principalmente no facto de ser uma molécula bastante estudada e reportada na literatura, bem como pelo número elevado de fragmentos produzidos a 70 eV. Deste modo, conhecendo bem o perfil de fragmentação do SF_6 a 70 eV, bem como a identificação de todos os catiões formados, conseguimos uma calibração em massa fiável e precisa. A conversão do tempo de voo para massa é feita através da equação 4.1, onde t_0 e C_b são os parâmetros de calibração do ToF-Ref.

$$m = \frac{t - t_0}{C_b} \quad (4.1)$$

A Figura 4.2 representa o espectro de massa adquirido por interação de elétrons acelerados a 70 eV com SF_6 .

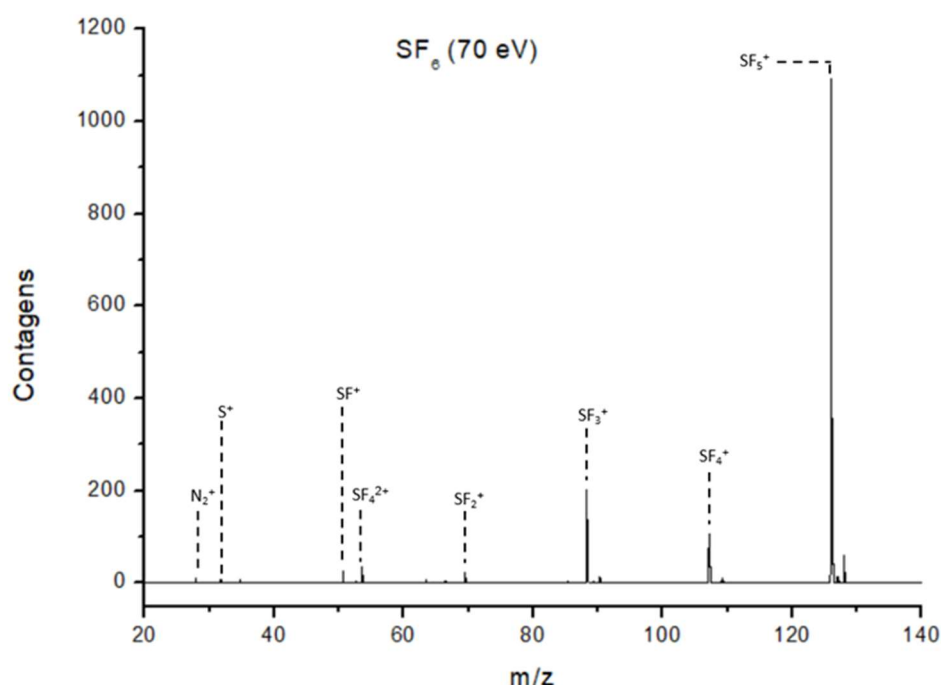


Figura 4.2 - Espectro de massa de ionização de interação de elétrons acelerados a 70 eV com SF_6 .

Através da análise do espectro de massa, apresentado na Figura 4.2, é possível verificar que o ião SF_5^+ é o pico com maior intensidade, resultando da rutura da ligação S-F. Podemos também observar a formação dos iões SF_4^+ , SF_3^+ , SF_2^+ , SF_4^{2+} , SF^+ , S^+ e N_2^+ . Este último é devido a uma pequena fuga no sistema.

4.2.1.2 Calibração em energia

A calibração em energia foi feita utilizando árgon (Ar), sendo que esta escolha se deve ao facto dos valores experimentais para a energia de aparecimento do ião Ar^+ terem sido exaustivamente estudados e reportados na literatura por diferentes métodos de espectroscopia.

O ajuste exponencial implementado para determinar o limiar de ionização do ião Ar^+ foi o modelo matemático de *Wannier* [61], apresentação na equação 4.2, onde b representa o sinal de fundo experimental do espectro. De acordo com os parâmetros a e d foi aplicada uma evolução exponencial aos dados experimentais, sendo E a energia de eletrões incidentes e AE a energia de aparecimento de um dado ião.

$$f(E) = \begin{cases} b + a(E - AE)^d & E \geq AE \\ b & E < AE \end{cases} \quad (4.2)$$

A Figura 4.3 representa o espectro de aparecimento obtido experimentalmente, usado para determinar a energia de aparecimento do Ar^+ através do ajuste de *Wannier*.

A energia de aparecimento determinada experimentalmente foi de $(15,26 \pm 0,03)$ eV, encontrando-se bastante próxima dos valores experimentais reportados na literatura (ver Tabela 4.1). É relevante referir que pressão utilizada em ambos os gases de calibração foi de cerca de 6×10^{-6} mbar.

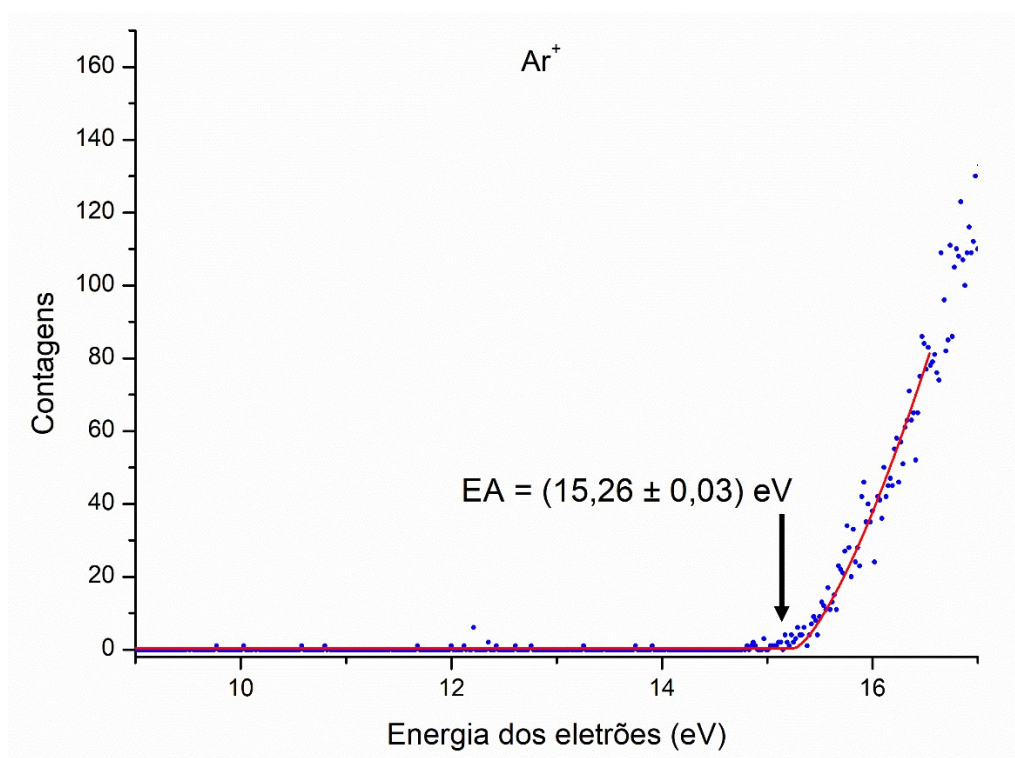


Figura 4.3 - Energia de aparecimento do íon Ar^+ .

A Tabela 4.1 apresenta o valor experimental da energia de ionização de Ar^+ (coluna da esquerda) e comparação com valores experimentais reportados na literatura (coluna direita).

Tabela 4.1 - Energia de aparecimento do gás de calibração Ar. Valor experimental da energia de ionização de Ar^+ (coluna da esquerda) e comparação com valores experimentais reportados na literatura (coluna direita).

Energia de aparecimento Ar^+ (eV)	Energia de aparecimento da literatura Ar^+ (eV)
15,26±0,03	15,763 (K.Weitzel,1994) [62]
	15,760 (Lide,1992) [63]
	15,82 (Wetzel, 1987) [64]
	15,760 (Kelly, 1987) [65]

4.2.2 AIC

Neste estudo procedeu-se à interação eletrónica com a molécula AIC em fase gasosa, e à extração dos iões positivos resultantes dessa interação. Desta forma foi possível estudar os processos de ionização e ionização dissociativa do AIC por impacto eletrónico. Na Figura 4.4 está representado o espetro de massa e respetivo padrão de fragmentação do AIC após colisão com eletrões acelerados a 70 eV.

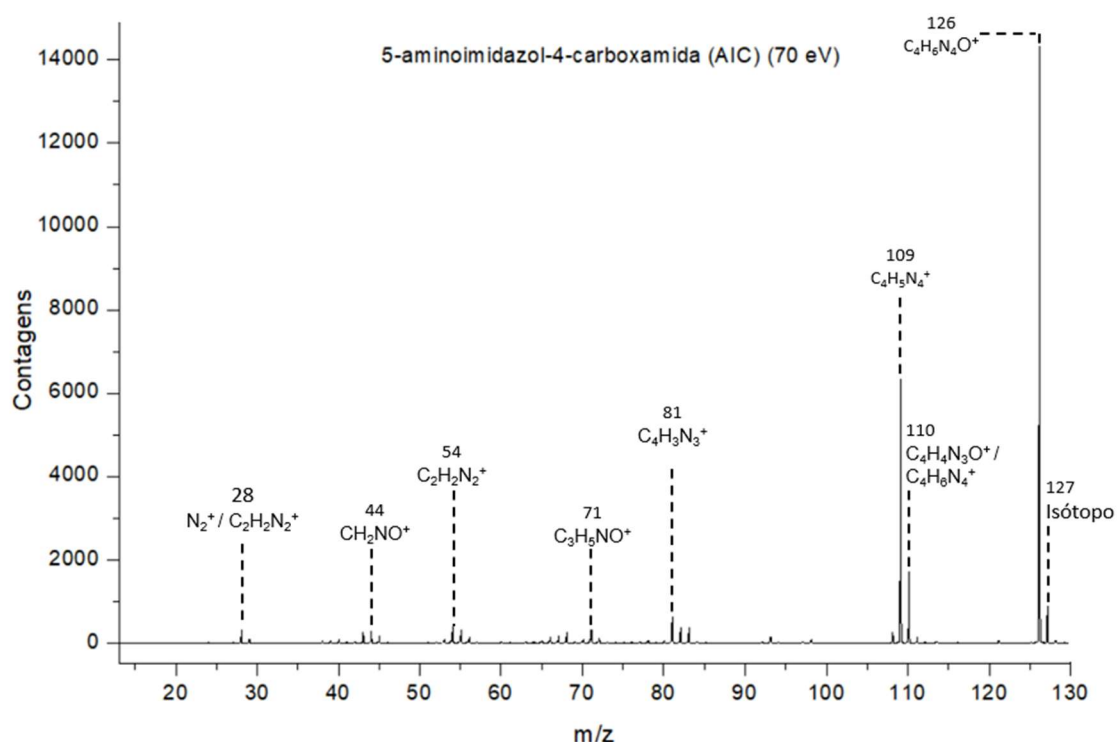


Figura 4.4 - Espetro de massa de ionização de interação de eletrões acelerados a 70 eV com AIC.

Analisando o espetro acima representado, verifica-se que o ião progenitor, $C_4H_6N_4O^+$ e o ião $C_4H_5N_4^+$ (109 m/z), são os fragmentos com maior intensidade. Este último corresponde a perda de um radical $OH^\bullet$. Todas as espécies iónicas presentes no espetro de massa foram identificadas e analisadas. Esta análise está resumida na tabela apresentada Tabela 4.2. Foram identificados alguns iões (92 m/z, 93 m/z, 94 m/z e 121 m/z), que aparecem no espetro, mas que durante o processo de aquecimento da molécula a sua intensidade foi caindo drasticamente sugerindo tratar-se de contaminação. É também importante referir que para algumas massas é apresentada mais do que uma possível atribuição para o ião correspondente.

Tabela 4.2 - Identificação dos íons positivos formados após interação de elétrons com a molécula AIC a 70 eV.

m/z	Identificação	m/z	Identificação	m/z	Identificação
27	CHN ⁺	55	C ₂ H ₃ N ₂ ⁺ ; C ₂ HNO ⁺	81	C ₄ H ₃ N ₃ ⁺
28	N ₂ ⁺ ; CH ₂ N ⁺	56	C ₂ H ₄ N ₂ ⁺ ; C ₂ H ₂ NO ⁺	82	C ₄ H ₄ N ₃ ⁺
29	CH ₃ N ⁺ ; CHO ⁺	65	C ₃ HN ₂ ⁺	83	C ₃ H ₅ N ₃ ⁺
38	C ₂ N ⁺	66	C ₃ H ₂ N ₂ ⁺	84	C ₃ H ₆ N ₃ ⁺
39	C ₂ HN ⁺	67	C ₃ H ₃ N ₂ ⁺	97	C ₄ H ₅ N ₂ O ⁺ ; C ₃ H ₃ N ₃ O ⁺
40	C ₂ H ₂ N ⁺	68	C ₃ H ₄ N ₂ ⁺	98	C ₄ H ₆ N ₂ O ⁺ ; C ₃ H ₄ N ₃ O ⁺
41	C ₂ H ₃ N ⁺ ; CH ₂ N ₂ ⁺	69	C ₃ H ₃ NO ⁺	108	C ₄ H ₄ N ₄ ⁺
42	CNO ⁺ ; CH ₂ N ₂ ⁺	70	C ₃ H ₄ NO ⁺	109	C ₄ H ₅ N ₄ ⁺
43	CHNO ⁺	71	C ₃ H ₅ NO ⁺	110	C ₄ H ₄ N ₃ O ⁺ ; C ₄ H ₆ N ₄ ⁺
44	CH ₂ NO ⁺	72	C ₃ H ₆ NO ⁺ ; C ₂ H ₄ N ₂ O ⁺	111	C ₄ H ₅ N ₃ O ⁺
45	CH ₃ NO ⁺	77	C ₄ HN ₂ ⁺	126	C ₄ H ₆ N ₄ O ⁺
53	C ₂ HN ₂ ⁺	78	C ₄ H ₂ N ₂ ⁺	127	Isótopo
54	C ₂ H ₂ N ₂ ⁺	80	C ₄ H ₂ N ₃ ⁺ ; C ₃ N ₂ O ⁺	128	Isótopo

Na Tabela 4.3, estão listados os íons formados com maior intensidade relativa (>2%). Estas intensidades foram calculadas atribuindo 100% ao íon pai, sendo as intensidades dos restantes íons calculadas relativamente a este íon.

Tabela 4.3 - Intensidades relativas dos íons formados por interação de elétrons acelerados a 70 eV com AIC.

m/z	Identificação	Intensidade relativa (%)
28	N ₂ ⁺ ; CH ₂ N ⁺	2,18
44	CH ₂ NO ⁺	2,04
54	C ₂ H ₂ N ₂ ⁺	2,80
71	C ₃ H ₅ NO ⁺	2,29
81	C ₄ H ₃ N ₃ ⁺	4,37
109	C ₄ H ₅ N ₄ ⁺	44,60
110	C ₄ H ₄ N ₃ O ⁺ ; C ₄ H ₆ N ₄ ⁺	11,71
126	C ₄ H ₆ N ₄ O ⁺	100

Para os íões acima descritos foram determinadas as energias de aparecimento, utilizando o ajuste exponencial de *Wannier*, de forma análoga à descrita em 4.2.1.2, e os resultados obtidos são apresentados e discutidos seguidamente.

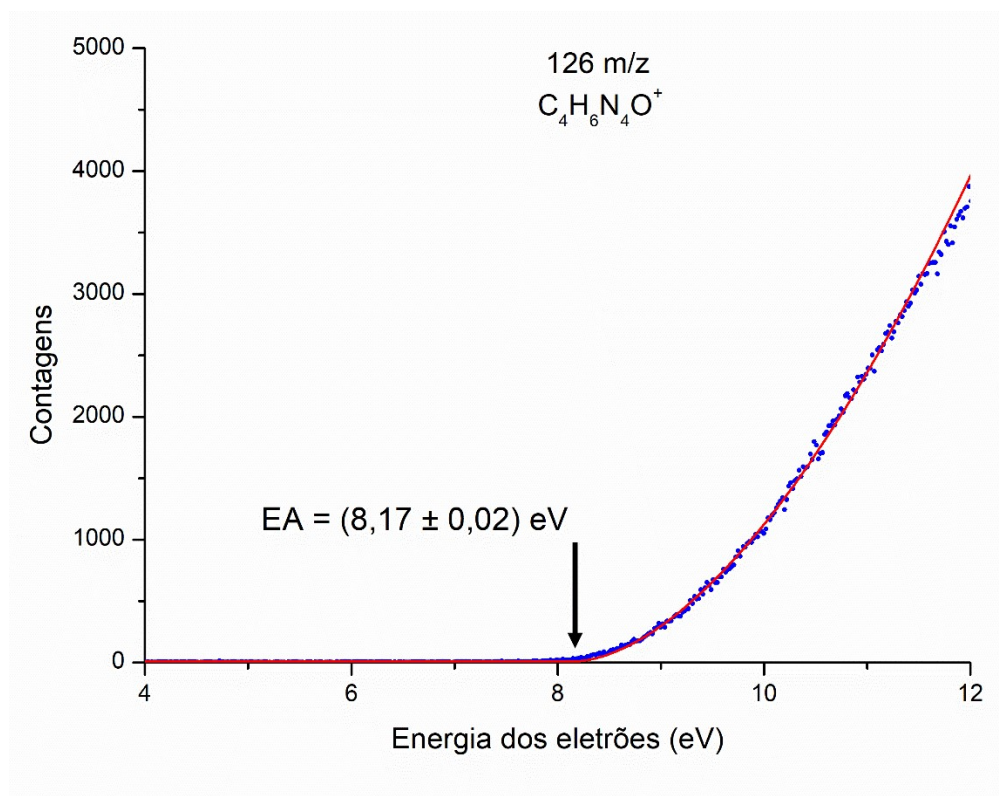
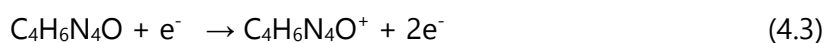
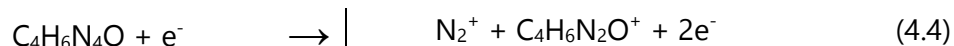


Figura 4.5 - Energia de aparecimento do íon 126 m/z ($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}^+$ /ião pai). Calibração feita com Árgon.

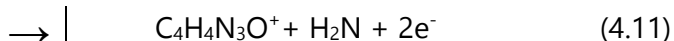
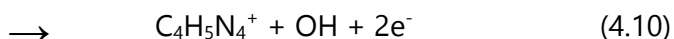
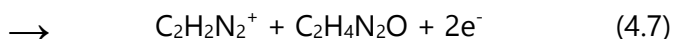
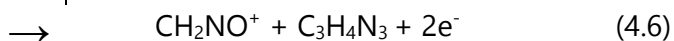
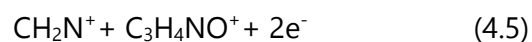
A Figura 4.5 diz respeito ao resultado experimental obtido para a energia de aparecimento do fragmento mais abundante, correspondente ao íon $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}^+$ (ião pai), e para o qual o limiar de formação obtido foi $(8,17 \pm 0,02)$ eV. Os cálculos teóricos foram realizados usando a metodologia *Outer Valence Green's function* (OVFG), implementada no programa Gaussian09, com a solução Hartree-Fock (HF), e indicam um valor de energia de ionização de 8,18 eV, concordante com o valor experimental. A equação 4.3 descreve o processo de formação do íon pai.



Para os restantes fragmentos com intensidade relativa superior a 2%, as reações propostas podem ser descritas pelas equações 4.4 a 4.12.



ou



ou



Relativamente às Figuras 4.6 a 4.12, estas representam a formação dos iões obtidos com intensidade superior a 2% (os iões referentes às equações acima descritas) em função da energia de electrão incidente, e que foram usados para determinar a energia de aparecimento dos mesmos (valor indicado).

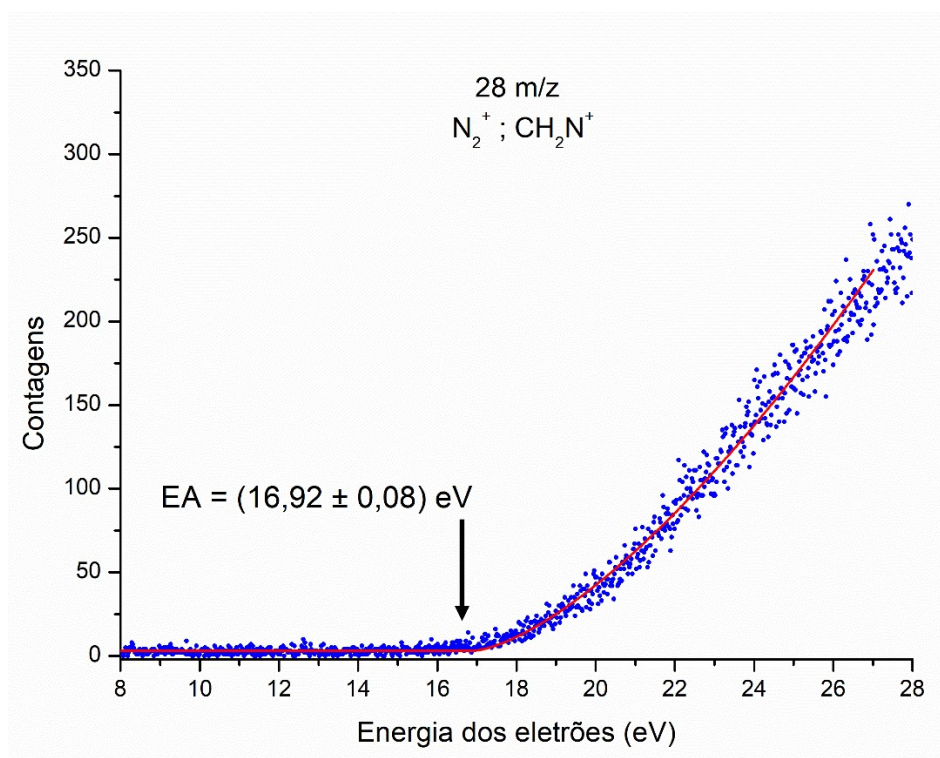


Figura 4.6 - Energia de aparecimento do íon 28 m/z (N_2^+ ; CH_2N^+). Calibração feita com Árgon.

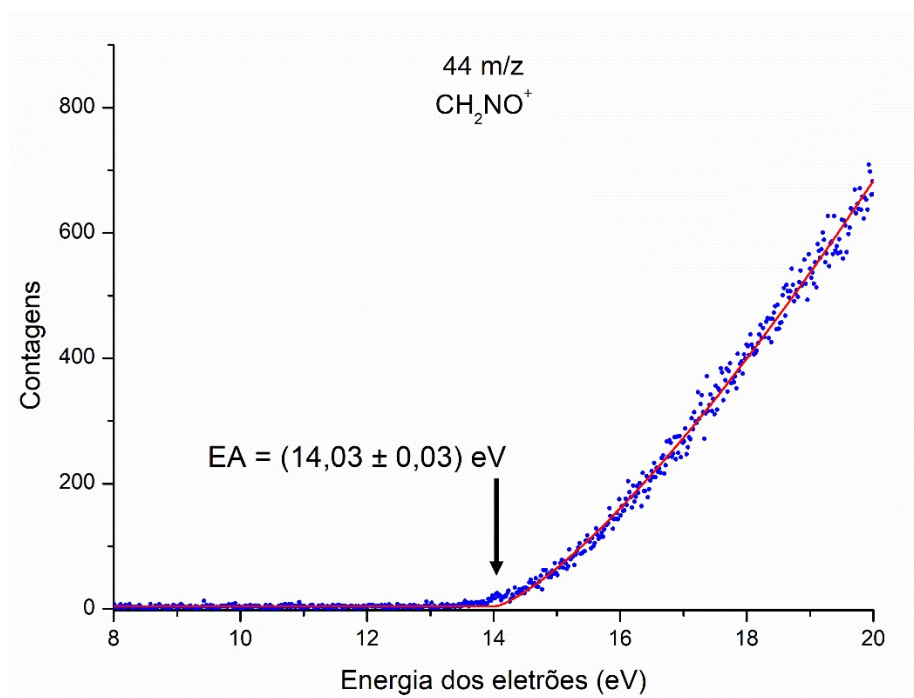


Figura 4.7 - Energia de aparecimento do íon 44 m/z (CH_2NO^+). Calibração feita com Árgon.

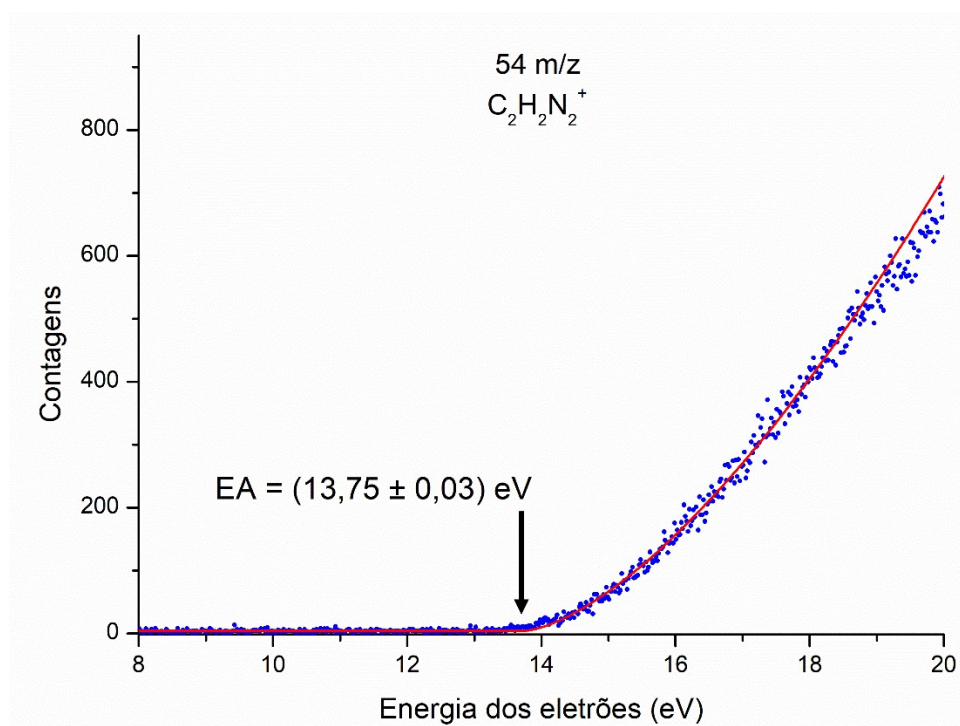


Figura 4.8 - Energia de aparecimento do íon 54 m/z ($C_2H_2N_2^+$). Calibração feita com Árgon.

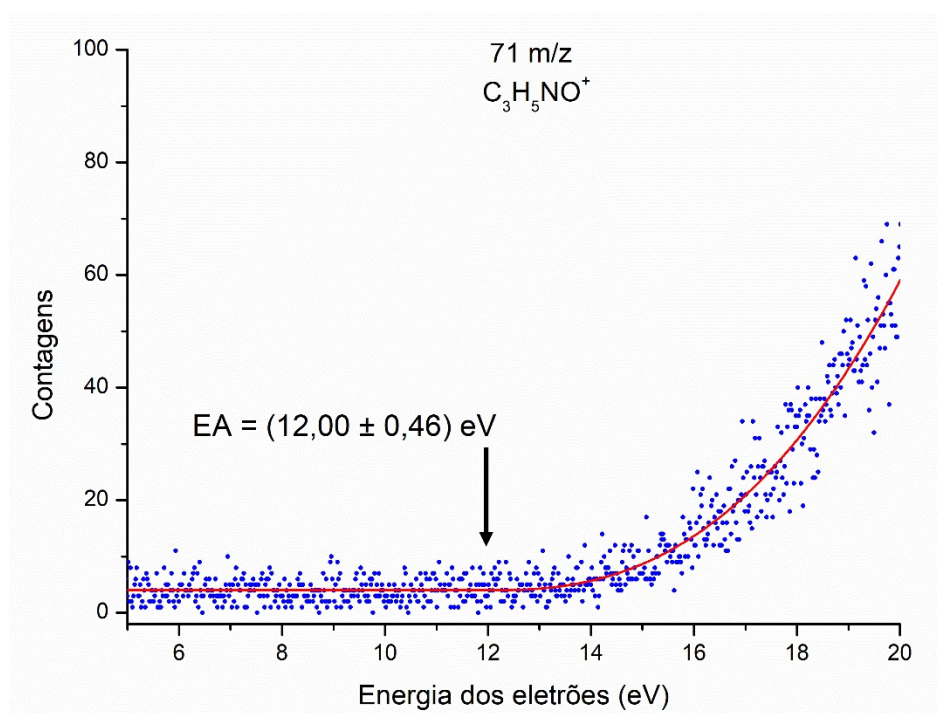


Figura 4.9 - Energia de aparecimento do íon 71 m/z ($C_3H_5NO^+$). Calibração feita com Árgon.

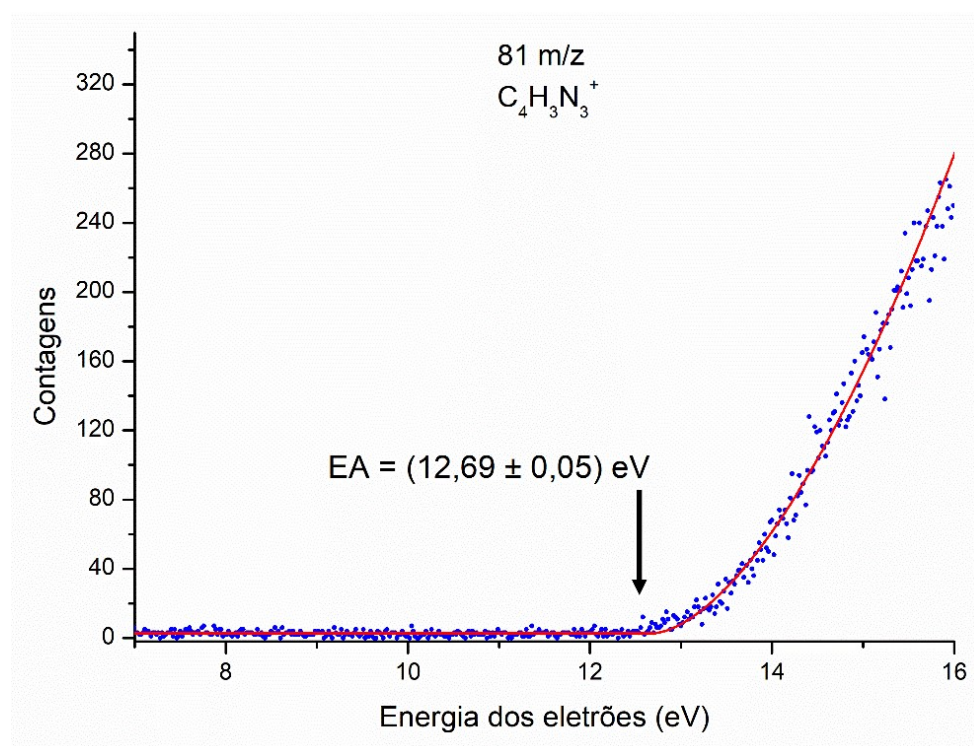


Figura 4.10 - Energia de aparecimento do íon 110 m/z ($C_4H_3N_3^+$). Calibração feita com Árgon.

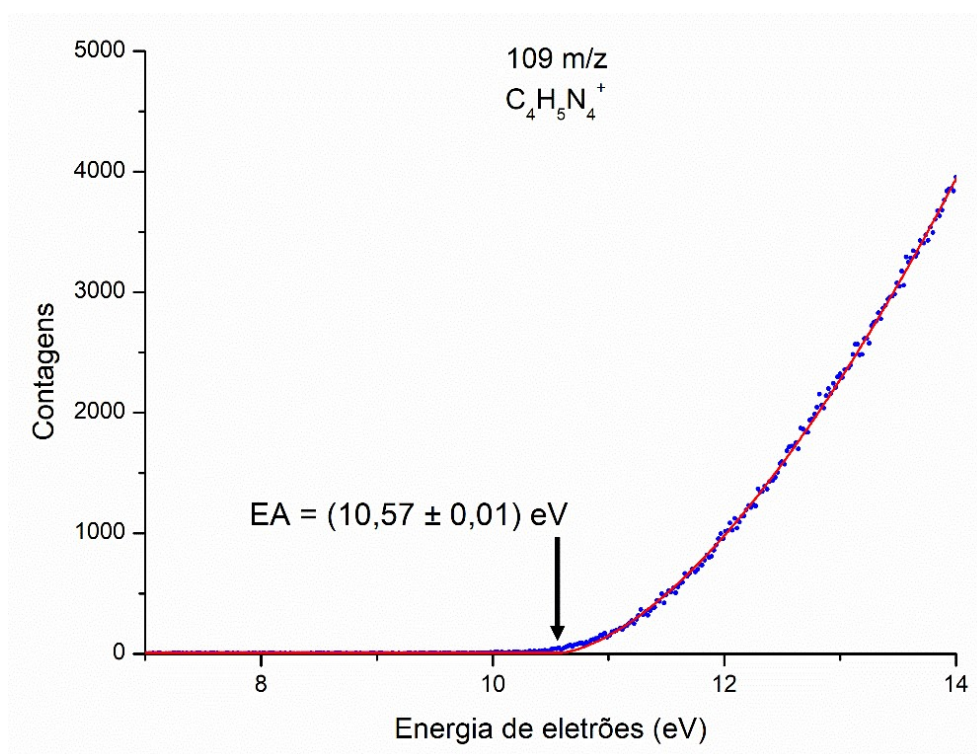


Figura 4.11 - Energia de aparecimento do íon 109 m/z ($C_4H_5N_4^+$). Calibração feita com Árgon.

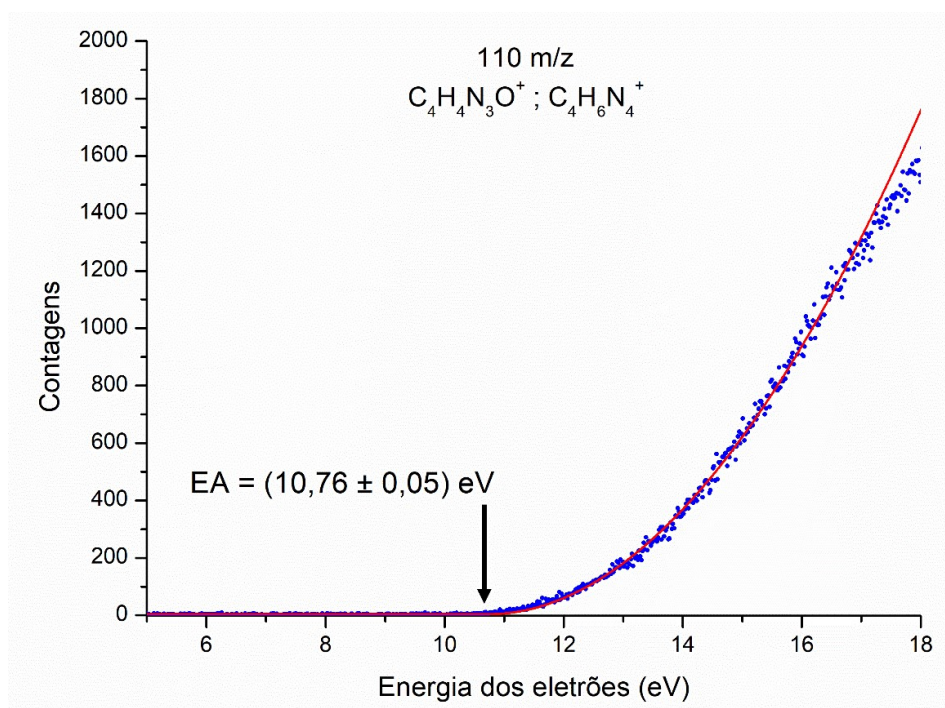


Figura 4.12 - Energia de aparecimento do íon 110 m/z ($C_4H_4N_3O^+$; $C_4H_6N_4^+$). Calibração feita com Árgon.

A Tabela 4.4 sumariza as energias de aparecimento calculadas para os íões (coluna central), com maior intensidade relativa formados no processo de ionização em impacto eletrônico.

Tabela 4.4 - Energias de Aparecimento experimentais.

m/z	Identificação	Energia de aparecimento (eV) Experimental
28	N_2^+ ; CH_2N^+	$16,92 \pm 0,08$
44	CH_2NO^+	$14,03 \pm 0,03$
54	$C_2H_2N_2^+$	$13,75 \pm 0,03$
71	$C_3H_5NO^+$	$12,00 \pm 0,46$
81	$C_4H_3N_3^+$	$12,69 \pm 0,05$
109	$C_4H_5N_4^+$	$10,57 \pm 0,01$
110	$C_4H_4N_3O^+$; $C_4H_6N_4^+$	$10,76 \pm 0,05$
126	$C_4H_6N_4O^+$	$8,17 \pm 0,02$

4.3 Formação de iões negativos em colisões com eletrões de baixa energia

Nesta secção são apresentados e discutidos os resultados das medidas de impacto electrónico com a molécula AIC em fase gasosa, na gama de energias de 0 a 12 eV. Os iões negativos formados por captura eletrónica dissociativa após a interação com o AIC são descritos nesta secção, bem como o processo de calibração em energia.

4.3.1 Calibração em energia

A primeira molécula de calibração utilizada foi o SF_6 , especificamente com foco na formação do ião SF_6^- . A escolha desta molécula, como já referido anteriormente, justifica-se pelo facto de estar muito estudada e reportada na literatura, sendo por isso possível garantir a correta calibração através da comparação dos resultados experimentais com os resultados da literatura. O ião SF_6^- apresenta uma ressonância muito bem definida e uma elevada secção eficaz a 0 eV (ver Figura 4.13), e, portanto, quando utilizamos o gás SF_6 para calibração e otimização do sistema experimental, garantimos que estamos com um feixe de eletrões com aproximadamente 0 eV de energia [8].

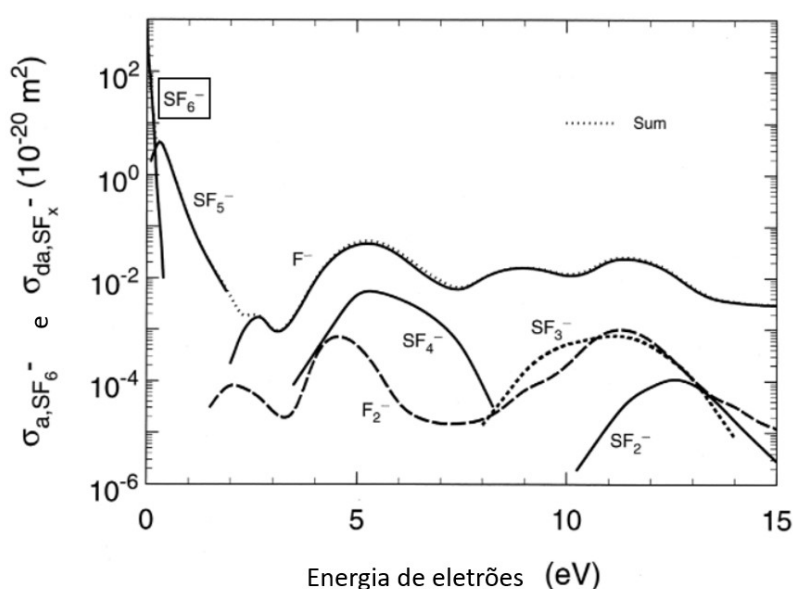


Figura 4.13 - Secções eficazes para formação de SF_6^- e outros fragmentos aniônicos produzidos através de CED.

Imagem adaptada da referência [8].

O processo de CED resultante da interação de elétrões com SF₆ e que leva à formação do ião SF₆⁻, é descrito pela equação 4.13.



O espectro bidimensional apresentado na Figura 4.14 representa a energia de elétrões incidentes em função da intensidade de iões SF₆⁻ formados num varrimento em energia de 0 a 10 eV. Os resultados experimentais apresentados foram obtidos com uma resolução em energia de 180 meV. No espectro verifica-se a formação do fragmento de massa 146 (SF₆⁻) a 0 eV com uma ressonância muito bem definida e de secção eficaz alta, tal como referido anteriormente,

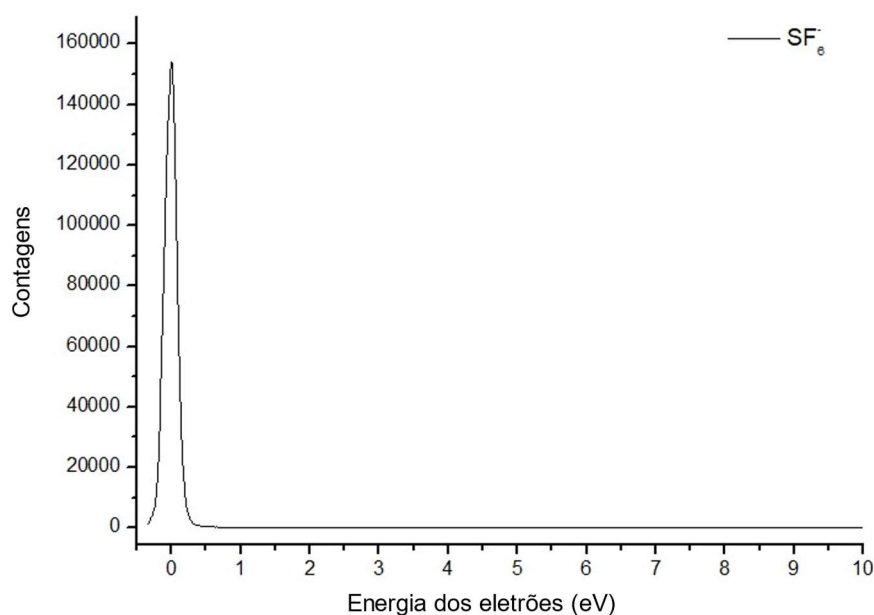


Figura 4.14 - Gráfico da intensidade de SF₆⁻ medido por captura eletrónica dissociativa em função da energia para a massa 146, resolução em energia de 180 meV.

A molécula tetracloreto de carbono, CCl₄, foi também utilizada para calibração em energia. Esta é uma molécula amplamente usada como composto de calibração, devido à elevada secção eficaz de formação do anião Cl⁻, a 0 eV. Foi obtido um espectro da energia de elétrões incidentes em função da intensidade de iões Cl⁻, com uma resolução de 210 meV, para o gás CCl₄, como observado no gráfico da Figura 4.15.

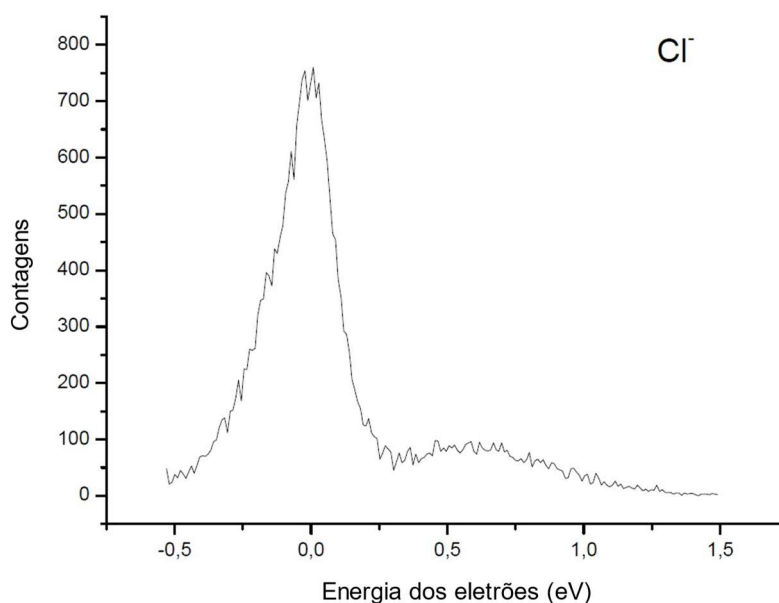


Figura 4.15 - Gráfico da intensidade de CCl_4 medido por captura eletrónica dissociativa em função da energia para a massa 35, (Cl^-), com uma resolução de 210 meV.

Analisando o espectro, foi possível identificar duas ressonâncias, que correspondem à formação de Cl^- , a energias de 0 eV e de 0,7 eV. Os resultados estão em concordância com os reportados no estudo de Matejcek *et al.* [66]. O processo de CED no CCl_4 com formação de Cl^- pode ser descrito pela equação 4.14.



O facto de o ião Cl^- se formar a 0 eV e a 0,7 eV significa que existem dois canais de dissociação possíveis para a formação deste fragmento, sendo que a 0 eV a secção eficaz é mais elevada.

4.3.2 AIC

Após calibração em energia e optimização do sistema experimental, foi estudada a molécula AIC na gama de energia dos 0 aos 12 eV. Foram detectados os canais de dissociação para a formação de iões negativos, e obtidos os espectros da energia de eletrões incidentes em função da intensidade de iões.

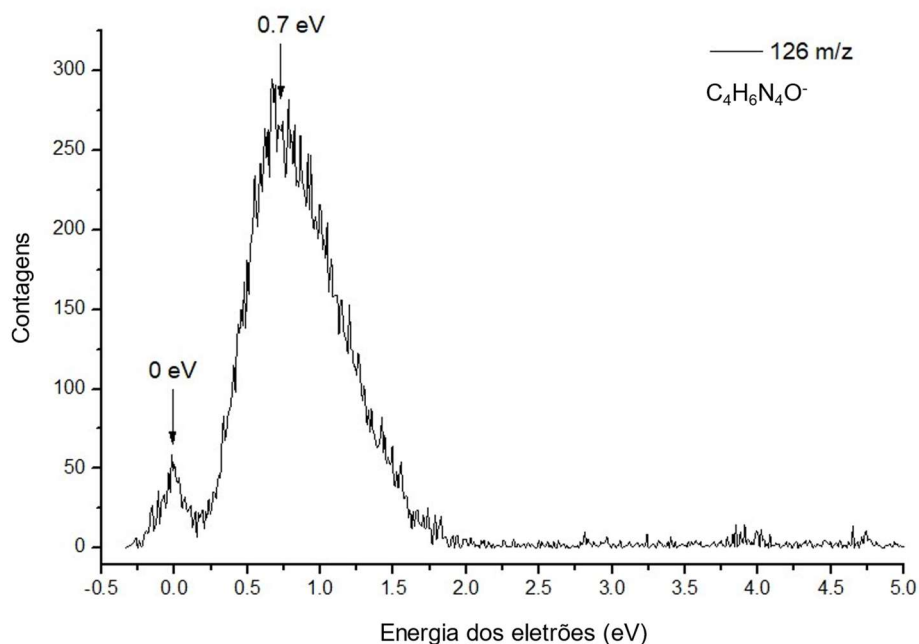
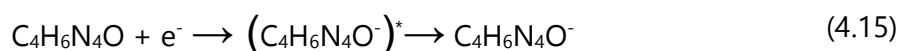


Figura 4.16 - Gráfico da intensidade de AIC medido por captura eletrônica dissociativa em função da energia para a massa 126 (ião pai/ C₄H₆N₄O⁻).

Na Figura 4.16 está representado o espectro da intensidade de iões formados em função da energia dos elétrons para o anião de massa 126 (ião pai). É possível ver que o espectro apresenta duas ressonâncias, localizadas a 0 eV e a 0,7 eV, o que significa que o mesmo se pode formar por dois canais distintos. A formação do ião pai por processo de captura eletrônica, é descrito pela equação 4.15.



Nesta equação percebe-se que, após captura eletrônica, o anião pai que se forma é energeticamente estável para manter o elétron ligado durante um período de tempo suficiente para ser detetado pela técnica de espectrometria de massa, antes de dissociar.

Os estudos teóricos ajudam a perceber os mecanismos subjacentes à formação do ião pai. Os cálculos teóricos verificaram que em fase gasosa ($T=373 \text{ K} \approx 100 \text{ }^\circ\text{C}$) a molécula de AIC é estável na forma de dois isómeros que diferem na rotação do grupo carboxamida (ver Figura 4.17), sendo que um dos isómeros possui 20% de abundância (isómero 1) e o segundo isómero 80% de abundância (isómero 2).

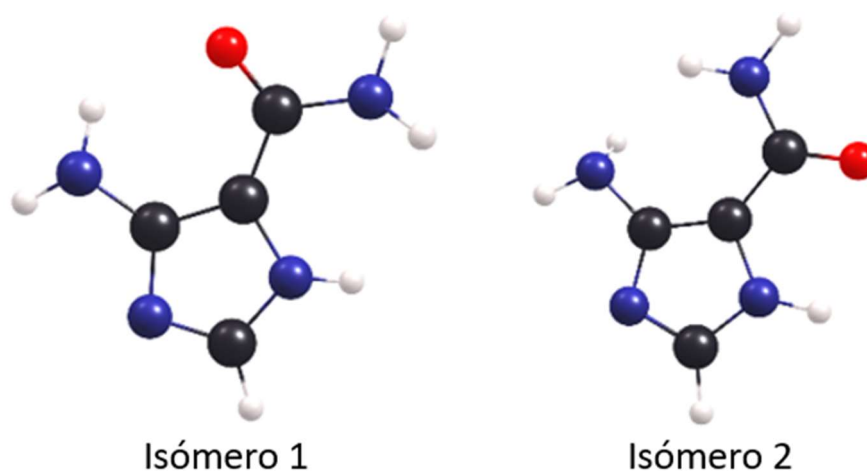
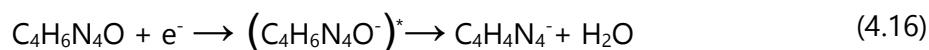


Figura 4.17 - Isómeros da molécula AIC. À esquerda o isómero 1 e à direita o isómero 2.

O isómero 1 possui um momento dipolar de 4,2 D. Sabe-se que quando as moléculas apresentam um momento dipolar superior a 2,5 D estão estabelecidas condições para que o eletrão seja capturado através de um estado ligado (*dipole bond state*) [67]. Isto significa que o eletrão é capturado numa orbital difusa, dando origem a formação de uma ressonância (~ 0 eV) do tipo *vibrational feshback ressonance* (VFR). A formação desta ressonância é também favorecida pelo facto do isómero 1 possuir uma eletroafinidade positiva (0,41 eV). Neste caso, o estado fundamental do ião pai ($MX^{\cdot-}$) está abaixo do estado fundamental da molécula neutra (MX), o que permite a formação de um anião molecular com tempo de vida suficiente para ser detetado. Segundo os cálculos teóricos, os dois isómeros apresentam uma ressonância a 0,7 eV, mas apenas o isómero 1 possui a ressonância a 0 eV. Esta conclusão teórica explica a maior intensidade da ressonância a 0,7 eV verificada experimentalmente, uma vez que a esta energia temos a formação do ião progenitor pelos dois isómeros, e por isso uma maior probabilidade do ião pai se formar. A 0 eV apenas o isómero 1 (menos abundante) apresenta ressonância, deste modo, a probabilidade de se formar o ião progenitor é menor, tal como verificado experimentalmente. O isómero 2, apresenta um momento dipolar de 1,6 D, inferior a 2,5 D e por isso não admite estados ligados do anião. Este isómero tem uma eletroafinidade negativa (-0,12 eV), logo não tem anião estável a 0 eV.

Estes resultados sugerem que os EBE são altamente eficientes na redução da molécula AIC através de captura eletrónica, com intensidade superior aos outros iões observados. Isto suporta a hipótese que a molécula AIC pode ter um papel central no mecanismo de ação da TMZ enquanto agente radiosensibilizador.

Neste estudo, foi também detetado o canal de dissociação para o ião de massa 108 ($C_4H_4N_4^-$) ainda que com abundância bastante reduzida, que se pode representar pela equação 4.16 que se apresentam de seguida.



Na Figuras 4.18 está representado o espectro da intensidade de iões obtidos experimentalmente para o ião referente à equação acima descrita em função da energia de elétrões incidentes.

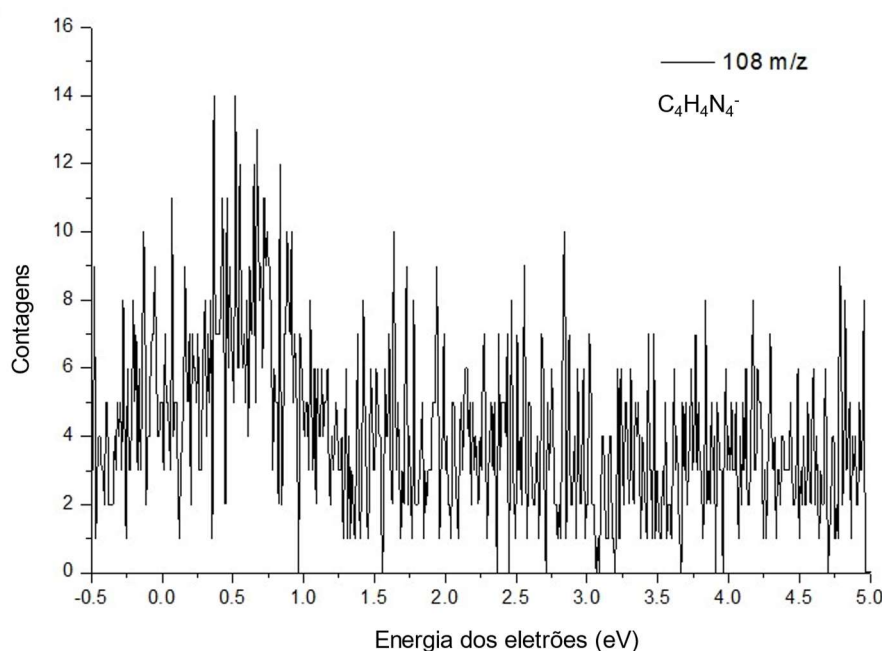


Figura 4.18 - Gráfico da intensidade de AIC medido por captura eletrónica dissociativa em função da energia para a massa 108 ($C_4H_4N_4^-$).

Pela equação 4.16, verifica-se que através de CED, a molécula de AIC pode também levar à formação do ião $C_4H_4N_4^-$ (108 m/z), com libertação da sua contraparte, que poder ser uma molécula de água ou a formação de radicais como (OH+H). Esta molécula de água, com excesso de energia, pode interagir com as moléculas que constituem o ambiente celular, e também com EBE, levando a produção de radicais livres (por exemplo $H^\bullet$, $OH^\bullet$ e $O^\bullet$), que por sua vez são espécies altamente reativas e que podem provocar danos irreversíveis na cadeia de ADN das células tumorais [30],[31]. Estes danos provocados pelos radicais livres provenientes

da reação da molécula de água com EBE, justificam a importância que a formação do ião $C_4H_4N_4^-$ tem para o efeito radiosensibilizador do AIC.

CONCLUSÕES

5.1 Conclusões

O presente estudo termina com a certeza de uma contribuição positiva para a compreensão dos mecanismos físicos e químicos desencadeados pela interação dos EBE com o radiosensibilizador TMZ, investigado através do metabolito final da sua cadeia de ação, a molécula AIC. O estudo focou-se na formação de iões positivos por processos de ionização eletrónica, bem como na formação de iões negativos através de captura eletrónica dissociativa, que se revela importante para o efeito radiosensibilizador da molécula. O estudo dos mecanismos físico-químicos subjacentes à radiosensibilização continua a ser uma área que desperta o interesse científico, uma vez que o aumento de informação e descobertas resultam na otimização e formulação de novos agentes radiosensibilizadores utilizados nos tratamentos para o cancro.

Durante o estudo da formação de iões positivos por processos de ionização em impacto eletrónico, foi possível identificar o padrão de fragmentação da molécula, tendo-se obtido o respetivo espectro de massa a 70 eV. Foram identificados os iões formados, bem como as respetivas intensidades relativas, tendo sido verificados os valores das energias de aparecimento de formação dos fragmentos positivos com maior intensidade relativa ($C_4H_6N_4O^+$ /ião pai, N_2^+/CH_2N^+ , CH_2NO^+ , $C_2H_2N_2^+$, $C_3H_5NO^+$, $C_4H_3N_3^+$, $C_4H_5N_4^+$ e $C_4H_4N_3O^+/C_4H_6N_4^+$). O resultado experimental obtido para a energia de aparecimento do ião $C_4H_6N_4O^+$ (ião pai) permitiu obter pela primeira vez a energia de ionização da molécula AIC ($8,17 \pm 0,02$) eV, que se revelou concordante com o valor teórico de 8,18 eV.

Através de medidas de impacto eletrónico com a molécula AIC em fase gasosa, na gama de energias de 0 a 12 eV, foi possível analisar a formação de iões negativos em colisões com

elétrões de baixa energia. Foram detectados os iões negativos $C_4H_6N_4O^-$ (ião pai), bem como o ião $C_4H_4N_4^-$, e obtidos os espectros da intensidade de iões em função da energia de elétrões incidentes. Na formação do ião pai, foi possível detetar duas ressonâncias (0 eV e 0,7 eV), sendo que a ressonância com maior intensidade acontece a 0,7 eV. Para o ião $C_4H_4N_4^-$, apenas foi detetado um canal de ionização a 0,5 eV, e verificou-se que na formação do referido ião é libertada uma molécula de água. Este mecanismo é muito relevante ao nível do efeito da radiação nas moléculas que constituem o ambiente celular, uma vez que, através da interação da molécula de água com EBE podem ser gerados radicais livres, que por sua vez podem provocar danos irreversíveis na cadeia de ADN.

A questão que motivou o presente tema de tese foi a compreensão dos mecanismos físicos e químicos desencadeados pela interação dos EBE com radiosensibilizador TMZ. Após o desenvolvimento dos trabalhos laboratoriais e respetiva análise de dados, foi possível concluir que os radicais e iões, gerados pela interação com os EBE com o potencial radiosensibilizador podem contribuir significativamente para a ação do radiosensibilizador.

5.2 Trabalho Futuro

A cronologia de execução de trabalhos começou pelo estudo da molécula AIC e tinha como objetivo seguir-se da análise da TMZ, infelizmente este segundo objetivo não pôde ser concluído devido ao prazo de realização da presente dissertação, e devido a problemas técnicos que surgiram no equipamento. O objetivo de entender de que forma os EBE contribuem para o efeito radiosensibilizador da TMZ em tratamentos de radioterapia foi alcançado através do AIC, que é um dos metabolitos finais da cadeia de ação, uma vez que a TMZ é metabolizada assim que atravessa a barreira hematoencefálica.

Em trabalhos futuros seria de especial interesse a medição e estudo da TMZ, de forma a perceber se esta reage com a radiação antes de ser metabolizada e tentar compreender de que forma isto tem impacto na radiosensibilização.

Adicionalmente seria interessante realizar o estudo de outra molécula de AIC existente no mercado, onde a posição do carboxamida difere relativamente à molécula utilizada no presente estudo. Este trabalho seria importante para perceber se ambas têm ou não o mesmo comportamento na interação com os EBE.

BIBLIOGRAFIA

- [1] World Health Organization, "Cancer." <https://www.who.int/health-topics/cancer> (accessed Dec. 07, 2020).
- [2] Serviço Nacional de Saúde, "Programas de Saúde prioritários," 2018. <https://www.sns.gov.pt/institucional/programas-de-saude-prioritarios/> (accessed Dec. 07, 2020).
- [3] OECD and European Union, Health at a Glance: Europe 2018: State of Health in the EU cycle. Paris: OECD, 2019.
- [4] National Research Council, Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. Washington, D.C.: National Academies Press, 2006.
- [5] C. R. Arnold, J. Mangesius, I. I. Skvortsova, and U. Ganswindt, "The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance," *Front. Oncol.*, vol. 10, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00164.
- [6] E. Arthur-Baidoo, J. Ameixa, P. Ziegler, F. Ferreira da Silva, M. Ončák, and S. Denifl, "Reactions in Tirapazamine Induced by the Attachment of Low-Energy Electrons: Dissociation Versus Roaming of OH," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 59, no. 39, pp. 17177–17181, 2020, doi: 10.1002/anie.202006675.
- [7] B. Boudaïffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, and L. Sanche, "Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons," *Science (80-.)*, vol. 287, no. 5458, pp. 1658–1660, 2000, doi: 10.1126/science.287.5458.1658.
- [8] L. G. Christophorou and J. K. Olthoff, "Electron attachment cross sections and negative ion states of SF₆," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 205, no. 1–3, pp. 27–41, 2001, doi: 10.1016/S1387-3806(00)00280-3.
- [9] I. Baccarelli, I. Bald, F. A. Gianturco, E. Illenberger, and J. Kopyra, "Electron-induced damage of DNA and its components: Experiments and theoretical models," *Phys. Rep.*, vol. 508, no. 1–2, pp. 1–44, 2011, doi: 10.1016/j.physrep.2011.06.004.

- [10] R. Stupp *et al.*, "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 10, pp. 987–996, 2005, doi: 10.1056/NEJMoa043330.
- [11] S. Parisi *et al.*, "Temozolomide and Radiotherapy versus Radiotherapy Alone in High Grade Gliomas: A Very Long Term Comparative Study and Literature Review," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, no. 620643, pp. 1–7, 2015, doi: 10.1155/2015/620643.
- [12] S. B. Nachbichler, G. Schupp, H. Ballhausen, M. Niyazi, and C. Belka, "Temozolomide during radiotherapy of glioblastoma multiforme," *Strahlentherapie und Onkol.*, vol. 193, no. 11, pp. 890–896, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00066-017-1110-4.
- [13] P. S. Roy and B. J. Saikia, "Cancer and cure: A critical analysis," *Indian J. Cancer*, vol. 53, no. 3, pp. 441–442, 2016, doi: 10.4103/0019-509X.200658.
- [14] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [15] P. Irigaray *et al.*, "Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 61, no. 10, pp. 640–658, 2007, doi: 10.1016/j.biopha.2007.10.006.
- [16] Sistema Nacional de Saúde, "Tipos de tratamento do Cancro," 2021. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/tipos-de-tratamento-do-cancro/> (accessed Jan. 09, 2021).
- [17] National Cancer Institute, "Types of Cancer Treatment." <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> (accessed May 10, 2021).
- [18] H. Choy, Ed., *Chemoradiation in cancer therapy*. New York: Springer Science & Business ; Media, LLC, 2003.
- [19] B. Yu-Lin, C. Xiang-Rong, Y. Xiang-Dong, and L. Peng-Fei, "Pseudopotential Density-Functional Calculations for Structures of Small Carbon Clusters C N (N = 2 ~ 8)," *Commun. Theor. Phys.*, vol. 41, no. 1, pp. 89–94, Jan. 2004, doi: 10.1088/0253-6102/41/1/89.
- [20] O. Desouky, N. Ding, and G. Zhou, "Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation," *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, vol. 8, no. 2, pp. 247–254, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.jrras.2015.03.003.
- [21] A. H. W. Nias, "Biological effects of radiation," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 44, no. 3, pp. 315–315, 1983, doi: 10.1080/09553008314551211.

- [22] E. Hall and A. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*, Eighth edi. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2019.
- [23] N. Shigematsu, J. Fukada, T. Ohashi, O. Kawaguchi, and T. Kawata, "Nuclear disaster after the Earthquake and Tsunami of March 11," *Keio J. Med.*, vol. 61, no. 1, pp. 28–34, 2012, doi: 10.2302/kjm.61.28.
- [24] G. O. P. Meneses, "Electron driven reactions in sulphur containing biological prototypes," Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Física à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2015.
- [25] J. F. F. Ameixa, "Collision Studies with Electro-Sprayed Biomolecules by," Ph.D. Dissertation, Faculty of Mathematics, Computer Science and Physics, University of Innsbruck Doctor and Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2020.
- [26] H. Varmus, "The new era in cancer research," *Science (80-.)*, vol. 312, no. 5777, pp. 1162–1165, 2006, doi: 10.1126/science.1126758.
- [27] C. J. Martin, D. G. Sutton, C. M. West, and E. G. Wright, "The radiobiology/radiation protection interface in healthcare," *J. Radiol. Prot.*, vol. 29, no. 2, 2009, doi: 10.1088/0952-4746/29/2A/S01.
- [28] K. Kamiya *et al.*, "Long-term effects of radiation exposure on health," *Lancet*, vol. 386, no. 9992, pp. 469–478, 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(15)61167-9.
- [29] E. Alizadeh, T. M. Orlando, and L. Sanche, "Biomolecular damage induced by ionizing radiation: The direct and indirect effects of low-energy electrons on DNA," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 66, pp. 379–398, 2015, doi: 10.1146/annurev-physchem-040513-103605.
- [30] K. Tanzer, L. Feketeová, B. Puschnigg, P. Scheier, E. Illenberger, and S. Denifl, "Reactions in Nitroimidazole Triggered by Low-Energy (0 - 2 eV) Electrons: Methylation at N1-H Completely Blocks Reactivity," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 45, pp. 12240–12243, 2014, doi: 10.1002/anie.201407452.
- [31] L. Gong, Y. Zhang, C. Liu, M. Zhang, and S. Han, "Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 16, pp. 1083–1102, 2021, doi: 10.2147/IJN.S290438.
- [32] S. Denifl, T. D. Märk, and P. Scheier, "The Role of Secondary Electrons in Radiation Damage," in *Radiation Damage in Biomolecular Systems*, G. G. Gómez-Tejedor and M. C. Fuss, Eds. Dordrecht: Springer, 2012, pp. 45–58.
- [33] I. Bald, J. Langer, P. Tegeder, and O. Ingólfsson, "From isolated molecules through clusters and condensates to the building blocks of life," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 277, no. 1–3, pp. 4–25, 2008, doi: 10.1016/j.ijms.2008.06.013.

- [34] R. Schürmann, S. Vogel, K. Ebel, and I. Bald, "The Physico-Chemical Basis of DNA Radiosensitization: Implications for Cancer Radiation Therapy," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 24, no. 41, pp. 10271–10279, 2018, doi: 10.1002/chem.201800804.
- [35] J. J. Munro, S. Harrison, M. M. Fujimoto, and J. Tennyson, "A dissociative electron attachment cross-section estimator," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 388, no. 1, p. 012013, Nov. 2012, doi: 10.1088/1742-6596/388/1/012013.
- [36] S. Ptasińska et al., "Bond selective dissociative electron attachment to thymine," *J. Chem. Phys.*, vol. 123, no. 12, p. 124302, Sep. 2005, doi: 10.1063/1.2035592.
- [37] R. M. Thorman, T. P. Ragesh Kumar, D. Howard Fairbrother, and O. Ingólfsson, "The role of low-energy electrons in focused electron beam induced deposition: Four case studies of representative precursors," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1904–1926, 2015, doi: 10.3762/bjnano.6.194.
- [38] O. Ingólfsson, Ed., *Low-Energy Electrons: Fundamentals and Applications*. London: Routledge Taylor & Francis Group, 2019.
- [39] J. N. Bull, J. W. L. Lee, and C. Vallance, "Absolute electron total ionization cross-sections: Molecular analogues of DNA and RNA nucleobase and sugar constituents," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, no. 22, pp. 10743–10752, 2014, doi: 10.1039/c4cp00490f.
- [40] H. Wang, X. Mu, H. He, and X.-D. Zhang, "Cancer Radiosensitizers," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 24–48, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.tips.2017.11.003.
- [41] C. J. Koch, M. B. Parliament, J. M. Brown, and R. C. Urtasun, "Chemical Modifiers of Radiation Response," in *Leibel and Phillips Textbook of Radiation Oncology*, 3rd ed., R. T. Hoppe, T. L. Phillips, and M. Roach, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2010, pp. 55–68.
- [42] H. Murshed, "Radiation Biology," in *Fundamentals of Radiation Oncology*, 3rd ed., H. Murshed, Ed. Academic Press Inc., 2019, pp. 57–87.
- [43] J. Overgaard, "Hypoxic radiosensitization: Adored and ignored," *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 26, pp. 4066–4074, 2007, doi: 10.1200/JCO.2007.12.7878.
- [44] S. Ramachandran, J. Ient, E. L. Göttgen, A. J. Krieg, and E. M. Hammond, "Epigenetic therapy for solid tumors: Highlighting the impact of tumor hypoxia," *Genes (Basel)*, vol. 6, no. 4, pp. 935–956, 2015, doi: 10.3390/genes6040935.
- [45] C. Avendaño and J. C. Menéndez, "Anticancer Drugs Acting via Radical Species: Radiotherapy and Photodynamic Therapy of Cancer," in *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 2015, pp. 133–195.
- [46] P. Wardman, "Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy," *Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 6, pp. 397–417, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.clon.2007.03.010.

- [47] J. Kopyra, A. Keller, and I. Bald, "On the role of fluoro-substituted nucleosides in DNA radiosensitization for tumor radiation therapy," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 13, pp. 6825–6829, 2014, doi: 10.1039/c3ra46735j.
- [48] National Cancer Institute, "Alkylating agent," NCI Dictionary of Cancer terms. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/alkylating-agent> (accessed Sep. 28, 2021).
- [49] W. J. Kil et al., "In vitro and In vivo Radiosensitization Induced by the DNA Methylating Agent Temozolomide," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 3, pp. 931–938, Feb. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1856.
- [50] J. Zhang, M. F.G. Stevens, and T. D. Bradshaw, "Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance," *Curr. Mol. Pharmacol.*, vol. 5, no. 1, pp. 102–114, 2011, doi: 10.2174/1874467211205010102.
- [51] J. R. Wesolowski, P. Rajdev, and S. K. Mukherji, "Temozolomide (Temodar)," *Am. J. Neuroradiol.*, vol. 31, no. 8, pp. 1383–1384, 2010, doi: 10.3174/ajnr.A2170.
- [52] I. C. Lopes, S. C. B. De Oliveira, and A. M. Oliveira-Brett, "Temozolomide chemical degradation to 5-aminoimidazole-4-carboxamide - Electrochemical study," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 704, pp. 183–189, 2013, doi: 10.1016/j.jelechem.2013.07.011.
- [53] J. Liu *et al.*, "Hypoxia induced ferritin light chain (FTL) promoted epithelia mesenchymal transition and chemoresistance of glioma," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1186/s13046-020-01641-8.
- [54] Y. Zheng, D. J. Hunting, P. Ayotte, and L. Sanche, "Role of secondary low-energy electrons in the concomitant chemoradiation therapy of cancer," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, no. 19, pp. 1–4, 2008, doi: 10.1103/PhysRevLett.100.198101.
- [55] H. Abdoul-Carime, M. A. Huels, E. Illenberger, and L. Sanche, "Sensitizing DNA to secondary electron damage: Resonant formation of oxidative radicals from 5-halouracils [4]," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 22, pp. 5354–5355, 2001, doi: 10.1021/ja003952d.
- [56] R. Meißner *et al.*, "Low-energy electrons transform the nimorazole molecule into a radiosensitiser," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10340-8.
- [57] J. Pereira-da-Silva et al., "Electron Driven Reactions in Tetrafluoroethane: Positive and Negative Ion Formation," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 32, no. 6, pp. 1459–1468, Jun. 2021, doi: 10.1021/jasms.1c00057.
- [58] W. C. Wiley and I. H. McLaren, "Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 26, no. 12, pp. 1150–1157, 1955, doi: 10.1063/1.1715212.

- [59] A. G. Marshall and C. L. Hendrickson, "High-Resolution Mass Spectrometers," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 579–599, Jul. 2008, doi: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.112945.
- [60] B. V. Pamplona, "Electron transfer to boronic acids in atom-molecule collisions," Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2018.
- [61] G. H. Wannier, "The threshold law for single ionization of atoms or ions by electrons," *Phys. Rev.*, vol. 90, no. 5, pp. 817–825, 1953, doi: 10.1103/PhysRev.90.817.
- [62] K. M. Weitzel, J. Mähner, and M. Penno, "ZEKE-PEPICO investigations of dissociation energies in ionic reactions," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 224, no. 3–4, pp. 371–380, 1994, doi: 10.1016/0009-2614(94)00567-2.
- [63] M. L. Williams, "CRC Handbook of Chemistry and Physics, 76th edition," *Occup. Environ. Med.*, vol. 53, no. 7, pp. 504–504, Jul. 1996, doi: 10.1136/oem.53.7.504.
- [64] R. C. Wetzel, F. A. Baiocchi, T. R. Hayes, and R. S. Freund, "Absolute cross sections for electron-impact ionization of the rare-gas atoms by the fast-neutral-beam method," *Phys. Rev. A*, vol. 35, no. 2, pp. 559–577, 1987, doi: 10.1103/PhysRevA.35.559.
- [65] R. L. Kelly, "Atomic and Ionic Spectrum Lines below 2000 Angstroms: Hydrogen through Krypton Part II," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 16, p. 651, 1987.
- [66] S. Matejčík, A. Kiendler, A. Stamatovic, and T. D. Märk, "A crossed beam high resolution study of dissociative electron attachment to CCl₄," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 149–150, no. C, pp. 311–319, 1995, doi: 10.1016/0168-1176(95)04265-M.
- [67] C. Desfrancois, "Determination of electron binding energies of ground-state dipole-bound molecular anions," *Phys. Rev. A*, vol. 51, no. 5, pp. 3667–3675, 1995, doi: 10.1103/PhysRevA.51.3667.



