

Gonçalo Nuno Pinto Domingos Martins

**TRANSFERÊNCIA DE ELECTRÃO EM BASES DE  
ADN POR COLISÕES ÁTOMO-MOLÉCULA**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências  
e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a  
obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Lisboa

2010



Departamento de Física

# **TRANSFERÊNCIA DE ELECTRÃO EM BASES DE ADN POR COLISÕES ÁTOMO-MOLÉCULA**

Gonçalo Nuno Pinto Domingos Martins

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

**Orientador:** Professor Doutor Paulo Manuel Assis Loureiro Limão Vieira

LISBOA

2010

*“Pedras no caminho? Guardo todas,  
um dia vou construir um castelo...”*

*Fernando Pessoa*

*Ao avô Manuel e à avó Zezínha  
À Guida por ser um pilar inabalável da minha vida!*

## Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, o Professor Doutor Paulo Limão-Vieira pelo seu profissionalismo, dedicação, disponibilidade e momentos de boa disposição, para além das oportunidades que me concedeu de conhecer outras realidades científicas em grupos com grande qualidade à escala mundial.

Aos Engenheiros Rodrigo Antunes e Diogo Almeida agradeço a paciência inicial na minha integração no grupo, os momentos de partilha de conhecimento que me proporcionaram e a boa disposição, apoio e amizade que sempre me manifestaram.

À Professora Doutora Maria Raposo e ao Professor Doutor Paulo Ribeiro agradeço todos os conselhos científicos, boa disposição e amizade.

Ao Professor Doutor André Wemans e ao Professor Doutor Yuri Nunes pelos conselhos científicos e por toda a ajuda prestada.

Agradeço a todos os elementos da linha 2 do CEFITEC, em especial ao Juscelino Ferreira e ao João Faustino pelos conselhos que me deram para além das constantes brincadeiras e bom ambiente que criaram.

Ao Dr. Paulo Gomes, pela sua incondicional amizade e apoio prestado no decorrer desta caminhada.

À Doutora Carla Madruga e ao Doutor João Lourenço pelos conselhos, apoio e companheirismo demonstrados.

Ao CEFITEC e ao Departamento de Física pelas condições de trabalho proporcionadas.

À D. Paula Correia e D. Ana Cruz pela disponibilidade e prontidão na resolução de problemas.

À D. Maria Helena Rodrigues pelo carinho, amabilidade e disponibilidade com que sempre me recebeu.

À Margarida, por ser sempre a minha companheira nestas inúmeras batalhas que se têm atravessado na minha vida. A ti agradeço-te do fundo do coração o apoio nos momentos maus (que não foram poucos) e motivação que me conseguiste transmitir.

Aos meus pais, Alfredo e Maria da Nazaré, por tudo o que me ensinaram e pelo apoio e motivação que me transmitiram. A vocês devo a minha formação e maneira de ser. Obrigado por estarem sempre comigo.

Ao Sr. António Coelho e à D. Maria José por serem os meus “segundos” pais. Os seus conselhos, amizade e carinho são já imprescindíveis na minha vida.

Aos Marcelo e ao André por serem os bons irmãos que são. As nossas conversas, companheirismo e amizade acompanhar-me-ão sempre.

Aos meus avós o meu muito obrigado por me terem ensinado tantas coisas...

À Carolina, pela sua amizade, dedicação e oração. Obrigado “picolita”!

Ao Ricardo Capote e ao José Daniel por terem sempre uma palavra sábia para me motivarem... Obrigado meus amigos...

A todos os meus amigos e familiares agradeço as palavras, conforto e momentos de boa-disposição que me motivaram para chegar até aqui...

A TI que estás aí em cima a ver-me... Agradeço-TE a força que sempre me deste e continuas a dar...

## Resumo

A identificação, interpretação e compreensão dos mecanismos desencadeadores de degradação no ADN à escala molecular é, nos dias de hoje, um assunto que suscita extremo interesse por parte da comunidade científica internacional. O interesse por este tema tem-se centrado na compreensão dos mecanismos que resultam da acção de espécies secundárias (ex. electrões) geradas a partir da interacção de radiação primária de elevada energia com o meio fisiológico, em especial com o ADN, podendo causar lesões mutagénicas e genotóxicas nesta molécula potenciando o aparecimento e desenvolvimento de patologias oncológicas. Esta dissertação centra-se particularmente no estudo da interacção de electrões de baixa energia com unidades elementares do ADN, nomeadamente a base timina, pelo processo de transferência de electrão. O objectivo principal deste trabalho é a identificação dos mecanismos moleculares que conduzem a degradação e que podem estar relacionados com os efeitos biológicos da interacção destas espécies secundárias em meio fisiológico. Para realizar este estudo recorreu-se a um aparelho de feixes moleculares cruzados, no qual é produzido um feixe neutro acelerado de potássio e um feixe molecular efusivo de timina. O primeiro é obtido à custa do processo de troca de carga ressonante, e o último é produzido num forno. Os átomos de potássio acelerados transferem o electrão de valência à molécula de timina, produzindo-se aniões negativos progenitores com excesso de energia interna, que fragmentando dão origem à formação de outras espécies aniónicas. A detecção destas espécies é feita por espectrometria de massa do tipo tempo de voo (TOF). A actual resolução do aparelho de feixes moleculares ( $\Delta m/m \approx 200$ ) permitiu a detecção de bastantes assinaturas espectrais, à custa das quais são descritos possíveis mecanismos multi-effectivos que resultam na criação de quebras de cadeia duplas e simples no ADN.

## Abstract

The evaluation, interpretation and understanding of the mechanisms responsible for DNA damage at the molecular level is currently a hot topic within the international scientific community. The quest for understanding these mechanisms has been focused on the real effects that may result from secondary species (e.g., electrons) produced after the interaction of high energy radiation with the physiological environment, leading to mutagenic and genotoxic damage within DNA, which in turn may increase the chance of oncologic pathologies development. The research described in this thesis is focused on the interaction of low energy electrons with DNA base units, such as thymine, by electron transfer processes. We are particularly interested to identify the molecular mechanisms that may lead to degradation and can actually be linked with the biological effects resulting from the interaction of secondary species with the physiological environment. Therefore, and in order to address this issue, we make use of a crossed molecular beam set-up where a fast neutral potassium beam and an effusive thymine molecular beam are produced. The former beam results from a charge exchange source and the latter is produced in a hot gas cell. When the fast atomic potassium beam interacts with thymine, the valence electron is transferred producing a negative parent ion with excess of internal energy, resulting in further fragmentation. Negative fragment ions are time-of-flight (TOF) mass analysed. The present TOF mass resolution ( $\Delta m/m \approx 200$ ) has allowed the assignment of the fragmentation patterns, resulting in a multi-effective mechanism description for single and double strand breaks within DNA.

## Simbologia e notações

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CED</b>	Captura electrónica dissociativa
<b>CE</b>	Captura electrónica
<b>TE</b>	Transferência de electrão
<b>ES</b>	Electrões secundários
<b>EBE</b>	Electrões de baixa energia
<b>TNI</b>	Ião temporário negativo
<b>AE</b>	Afinidade electrónica
<b>EI</b>	Energia de ionização
<b>AE<sub>ad</sub></b>	Afinidade electrónica adiabática
<b>AE<sub>v</sub></b>	Afinidade electrónica vertical
<b>ΔE</b>	Endoergicidade
<b>Δ<sub>f</sub>H<sub>g</sub><sup>o</sup></b>	Entalpia de formação do anião
<b>E<sub>diss</sub></b>	Energia de dissociação de ligação para criação do anião
<b>SSB</b>	“Single strand breaks” (quebras de cadeia simples)
<b>DSB</b>	“Double strand breaks” (quebras de cadeia dupla)
<b>LCAM</b>	Laboratório de Colisões Atómicas e Moleculares
<b>CEFITEC</b>	Centro de Física e Investigação Tecnológica
<b>DF</b>	Departamento de Física
<b>FCT</b>	Faculdade de Ciências e Tecnologia
<b>UNL</b>	Universidade Nova de Lisboa
<b>TOF</b>	Tempo de voo (espectrómetro)
<b>5-BrU</b>	5-bromouracilo
<b>C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Timina
<b>CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub></b>	Nitrometano
<b>CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub></b>	Nitrometano deuterado
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Óxido de alumínio
<b>OH<sup>o</sup></b>	Radical hidróxilo
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>H<sub>3</sub>O<sup>+</sup></b>	Catião hidrónio
<b>H<sup>o</sup></b>	Radical hidrogénio
<b>SF<sub>6</sub></b>	Hexafluoreto de enxofre
<b>e<sup>-</sup><sub>pre</sub></b>	Electrão pré-hidratado
<b>e<sup>-</sup><sub>hyd</sub></b>	Electrão hidratado
<b>K<sup>+</sup><sub>hip</sub></b>	Ião potássio hipertérmico

<b>K<sup>+</sup><sub>ter</sub></b>	Ião potássio térmico
<b>K<sup>0</sup><sub>hip</sub></b>	Átomo de potássio hipertérmico
<b>K<sup>0</sup><sub>ter</sub></b>	Átomo de potássio térmico
<b>s</b>	segundo (unidade de tempo)
<b>ps</b>	picossegundo ( $10^{-12}$ s)
<b>ns</b>	nanossegundo ( $10^{-9}$ s)
<b>μs</b>	microssegundo ( $10^{-6}$ s)
<b>h</b>	Constante de Planck, $6.626 \times 10^{-34}$ J.s <sup>-1</sup>
<b>v</b>	Frequência (Hz)
<b>mm</b>	Milímetro ( $10^{-3}$ m)
<b>Å</b>	Angstrom ( $10^{-10}$ m)
<b>mA</b>	Miliampère ( $10^{-3}$ A)
<b>Pa</b>	Pascal
<b>q</b>	Unidade de carga elementar ( $1,602 \times 10^{-19}$ C)
<b>μV</b>	Microvolt ( $10^{-6}$ V)
<b>u.m.a.</b>	Unidade de massa atómica ( $1,66 \times 10^{-27}$ Kg)
<b>W</b>	Energia dos iões (na descrição do TOF do tipo reflectrão)
<b>t<sub>TOF</sub></b>	Tempo total de voo
<b>t<sub>a</sub></b>	Tempo de voo na zona de extracção
<b>t<sub>b</sub></b>	Tempo de voo na zona de aceleração
<b>t<sub>D</sub></b>	Tempo de voo na zona livre de campo
<b>U</b>	Energia total da partícula
<b>U<sub>o</sub></b>	Energia cinética inicial
<b>U<sub>a</sub></b>	Energia potencial na zona de extracção
<b>U<sub>b</sub></b>	Energia potencial na zona de aceleração
<b>s</b>	Distância a partir do prato de extracção
<b>s<sub>o</sub></b>	Distância entre o centro de colisão e o prato de extracção
<b>d</b>	Comprimento da zona de aceleração
<b>E<sub>a</sub></b>	Campo eléctrico aplicado na zona de extracção
<b>E<sub>b</sub></b>	Campo eléctrico aplicado na zona de aceleração
<b>v<sub>o</sub></b>	Velocidade inicial do fragmento
<b>v<sub>b</sub></b>	Velocidade do fragmento na zona de aceleração
<b>v<sub>D</sub></b>	Velocidade do fragmento da zona livre de campo
<b>a<sub>a</sub></b>	Aceleração do fragmento na zona de extracção
<b>a<sub>b</sub></b>	Aceleração do fragmento na zona de aceleração
<b>ΔT<sub>m</sub></b>	Diferença de tempo de voo de duas massas consecutivas
<b>Δt<sub>ΔU</sub></b>	Diferença de tempo de voo devido à variação de ΔU
<b>Δt<sub>Δs</sub></b>	Diferença de tempo de voo devido à variação de Δs

<b><math>M_{\Delta s}</math></b>	Maior massa distinguível devido à variação de $\Delta s$
<b><math>M_{\Delta U}</math></b>	Maior massa distinguível devido à variação de $\Delta U$
<b><math>M_{total}</math></b>	Maior massa distinguível considerando $M_{\Delta U}$ e $M_{\Delta s}$

## Índice de Matérias

Agradecimentos .....	v
Resumo.....	vii
Abstract .....	viii
Simbologia e notações .....	ix
Índice de Matérias .....	xii
Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Tabelas .....	xvi
Capítulo 1. Introdução.....	1
Capítulo 2. Danos no ADN: O Papel dos Electrões de Baixa Energia.....	6
2.1. Generalidades .....	6
2.2. Processos de Captura Electrónica (CE).....	7
2.3. Captura Electrónica Dissociativa (CED) .....	8
2.4. Transferência de Electrão (TE).....	9
2.5. Criação de Lesões Directas e Indirectas no ADN.....	13
2.6. Radicais Livres.....	15
2.7. Radiólise da água.....	15
2.8. A Pré-Solvatação dos Electrões .....	16
2.9. Notas Finais .....	18
Capítulo 3. Descrição do método experimental .....	19
3.1. Generalidades .....	19
3.2. Sistema .....	20
3.2.1. Sistema de troca de carga.....	20
3.2.1.1. Forno.....	21
3.2.1.2. Câmara de troca de carga .....	21
3.2.1.3. Fonte de iões .....	21
3.2.2. Placas Deflectoras de iões "Tira-Iões" .....	23
3.2.3. Detector de ionização do tipo Langmuir-Taylor.....	23
3.2.4. Forno de Biomoléculas .....	24
3.2.5. Sistema de introdução de amostras gasosas e líquidas.....	25
3.2.6. Sistema de detecção de partículas.....	25
3.2.6.1. Fendas de colimação.....	25
3.2.6.2. Prato de extracção .....	26
3.2.6.3. 1ªRede de aceleração .....	26
3.2.6.4. 2ªRede de aceleração .....	26
3.2.6.5. Sistema de lentes Einzel.....	26

---

3.2.6.6. Pratos deflectores.....	26
3.2.6.7. Tubo de tempo de voo .....	27
3.2.6.8. Detector do tipo canaltrão .....	27
3.2.6.9. Sistema de tratamento e aquisição de sinal .....	28
3.2.7. Sistema de vácuo.....	29
3.3. Espectrometria de massa do tipo tempo de voo .....	33
3.4. Tempo de voo .....	35
3.4.1. Resolução Espacial .....	42
3.4.2. Resolução em Energia.....	45
3.4.3. Resolução total .....	47
3.5. Considerações ao método .....	47
3.6. O método de pulsação e suas desvantagens.....	48
□ $m_1 > m_2$ .....	50
□ $m_1 < m_2$ .....	50
3.7. Materiais.....	52
3.7.1. Nitrometano .....	52
3.7.2. Nitrometano deuterado .....	52
3.7.2. Timina .....	52
Capítulo 4. Resultados Experimentais.....	53
4.1. Considerações gerais.....	53
4.2. Interpretação de resultados.....	53
4.2.1. Calibração em massa .....	54
4.2.2. Nitrometano .....	57
4.2.3. Timina .....	63
4.3. Mecanismo multi-efectivo de produção de degradação no ADN .....	74
4.4. Notas finais .....	78
Capítulo 5. Conclusões e trabalho futuro.....	80
5.1. Conclusões.....	80
5.2. Trabalho futuro.....	82
Referências Bibliográficas .....	83

## Índice de Figuras

Figura 1.1.- Esquema identificativo das diferentes fases de interacção da radiação ionizante com ADN e os possíveis danos que dela advêm. ....	2
Figura 2.1.- Esquema indicativo das transições electrónicas associadas aos processos de captura electrónica de electrões livres (seta a verde) e electrões provenientes de uma espécie atómica (seta a cinzento). A molécula AB possui uma $AE_{ad}$ positiva (adaptado de). ....	12
Figura 2.2.- Esquema representativo dos efeitos directo e indirecto da radiação no ADN. Na acção directa, um electrão secundário interage com a molécula-alvo produzindo degradação enquanto que na acção indirecta são os radicais livres que interagem com a molécula-alvo (adaptado de ). ....	14
Figura 2.3. - Representação esquemática das principais espécies reactivas provenientes da radiólise da molécula de água (adaptado de <sup>25</sup> ). ....	16
Figura 2.4. - Representação esquemática do mecanismo de degradação do ADN proposto por <i>Wang et al.</i> (adaptado de ) ....	17
Figura 3.1. - Esquema do aparelho experimental. À direita na figura encontra-se a fonte de $K^+_{hip}$ assim como o forno de $K^0_{ter}$ , o qual está acoplado à câmara de troca de carga. À esquerda encontra-se o sistema de extracção e detecção por tempo de voo e o forno de biomoléculas. ....	20
Figura 3.2. - A figura 3.2. apresenta duas perspectivas da fonte emissora de $K^+$ . A figura a) diz respeito a um esquema representativo dos diferentes componentes do emissor. A figura b) evidencia o aspecto exterior do emissor utilizado no trabalho experimental. ....	23
Figura 3.3. - Esquema ilustrativo do sistema de tratamento e aquisição de sinal utilizado. ....	29
Figura 3.4. - Representação esquemática do sistema de vácuo utilizado. ....	30
Figura 3.6. - Esquema genérico de um sistema de tempo de voo de dois estágios. ....	35
Figura 3.7. - Representação de duas massas iguais criadas em diferentes localizações espaciais na zona de extracção (adaptado de <sup>22</sup> ). ....	42
Figura 3.8. - Esquema representativo do vector velocidade de dois fragmentos com massa idêntica criados na mesma posição na zona de extracção (adaptado de <sup>22</sup> ). ....	45
Figura 3.9.- Possível localização dos fragmentos 1 e 2 no início e no fim do impulso cuja largura é o tempo que o fragmento 1 leva a chegar à 1ª rede. ....	50
Figura 3.10. - Possível localização dos fragmentos 1 e 2 no início e fim de um impulso cuja largura é o tempo necessário para levar o fragmento 1 à 1ª rede de aceleração. ....	51
Figura 3.9. - Representação esquemática da molécula de nitrometano. ....	52

Figura 3.10 – Representação esquemática da molécula de nitrometano deuterado. ....	52
Figura 3.11. – Representação esquemática da molécula de timina. ....	52
Figura 4.1 – Curva utilizada para efectuar a calibração do espectrómetro TOF. ....	56
Figura 4.2 – Esquemas bidimensional e tridimensional da molécula de nitrometano. ....	57
Figura 4.3 - Espectro típico de nitrometano obtido a uma energia de colisão de 183 eV. No canto superior direito da imagem pode ver-se em maior pormenor a estrutura identificada do fragmento $O^-$ (adaptado de <sup>41</sup> ). ....	57
Figura 4.4 – Espectro típico da molécula de nitrometano obtido com a recente configuração de espectrómetro a uma energia de colisão de 100 eV. O espectro encontra-se normalizado ao pico de maior intensidade, neste caso o correspondente ao anião $NO_2^-$ . ....	58
Figura 4.5 - Espectros mais detalhados de determinadas zonas para a molécula de nitrometano resultantes de ampliações da figura 4.4. ....	59
Figura 4.6 – Figura demonstrativa da distinção dos fragmentos aniónicos $O^-$ e $OH^-$ à custa da deuteração da molécula de nitrometano. Na ampliação mais à direita encontra-se a zona do anião-progenitor e o seu correspondente deuterado. ....	60
Figura 4.7 – Espectro de nitrometano deuterado no qual se consegue visualizar a formação do fragmento $D^-$ . ....	61
Figura 4.7 – Esquemas bidimensional e tridimensional da molécula de timina. ....	63
Figura 4.8 – Espectro típico de timina obtido a uma energia de colisão de 100 eV (adaptado de <sup>22</sup> ). ....	64
Figura 4.9 – Espectro típico de timina obtido com a actual conformação do espectrómetro TOF, para uma energia de colisão de 100 eV. ....	64
Figura 4.11 – Esquema representativo da estrutura das moléculas de timina e uracilo. ....	68
Figura 4.13 – Espectros de timina (preto) e uracilo (vermelho) sobrepostos, tendo sido ambos obtidos para uma energia de colisão de 100 eV. ....	69
Figura 4.14 – Representações gráficas da evolução crescente na intensidade de produção de diversos fragmentos em função da energia de colisão. ....	71
Figura 4.15 – Gráficos identificativos do comportamento decrescente de alguns fragmentos em função da energia de colisão. ....	71
Figura 4.16 – Representação gráfica da variação das intensidades de alguns fragmentos resultantes da transferência de electrão entre átomos de potássio e moléculas de timina com a variação da energia do feixe projectil. ....	72
Figura 4.17 – Representação esquemática da dupla hélice do ADN com especial enfoque para o par de bases Timina-Adenina (adaptado de). ....	75

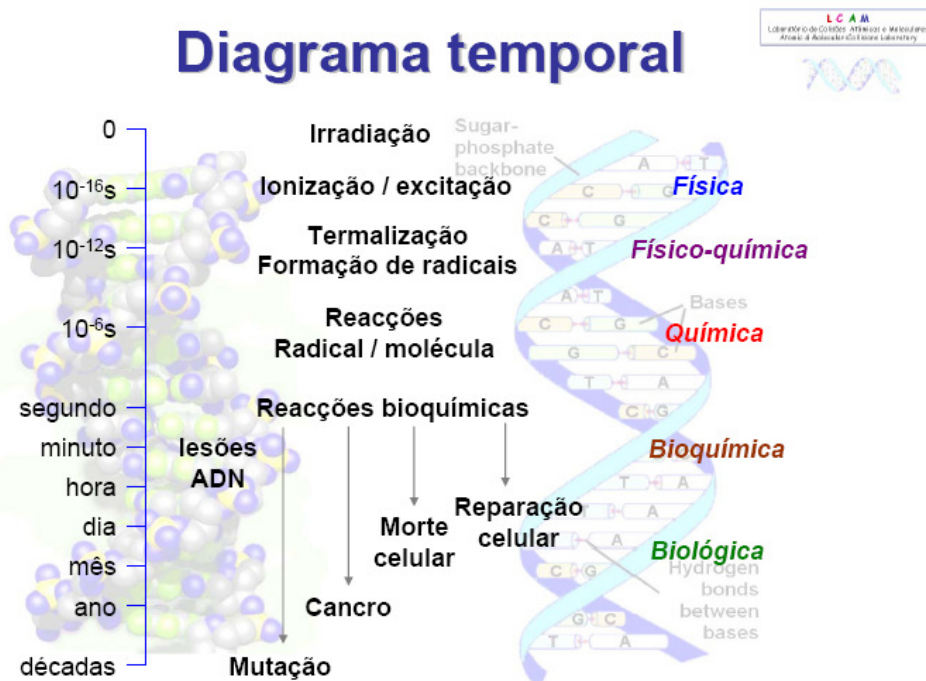
## Índice de Tabelas

Tabela 4.1- Tempo de voo das massas usadas para a calibração do espectrómetro tendo em conta a fragmentação conhecida <sup>41</sup> .....	54
Tabela 4.2 - Tempo de voo das massas usadas para a calibração definitiva do espectrómetro tendo em conta toda a fragmentação da molécula de nitrometano e dois fragmentos da molécula de timina (massas 55 u.m.a. e 125 u.m.a.).....	55
Tabela 4.3 - Padrões de fragmentação aniónicos da molécula de nitrometano identificados no trabalho actual e em estudos anteriores. ....	61
Tabela 4.4 - Tabela de comparativa dos padrões de fragmentação da molécula de timina segundo diversos autores e o estudo actual. ....	65
Tabela 4.5 - Entalpia de formação ( $\Delta_f H_g^0$ ) de diversos fragmentos tendo em conta a energia de dissociação das ligações ( $E_{diss}$ ) e a afinidade electrónica (EA). ....	67
Tabela 4.6 - Fragmentação em comum entre a molécula de uracilo estudada por <i>Denifl et al.</i> <sup>71</sup> e a molécula de timina estudada para esta dissertação. ....	68
Tabela 4.7 - Tabela de comparação de fragmentação e intensidade de fragmentação para energias de feixe de 30 eV, 70 eV e 100 eV.....	70

## Capítulo 1. Introdução

A principal motivação desta dissertação de mestrado incide no estudo dos processos de transferência de electrão em bases isoladas de ADN (Ácido desoxirribonucleico), nomeadamente a Timina ( $C_5H_6N_2O_2$ ), recorrendo a uma técnica de feixes moleculares cruzados, com o objectivo de identificar os mecanismos de fragmentação que tornam os electrões num dos principais agentes desencadeadores de degradação à escala molecular ao nível do ADN<sup>1</sup>. O processo propriamente dito consiste em colisões átomo-molécula nas quais um electrão é transferido de um átomo dador para um alvo molecular, sendo a sua fragmentação posteriormente detectada por meio de um espectrómetro de massa do tipo tempo de voo (TOF).

Ao longo da última década, uma das áreas de investigação médica com maior preponderância à escala global centra-se no estudo dos diversos processos associados a alterações ao nível celular de organismos vivos, nomeadamente os processos que conduzem ao aparecimento de uma das patologias que maior taxa de mortalidade ostenta: o cancro. Dentro deste tipo de investigação, um dos processos mais relevantes do ponto de vista de alteração celular está associado aos efeitos directo e indirecto da radiação ionizante e nos mecanismos que potenciam essas alterações, também denominados por agentes carcinogénicos. No caso da radiação ionizante, sabe-se que pode potenciar danos celulares desde o instante de interacção até vários anos, alterando fisiologicamente o organismo com que interacciona. Na figura 1.1 pode visualizar-se um diagrama temporal aceite pela comunidade científica internacional, no qual são identificadas as diversas fases desde a irradiação de material celular até à degradação do ADN, notando-se que a fase que surge imediatamente após a exposição é denominada por Fase Física. Assim, parece relevante a compreensão dos mecanismos que esta fase desencadeia dado que antecede outras cujas severidades podem culminar em diversas alterações bioquímicas e mesmo morfológicas, que em última instância potenciam o desenvolvimento de patologia oncológica.



**Figura 1.1.- Esquema identificativo das diferentes fases de interacção da radiação ionizante com ADN e os possíveis danos que dela advêm<sup>2</sup>.**

Ao interagir com o ADN existente no interior das células, a radiação ionizante (raios X, raios gama, iões, prótons e electrões) pode provocar danos ao genoma que, por sua vez, levam à morte celular. É por essa razão que este tipo de radiação é usado em tratamentos radioterapêuticos com o intuito de destruir células cancerígenas. Contudo, embora a sua acção seja bastante eficaz, pode produzir também outros danos, especialmente em células saudáveis vizinhas, que podem iniciar o desenvolvimento de mais células cancerígenas<sup>3</sup>. Então, para melhor compreender os mecanismos resultantes da acção da radiação, que podem ser também eles, resultantes dos processos radioterapêuticos, é necessário conhecer em detalhe os processos que conduzem a degradação celular provocada pela radiação, minimizando potenciais efeitos mutagénicos adversos. Na realidade, a interacção da radiação ionizante com os constituintes fisiológicos, que desencadeiam alterações estruturais, não pode ser apenas descrita na evidência macroscópica dessas alterações, i.e., apenas na deposição de energia, mas também pelos mecanismos desencadeados a nível molecular. Qualquer manifestação fisiológica da acção da radiação tem como origem alterações a nível das estruturas moleculares. Em suma, a compreensão de tais fenómenos que desencadeiam estas alterações requer um grande conhecimento dos processos moleculares envolvidos.

Presentemente está bem documentado na literatura e aceite na comunidade científica internacional que da acção da radiação ionizante se produzem diversas espécies secundárias (electrões secundários, radicais livres, espécies iónicas, radiólise da água) que podem ser mais reactivas ou potencialmente mais deteriorantes que a radiação primária que lhes deu origem.

O ADN enquanto estrutura molecular em equilíbrio não possui qualquer elemento que possa funcionar como transportador de cargas livres, pelo que, numa tentativa de aproximação à fenomenologia que ocorre ao nível celular, é de todo útil estudar mecanismos alternativos pelos quais os electrões se podem ligar ao ADN, contribuindo para a sua degradação em condições fisiológicas. Os electrões de baixa energia são extremamente eficazes a induzir este tipo de reacções químicas, que podem ser também alargadas a outras áreas como o são a dos filmes finos, plasmas, aerossóis e processos de excitação (e ionização) nas camadas externas da atmosfera, entre muitas outras. No caso dos electrões e, ao contrário do que se passa com fotões, a energia necessária para induzir dissociação a uma molécula pode ser de apenas alguns meV. O mecanismo responsável por este tipo de dissociação é conhecido por Captura Electrónica Dissociativa (CED), no qual um electrão, de energia abaixo do limiar de ionização e excitação electrónica, ao incidir numa molécula é capturado por esta dando origem a um fragmento negativo e outros produtos neutros de fragmentação. São posteriormente estes fragmentos neutros, por vezes radicais, que iniciam uma nova cadeia de eventos químicos no meio em que estão inseridos.

No que diz respeito à interacção de electrões de baixa energia com material celular, existem alguns trabalhos recentes nesta área da biofísica, os quais permitem explicar a criação de danos ao nível do ADN por radiação ionizante tendo centrado muita da atenção em torno da comunidade científica. Segundo *Sanche et al.*<sup>1</sup>, e posteriormente *Huels et al.*<sup>4</sup>, os electrões de baixa energia têm a capacidade de induzir danos ao nível do ADN, provocando quebras de cadeia simples e de cadeia dupla para energias dos electrões muito específicas. Estas regiões denominadas de "ressonantes" coincidem com as energias às quais a CED produz dissociação molecular em bases de ADN. Posteriormente, *Wang et al.*<sup>5</sup> reportou uma descoberta deveras extraordinária, segundo a qual electrões que tenham perdido toda a energia cinética e portanto encontrando-se em meio fisiológico num estado de pré-solvatação, também conseguem reagir com as cadeias de ADN intracelular. Esta descoberta veio evidenciar ainda mais a importância do papel dos electrões de baixa energia ao nível celular.

Outros estudos mais específicos foram também desenvolvidos, nomeadamente por *Ptasinska et al.*<sup>6,7</sup>, sendo identificada a selectividade dos

processos de CED tanto ao nível da ligação (C-H versus C-N) como quanto à posição de interacção (N1-H versus N3-H) nas bases de ADN isoladas, mais concretamente nas pirimidinas (timina e uracilo).

No seguimento destes estudos pioneiros, pode então afirmar-se que foi encontrado um novo modelo de interacção a energias baixas para a criação de danos ao nível do ADN. Resumindo, neste modelo os electrões de baixa energia produzidos a partir de radiação primária induzem processos de CED em locais específicos da hélice do ADN, conduzindo à formação de iões temporários negativos (TNI), os quais ao decaírem em face dos seus tempos médios de vida muito curtos ( $\sim 10^{-13}$  s) podem levar à perda de integridade do ADN em locais específicos.

No entanto, existem alguns processos colisionais elementares que não dependem do impacto directo de electrões mas sim de processos de transferência de electrão. Provavelmente estes são mais relevantes em condições fisiológicas, uma vez que não é esperada uma grande densidade de electrões livres mas sim de electrões provenientes de processos de ionização de espécies atómicas e moleculares – tais electrões são denominados de electrões “ligados”. A transferência de electrão em colisões átomo-molécula é geralmente mediada pelo cruzamento das superfícies de energia potencial do complexo neutro  $M+AB$  e iónico  $M^++AB^-$ , onde M é o átomo dador (no caso particular desta tese é um átomo alcalino) e AB é a molécula receptora de electrão. Segundo *Kley et al.*<sup>8</sup>, para grandes distâncias entre átomo e molécula, a superfície de energia potencial iónica está acima da covalente, contudo, devido ao potencial de Coulomb do complexo de colisão  $[M^++AB^-]^*$  existe um ponto de cruzamento a curta distância no qual as duas superfícies tomam o mesmo valor. Tal interacção leva à formação de um ião positivo e um anião molecular, permitindo o acesso a estados moleculares que não são acessíveis por captura electrónica de electrões livres<sup>9,10</sup>.

Ao estabelecer um paralelismo com os processos de interacção de moléculas com electrões livres, tendo especial atenção aos padrões de fragmentação do anião molecular progenitor, esta técnica permite um estudo mais completo dos mecanismos que podem levar à formação de iões negativos na estrutura de dupla hélice do ADN, os quais poderão conduzir a uma subsequente ruptura na integridade da estrutura helical por meio de quebras simples e duplas nas cadeias de ADN.

No que diz respeito à estrutura da dissertação começa-se no capítulo 2 por uma breve introdução teórica aos conceitos e mecanismos que se pretendem estudar com o aparelho de feixes moleculares cruzados, bem como a relevância científica destes fenómenos ao nível molecular. No capítulo 3 faz-se uma descrição de todo o dispositivo experimental, com especial atenção ao espectrómetro de

massa do tipo tempo-de-voo linear (TOF), que, devido ao facto de ter sido completamente projectado e construído no Laboratório de Colisões Atómicas e Moleculares (LCAM) da Linha 2 do Centro de Física e Investigação Tecnológica (CEFITEC), merece alguma atenção mais pormenorizada. No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos para as moléculas de nitrometano ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ , usado neste caso como molécula calibrante do espectrómetro TOF) e de timina, assim como a sua análise, tentando-se sempre estabelecer uma analogia com os possíveis processos que podem acontecer em meio fisiológico. O capítulo 5 é composto pelas conclusões ao trabalho efectuado e perspectivas futuras.

## Capítulo 2. Danos no ADN: O Papel dos Electrões de Baixa Energia

Neste capítulo pretende dar-se a conhecer alguns fenómenos importantes no que diz respeito aos processos de Captura Electrónica (CE) e Captura Electrónica Dissociativa (CED), para além do objecto de estudo desta tese que é o processo de Transferência de electrão (TE), tendo em vista a importância deste processo na degradação das unidades elementares do ADN quando exposto à radiação. Para melhor perceber todos estes processos, são apresentadas seguidamente algumas descrições que permitem facilitar a sua contextualização e compreensão.

### 2.1. Generalidades

Ao longo do último século foram desenvolvidos inúmeros trabalhos de investigação com o intuito de perceber as alterações provocadas pela acção (directa e indirecta) de radiação de elevada energia em sistemas biológicos, mais propriamente no ADN e no tecido celular vivo.

A grande maioria dos efeitos biológicos que resultam da acção da radiação de elevada energia não está associada à sua interacção directa com material biológico, sendo ao invés, desencadeados por espécies secundárias, as quais são provenientes dessa mesma interacção<sup>3</sup>. À medida que estas espécies reagem com células irradiadas, criam-se condições propícias a lesões mutagénicas, genotóxicas e outras potencialmente letais para o ADN<sup>11,12,13,14</sup>, como por exemplo, modificações estruturais nas bases e nas estruturas das (desoxi)riboses (açúcares), libertação de bases, quebras de cadeia simples, quebras de cadeia dupla, entre outras<sup>2,3,5,15</sup>. É neste contexto que os electrões secundários (ES) têm um papel fundamental, dado que são a espécie mais abundante de todas as espécies secundárias. Está perfeitamente documentado que por cada 1 MeV de energia incidente se geram cerca de  $5 \times 10^4$  electrões secundários (com uma distribuição de energias entre 1 e 20 eV aproximadamente) ao ser depositado em material biológico<sup>1</sup>. Uma vez criados, estes electrões de baixa energia (EBE), podem dar origem à formação de grandes quantidades de radicais reactivos, catiões e aniões, até serem perfeitamente termalizados em meio fisiológico. As espécies reactivas produzem novos compostos e estes danificam biomoléculas no interior das células irradiadas, como o são o ADN, moléculas de água e outras biomoléculas em contacto próximo com a água intracelular, caso das proteínas. Assim, torna-se evidente a grande importância dos EBE, dada a sua capacidade para quebrar directa ou indirectamente o ADN. Como tal, é de todo crucial determinar a acção

dos EBE nas células, particularmente no ADN, dada a sua capacidade de potenciar danos genotóxicos.

## 2.2. Processos de Captura Electrónica (CE)

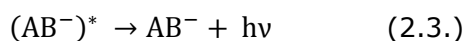
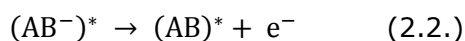
Para compreender os processos que ocorrem com moléculas biológicas, e esclarecendo alguns conceitos que são fundamentais, comece-se por estudar o processo de captura electrónica de um electrão livre. Considere-se então o seguinte mecanismo:



Neste caso o electrão ( $e^{-}$ ) interage com a molécula ( $AB$ ) sendo “*capturado*” temporariamente. Cria-se um ião temporário negativo (*Temporary Negative Ion - TNI*) num estado denominado de metaestável. Ao longo do tempo (escala de ps), o ião molecular evolui, podendo seguir diversos processos, sendo que o estado final é característico do TNI formado.

Neste tipo de processos a interacção é *ressonante*, o que significa que o electrão passa uma quantidade de tempo significativamente grande ( $10^{-12}$  a  $10^{-13}$  s) “*agregado*” à molécula em relação ao tempo que levaria a passar pela mesma ( $10^{-15}$  a  $10^{-16}$  s). O facto de a interacção ser mais prolongada pode permitir o aparecimento de certos mecanismos, tais como o acesso a estados excitados electrónica e vibracionalmente (vibrónicos) do TNI.

Como referido anteriormente, após a interacção descrita na equação 2.1 forma-se um ião temporário negativo, o qual possui tempos de vida que dependem tanto da energia do processo como do tamanho da molécula em causa. Como tal, o tempo de vida pode tomar valores que vão desde alguns períodos vibracionais (da ordem de  $10^{-14}$  s), até alguns microssegundos no caso de moléculas poliatómicas. Um caso bastante conhecido é o do ião molecular  $SF_6^{-}$ , que possui tempos de vida de alguns microssegundos. Após a formação do TNI, a reacção pode tomar três caminhos distintos<sup>16</sup>:



A equação (2.2) representa a auto-libertação do electrão (do inglês: *auto-dettachment*). Neste tipo de reacção a molécula fica novamente neutra não sofrendo qualquer tipo de dissociação. Contudo, esta pode ficar num estado

vibracional excitado. Trata-se de um processo ressonante que ocorre a energias muito baixas (próximas de 0 eV), para as quais não se torna acessível nenhum canal dissociativo que origine fragmentos estáveis. O tempo típico de interacção deste processo pode ir até alguns microssegundos para moléculas maiores (caso do SF<sub>6</sub>), contudo, possui normalmente tempos da ordem dos 10<sup>-12</sup> a 10<sup>-14</sup> s, o que torna o processo competitivo com a dissociação (equação 2.4.).

No que diz respeito à equação (2.3.), a molécula tenta "acomodar" o electrão extra, no entanto, o excesso de energia interna do sistema provoca a libertação de um fóton com energia igual à deste excesso, facto pelo qual o processo é designado por *estabilização radiativa*. Ao contrário dos outros canais de saída, este possui tempos de reacção típicos da ordem dos 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-9</sup> s, o que implica que o processo não seja competitivo com os restantes.

Por último, a equação (2.4.) refere-se a um processo designado de *captura electrónica dissociativa*, que, ao nível molecular pode surgir como o processo mais importante no que diz respeito à produção de danos moleculares em estruturas biológicas. Neste processo em particular, o TNI ou também referido como *ião-progenitor*, acaba por se dissociar devido, por um lado, à instabilidade causada pela acomodação temporária de um electrão extra, o que altera o potencial intramolecular, e, por outro lado, ao excesso de energia interna, o que faz com que o TNI passe a um estado excitado. A existência de fragmentos depende maioritariamente da energia do electrão incidente, pois provém de um processo ressonante. Este processo ocorre em escalas temporais semelhantes às do processo de auto-libertação, havendo competição entre os dois. Adicionalmente, e para além da dependência da energia do electrão incidente, junta-se ainda a particularidade do processo ser dependente da posição, isto é, o grupo ou átomo onde o electrão interacciona com a molécula. Desta forma, pode afirmar-se que os processos de captura electrónica são selectivos quanto à localização na estrutura molecular, fenómeno este designado por *selecção em relação à posição* ou do inglês "*site selective*". Por outro lado, os processos de CED evidenciaram também selectividade quanto à ligação química, pelo que o fenómeno toma também o nome de *selecção em relação à ligação* ou do inglês "*bond selective*"<sup>6,7</sup>.

### 2.3. Captura Electrónica Dissociativa (CED)

No que diz respeito a este processo em particular, os EBE produzidos pela acção da radiação primária (raios X, partículas alfa, raios  $\gamma$ ), induzem CED em locais específicos da dupla hélice do ADN formando *iões transientes* ou *progenitores* que subsequentemente decaem formando radicais e outros iões estáveis os quais levam à ruptura desta mesma hélice<sup>17</sup>. A taxa de efectividade do mecanismo é

definida pela formação do *ião-progenitor*, então, as quebras padrão das cadeias de ADN devem seguir as secções eficazes de CED das moléculas-alvo. A correlação observada entre os padrões de danos no ADN e as secções eficazes de CED para as bases de ADN suportam este modelo, que fornece ainda uma explicação coerente acerca da correlação entre as taxas de CE em biomoléculas e a sua capacidade de indução de carcinogénese, o que faz com que possa ser usado na sugestão de novos compostos a ser adoptados em radioterapia como activantes de radiosensibilidade no decorrer de tratamentos radioterapêuticos. Por exemplo, as propriedades radiosensibilizadoras do 5-bromouracilo (5-BrU) são conhecidas desde o final da década de 50<sup>18,19</sup>, tendo sido feita a substituição em células de algumas timinas na cadeia de ADN por este composto, o que mostrou um aumento na frequência tanto de quebras simples como duplas do ADN para além de alterações cromossomais. Recentemente, *Abdoul-Carime et al.*<sup>20</sup>, efectuaram um estudo de CED com esta molécula, no qual concluíram que a radiosensibilidade do 5-BrU deve-se a uma cadeia de decomposição bastante complexa, segundo a qual, para electrões numa gama de energias inferior (0 - 7eV) às referidas no estudo de *Leon Sanche et al.*<sup>1</sup>, dão origem à produção de vários aniões e radicais, os quais podem reagir com o ADN provocando danos, em adição aos anteriormente previstos.

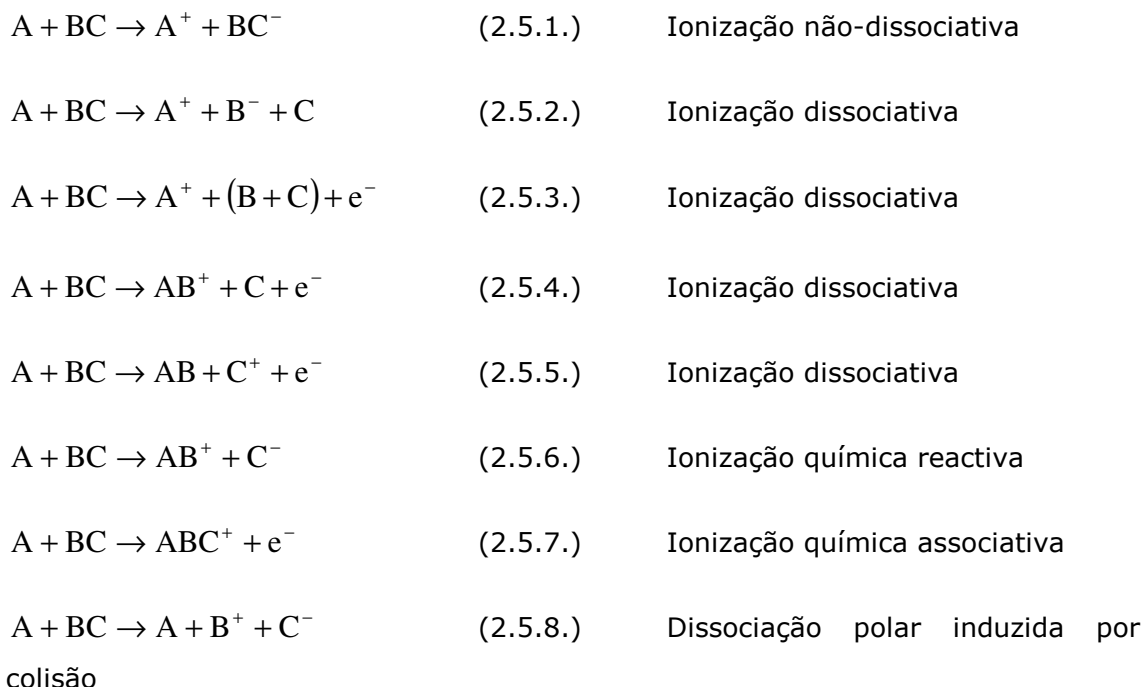
Apesar de todas as conclusões pertinentes que podem ser retiradas dos processos de CE, existem ainda alguns processos colisionais, os quais não se devem ao impacto de electrões mas dependem fundamentalmente de um processo denominado de transferência de electrão (TE).

#### **2.4. Transferência de Electrão (TE)**

Tal como foi referido na secção anterior, os processos de CE revelam-se insuficientes como modelo explicativo dos fenómenos de degradação do ADN em meio fisiológico, dado que, neste tipo de condições não existem electrões livres. Para tal, o processo de transferência de electrão (TE), permite descrever o tipo de interacção de forma mais fiel ao que se passará meio celular, usando electrões que se encontram previamente ligados a estruturas atómicas ou moleculares.

Como forma de conseguir viabilizar este processo são usados átomos com capacidade de doar electrões também chamados de "dadores de electrões". Como é sabido, e devido à sua estrutura atómica, são usados para este efeito metais alcalinos, os quais, ao interagirem com a molécula a estudar, podem transferir o seu electrão de valência para a molécula-alvo, sendo este processo favorecido ou não, tendo em conta a afinidade electrónica (AE) molecular.

Neste caso, aquando da colisão átomo-molécula, os intervenientes na colisão encontram-se inicialmente neutros, podendo posteriormente interagir segundo as reacções indicadas abaixo:



Ao analisar atentamente as reacções indicadas pelas equações 2.5.1. a 2.5.8. pode concluir-se que, na generalidade, o processo de transferência de carga se decompõe em dois passos: 1) É necessário que A seja ionizado na vizinhança da molécula BC; 2) O electrão libertado por A terá de ser capturado pela molécula BC formando um TNI.

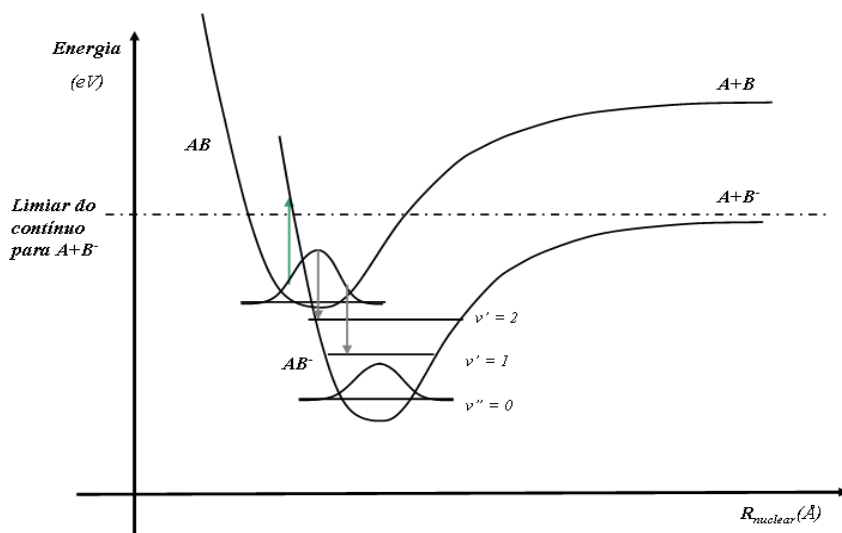
Embora a essência do processo de TE tenha sido já abordada, existem ainda alguns factores muito importantes a referir. Neste processo existem duas grandezas fundamentais a ter em conta. Em primeiro lugar a energia de ionização do átomo dador de electrão (EI(A)), que, no caso do estudo realizado para esta dissertação é o potássio (K). A sua energia de ionização é considerada relativamente baixa<sup>21</sup> (cerca de 4,34 eV), o que o torna num candidato ideal para desempenhar o papel de dador. Em segundo lugar, há que ter em conta a afinidade electrónica (adiabática ou simplesmente vertical) da molécula BC (representada por  $AE_{ad}(BC)$  para o caso da afinidade electrónica adiabática e  $AE_v(BC)$  para o caso da afinidade electrónica vertical) para que se dê a captura do electrão. A capacidade de um átomo ou molécula formar um anião termodinamicamente estável é expressa através da AE. Assim, a afinidade electrónica é definida como sendo a diferença de energia entre o estado fundamental de um átomo ou molécula neutro (M) e o estado fundamental do seu anião (M<sup>-</sup>)<sup>16</sup>. Por convenção, a AE de M é

considerada positiva se o estado fundamental de  $M^-$  está energeticamente abaixo do estado neutro (M) e vice-versa. No que diz respeito a  $AE_{ad}(M)$  e  $AE_v(M)$ , estas duas grandezas diferem porque a  $AE_{ad}(M)$  considera que o sistema M se vai “adaptando”, isto é, considera que M se ajusta quando o electrão extra é transferido, enquanto que a  $AE_v(M)$  considera que BC sofre uma transição instantânea para o estado iónico  $M^-$ , não havendo tempo suficiente para um ajuste da distância internuclear, o que corresponderá a uma transição vertical ou de Franck-Condon.

Finalmente, resta definir uma terceira grandeza, a endoergicidade do processo, que estabelece uma ligação entre a electroafinidade da molécula BC e a energia de ionização do átomo A:

$$\Delta E = EI(A) - AE(BC) \quad (2.6.)$$

Em relação à endoergicidade ( $\Delta E$ ), há algumas conclusões que se podem retirar. Por exemplo, se o valor de  $EI(A)$  for superior ao valor de  $AE(BC)$ , a endoergicidade é positiva, o que faz com que o processo seja endotérmico. No caso de CE com electrões livres, a energia de ionização do átomo é uma variável que não existe, sendo considerada a energia cinética do electrão. Esta é, sem dúvida, a grande diferença entre CE com electrões livres e TE. Neste caso o sistema electrão-molécula pode libertar parte da energia em excesso decorrente do processo no sentido átomo ionizado  $A^+$ , enquanto este esteja numa região do espaço onde tal seja possível, o que não era possível no caso anterior. Tal pode permitir uma estabilização do complexo electrão-molécula, permitindo ao electrão a transição para estados electrónicos de energia inferior aos em que se encontrava antes do processo de TE. Portanto, se a electroafinidade tomar um valor positivo pode afirmar-se que é possível formar um anião estável  $AB^-$ , no qual o electrão extra se encontra num estado ligado. Tal facto encontra-se esquematicamente representado na figura 2.1:



**Figura 2.1.- Esquema indicativo das transições electrónicas associadas aos processos de captura electrónica de electrões livres (seta a verde) e electrões provenientes de uma espécie atómica (seta a cinzento). A molécula AB possui uma  $AE_{ad}$  positiva (adaptado de<sup>22</sup>).**

Na figura 2.1 encontram-se identificadas tanto a curva de energia potencial aniónica como a neutra associadas à molécula AB. A transição identificada a verde corresponde a um processo de CE de electrões livres. Como é possível observar, a componente atractiva do potencial da curva aniónica encontra-se energeticamente abaixo da curva neutra. Tal significa que a molécula AB tem afinidade electrónica (vertical) positiva e, ao se dar a transição, o sistema tem de acomodar o electrão extra proveniente do processo de CE com a sua energia cinética, o que faz com que a transição tenha como estado final um estado acima do limiar de dissociação. Neste caso, podem ocorrer dois processos: 1) auto-libertação do electrão, isto é, o sistema relaxa para estados abaixo do limiar de dissociação; 2) dissociação da molécula. A cinzento estão representadas as transições referentes à captura de electrões provenientes de um processo de transferência de electrão ou “ligados” (TE). Neste caso e como foi referido atrás, o excesso de energia proveniente do acolhimento do electrão extra por parte da molécula pode ser parcialmente “dissipado” no sentido do átomo dador, fazendo com que o estado final da molécula seja um estado estável, e portanto de menor energia.

## 2.5. Criação de Lesões Directas e Indirectas no ADN

Como já tinha sido anteriormente referido<sup>1</sup>, os danos no ADN são induzidos por espécies secundárias geradas pela radiação primária ionizante. Sabe-se também que electrões secundários livres com energias entre 1 e 20 eV são as espécies secundárias mais abundantes. Contudo, anteriormente era pouco clara a sua capacidade ou não de induzir danos genotóxicos em ADN tais como quebras simples de cadeia (*SSB – Single Strand Breaks*) e quebras duplas de cadeia (*DSB – Double Strand Breaks*)<sup>23</sup>. Para tentar perceber melhor o papel dos electrões no meio intracelular, *Sanche et al.*<sup>1</sup> procederam à irradiação de filmes finos de ADN plasmídeo com um feixe de electrões de baixa energia (3 a 20 eV com resolução de 0,5 eV). O objectivo do estudo era identificar e contabilizar o número de *SSB*, *DSB* e perdas de helicidade (causadas pela quebra das ligações fosfato-açúcar) do ADN tendo em conta a energia dos electrões incidentes.

Deste estudo foram retiradas algumas conclusões bastante surpreendentes tendo-se constatado que o ADN pode realmente ser degradado por electrões mesmo que estes tenham energias inferiores à energia de ionização dos constituintes elementares<sup>3</sup>. Aliás, tanto este estudo como o de *Lennert*<sup>24</sup> vão ainda mais longe afirmando que a acção directa da radiação ionizante no ADN contribui apenas com 30% da energia depositada. Os restantes 70% são única e exclusivamente causada por acção indirecta, dado que a energia depositada inicialmente absorvida pela água podendo conduzir a processos de radiólise deste composto.

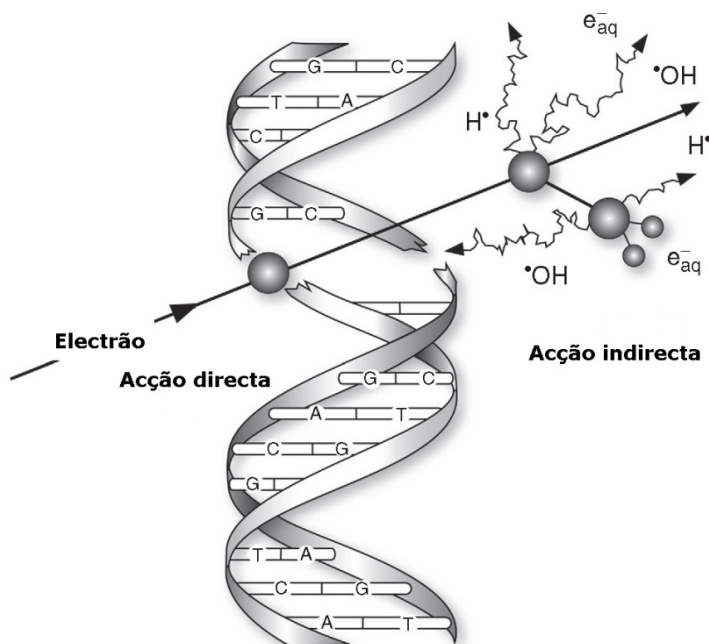
No que diz respeito a resultados, os danos provocados no ADN por electrões de 3 a 20 eV dependiam fundamentalmente da energia dos electrões incidentes, tendo por limiar 3 eV. A cerca de 10 eV era ainda identificada uma estrutura muito intensa (ressonância). Estabelecendo uma plataforma comparativa entre os dados deste estudo e os obtidos com um feixe de fotões verifica-se para estes últimos que apenas se começam a visualizar danos a partir dos 7 eV, aumentando estes linearmente até cerca dos 12 eV, valor a partir do qual estabilizam até às centenas de eV<sup>1</sup>.

Finalmente, e ao comparar o número de lesões por electrão incidente a uma energia de 7 eV, com o número de lesões por fotão incidente numa gama de energias entre 10 e 25 eV, concluiu-se que este rácio é de cerca de 2 ordens de grandeza. Tal significa que, para fotões com energias entre 7 e 20 eV, são “necessários” cerca de 30 fotões para causar uma quebra ou perda de helicidade da cadeia, ao passo que para electrões a razão é de 4 unidades<sup>1</sup>. Conclui-se então que os electrões são inequivocamente mais eficazes do que os fotões no que diz respeito à produção de possíveis danos mutagénicos. A grande novidade que se

pode retirar deste estudo e que acaba por também ir de encontro às expectativas do trabalho desenvolvido nesta dissertação, reside no facto de ser sugerido que os processos de captura electrónica dissociativa podem ser os responsáveis pela existência deste tipo de danos no ADN, mesmo para energias abaixo do limiar de ionização destas moléculas.

Após a publicação deste estudo<sup>1</sup>, surgiu então uma nova forma de interpelar o estudo dos efeitos mutagénicos em organismos vivos de uma outra forma, isto é, considerando uma predominância clara das interacções dos electrões secundários produzidos a partir da interacção de radiação de elevada energia com o tecido celular.

Apesar da grande capacidade de causar degradação ao nível do ADN pela acção dos electrões secundários, existem ainda outro tipo de moléculas que deles podem ser formadas por interacção com o ADN, denominadas de radicais livres. Como se sabe, estas espécies são altamente reactivas tendo enorme capacidade para quebrar as ligações químicas dos grupos fosfato existentes na dupla hélice do ADN<sup>1,24</sup>.



**Figura 2.2.- Esquema representativo dos efeitos directo e indirecto da radiação no ADN. Na acção directa, um electrão secundário interage com a molécula-alvo produzindo degradação enquanto que na acção indirecta são os radicais livres que interagem com a molécula-alvo (adaptado de <sup>25</sup>).**

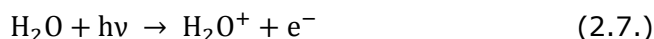
## 2.6. Radicais Livres

Um radical livre é um átomo ou molécula que transporta um electrão desemparelhado na sua orbital de valência. Normalmente, qualquer átomo ou molécula que possua número par de electrões tem os seus *spins* emparelhados. Nestas condições, está associado a este átomo ou molécula um elevado grau de estabilidade química. Por outro lado, se esse átomo ou molécula possuir número ímpar de electrões, faz com que exista um electrão na orbital mais externa para o qual não existe um *spin* oposto, o que faz com que este estado fique associado a um elevado grau de reactividade química.

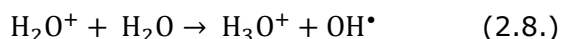
Devido a esta elevada reactividade química, os radicais são átomos ou moléculas com um electrão desemparelhado que facilmente podem ceder a outras moléculas na sua vizinhança de forma a se estabilizarem. No caso do meio celular, e nomeadamente no caso do radical hidróxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), este tinha já sido descrito como o principal causador de danos ao nível do ADN<sup>1,24</sup>.

## 2.7. Radiólise da água

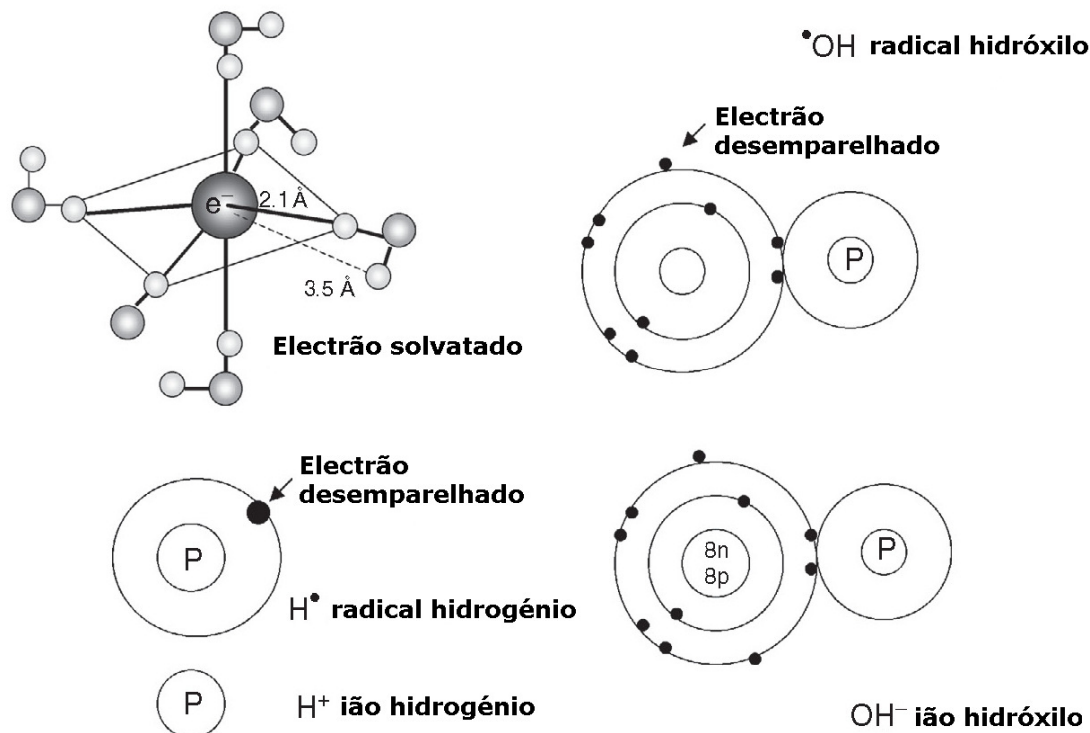
A molécula de água representa cerca de 70% da composição das células. Como resultado da interacção de um fotão  $X$  ou  $\gamma$  ou ainda uma partícula carregada, tal como por exemplo um electrão ou um protão, a molécula de água fica ionizada. Esta reacção pode ser expressa da seguinte forma:



$\text{H}_2\text{O}^+$  é um radical iónico, dado que se encontra electricamente carregado uma vez que perdeu um electrão. Os radicais iónicos primários têm um tempo de vida extremamente curto, da ordem dos  $10^{-10}\text{s}$ , decaindo para formar radicais livres. Desta forma, no caso da água, o radical iónico reage com outras moléculas de água formando principalmente o reactivo radical hidróxilo:



Este radical possui nove electrões, o que faz com que um deles se encontre desemparelhado. Trata-se então de um radical livre altamente reactivo que tem a capacidade de se difundir a curtas distâncias ( $\approx 20 \text{ \AA}$ ) podendo alcançar os alvos críticos nas células. Por exemplo, pensa-se que os radicais livres têm a capacidade de se difundir no ADN segundo uma vizinhança com um diâmetro de aproximadamente o dobro do formado pela dupla hélice do ADN ( $\approx 10 \text{ \AA}$ ).



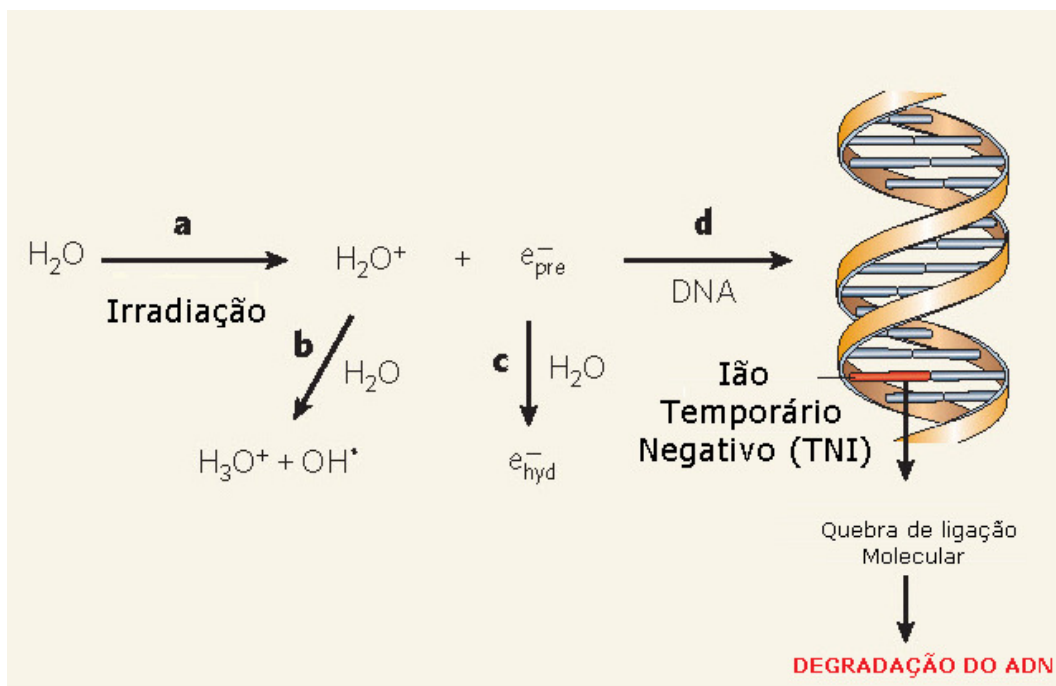
**Figura 2.3.** – Representação esquemática das principais espécies reactivas provenientes da radiólise da molécula de água (adaptado de<sup>25</sup>).

## 2.8. A Pré-Solvatação dos Electrões

Ao contrário do que se pensava até então, os dois radicais mais abundantes que provinham da molécula de água (o radical hidróxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) anteriormente referido e também o radical hidrogénio ( $\text{H}^\bullet$ )) não apresentam capacidade só por si de produzirem danos não reparáveis no ADN, como já previsto pelo estudo de *Ward et al.*<sup>26</sup>. Mais recentemente<sup>27</sup> foi observado que, mesmo para elevadas concentrações do radical hidróxilo em locais de possível interacção, os danos por ele provocados não conseguem degradar irremediavelmente o ADN. Esta tese é ainda mais reforçada pela inconsistência revelada entre estudos anteriores e um estudo realizado por *Ito et al.*<sup>28</sup>, que demonstram um aumento de várias ordens de grandeza dos danos induzidos por radiação ionizante no ADN na presença de uma solução aquosa, deixando em aberto qual o real papel da molécula de água neste tipo de processos.

Algumas explicações começaram a surgir em 2009 acerca deste assunto. Segundo *Wang et al.*<sup>5</sup>, os electrões livres que tenham perdido toda a sua energia cinética também têm a capacidade de interagir com o ADN. A sua proveniência é

também uma enorme novidade, dado que segundo estes autores e também *Migus et al.*<sup>29</sup>, antes dos electrões ficarem solvatados (aquando da radiólise da água) passam por um estado pré-solvatado que dura menos de 1 picossegundo ( $10^{-12}$  s). Para tentar perceber a dimensão deste fenómeno *Wang et al.*<sup>5</sup> usaram um laser com resolução de femto-segundo ( $10^{-15}$  s) tendo como moléculas-alvo os vários nucleótidos (base de ADN com açúcar e grupo fosfato). O estudo foi completamente desenvolvido em meio aquoso dado ser um bom modelo de aproximação ao meio biológico, uma vez que cada célula é constituída por cerca de 70% de água. O dispositivo experimental permitiu aceder directamente ao estado de pré-solvatação dos electrões, conferindo-lhes a possibilidade de observar que, antes de ocorrer solvatação, alguns destes (electrões) reagem com os nucleótidos formando TNI, os quais podem dissociar-se ou ainda relaxar para o estado fundamental libertando a energia em excesso ao solvente (água). Concluíram também que a formação de TNI a partir dos nucleótidos ocorre durante a fase de pré-solvatação, sendo os nucleótidos que têm por bases Adenina e Guanina os que mais facilmente capturam electrões pré-solvatados e os nucleótidos com Timina e Guanina são os que mais facilmente se dissociam. Então, *Wang et al.*<sup>5</sup> propõem que o mecanismo de transferência dissociativa de electrão seja responsável por uma grande porção dos danos ao nível do ADN, como é possível esquematizar na seguinte figura:



**Figura 2.4. – Representação esquemática do mecanismo de degradação do ADN proposto por *Wang et al.* (adaptado de <sup>30</sup>)**

Analisando atentamente a figura estão patentes 4 mecanismos que ocorrem desde a irradiação até à degradação do ADN. O processo **a** identifica a formação de

iões  $\text{H}_2\text{O}^+$  e electrões livres, os quais após perderem toda a sua energia cinética entram no estado de pré-solvatação; no processo **b** os iões  $\text{H}_2\text{O}^+$  reagem com outras moléculas de água formando água protonada,  $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})$  e radicais hidróxilo ( $\text{OH}^*$ ); já o processo **c** descreve a reacção entre electrões pré-solvatados e moléculas de água que dão origem aos electrões solvatados; por fim, o processo **d** é o processo descrito por *Wang et al.*<sup>5</sup>, que afirmam que os electrões pré-solvatados reagem com os nucleótidos (principalmente os que tenham como bases a Adenina e a Guanina) formando TNI. A dissociação destes TNI leva à quebra de ligações no ADN degradando-o.

## 2.9. Notas Finais

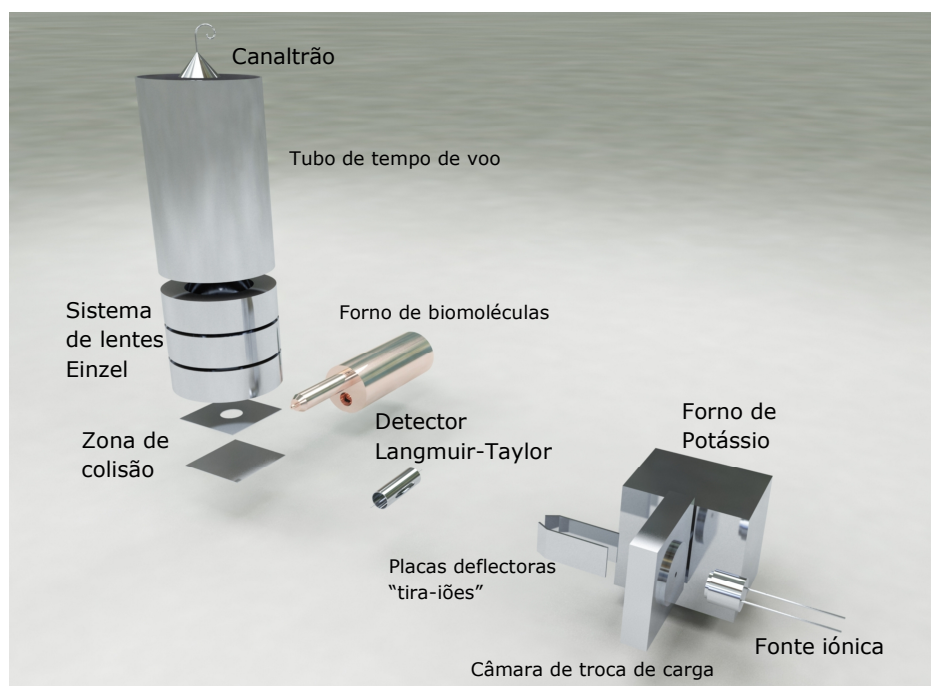
Recorrendo então ao uso do sistema de detecção e medida descrito nesta dissertação, assim como o posterior estudo dos efeitos da transferência de electrão resultantes da colisão de átomos de potássio (alcalino, dador de electrões) com moléculas biológicas nomeadamente Timina ( $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ ), espera-se obter resultados que permitam completar os modelos actuais baseados nos processos de captura electrónica de electrões livres, principalmente no que diz respeito ao tipo de interacções que possam ocorrer em meio biológico.

## Capítulo 3. Descrição do método experimental

### 3.1. Generalidades

Por forma a estudar a fragmentação induzida em processos de transferência de electrão em colisões de átomos de potássio com moléculas constituintes de ADN que na presente tese dizem respeito à base de ADN isolada - timina - recorreu-se, como forma de análise e detecção, a um espectrómetro de massa tipo tempo de voo, do qual se faz seguidamente uma descrição mais pormenorizada.

O aparelho de feixes moleculares cruzados (dispositivo experimental), é constituído por duas câmaras de alto-vácuo, as quais operam na gama de pressões da ordem de  $10^{-5}$  Pa, possuindo bombeamento independente através de bombas difusoras. As câmaras estão ligadas entre si por uma válvula, designada de *válvula inter-câmaras*. Na primeira câmara, ou câmara do feixe de potássio é criado um feixe de potássio neutro hipertérmico, à custa de um processo de troca de carga ressonante entre iões de potássio hipertérmicos ( $K^+_{hip}$ ) oriundos de uma fonte de iões e potássio neutro com energia térmica ( $K^0_{ter}$ ) que é vaporizado no interior de um forno por sublimação de uma amostra sólida deste alcalino. Na segunda câmara, ou câmara de colisões encontra-se todo um sistema de colimação, extracção e detecção, assim como um forno, que permite aquecer substâncias sólidas (ex: biomoléculas) e, desta forma aumentar as suas tensões de vapor, produzindo à sua saída um feixe neutro. Ao passar para a segunda câmara, o feixe neutro de potássio entra na zona de colisões através de uma fenda colocada na sua direcção cruzando-se então com o feixe de biomoléculas. Após a colisão átomo-molécula formam-se iões negativos que são detectados por meio de um espectrómetro de massa do tipo tempo de voo com um detector do tipo canaltrão. Na figura 3.1. encontra-se representado um esquema do sistema usado neste trabalho.



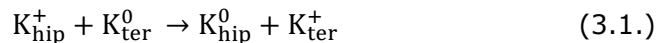
**Figura 3.1. – Esquema do aparelho experimental. À direita na figura encontra-se a fonte de  $K^+_{hip}$  assim como o forno de  $K^0_{ter}$ , o qual está acoplado à câmara de troca de carga. À esquerda encontra-se o sistema de extracção e detecção por tempo de voo e o forno de biomoléculas.**

## 3.2. Sistema

O sistema, genericamente descrito acima, possui um grande número de componentes que permitem e asseguram a operacionalidade do aparelho de feixes moleculares, os quais serão descritos mais pormenorizadamente nos próximos sub-capítulos:

### 3.2.1. Sistema de troca de carga

O sistema de troca de carga é composto por um forno, uma câmara de troca de carga e uma fonte de iões de potássio ( $K^+_{hip}$ ). Através deste sistema é possível produzir um feixe neutro de potássio acelerado  $K^0_{hip}$ . Este feixe é gerado pelo processo de troca de carga ressonante. Os iões de potássio da fonte ( $K^+_{hip}$ ) são acelerados passando posteriormente por uma fenda circular na câmara de troca de carga onde interagem com átomos de potássio provenientes do aquecimento de potássio sólido ( $K^0_{ter}$ ). Ao passarem junto dos átomos de potássio, os iões  $K^+_{hip}$  provenientes da fonte recebem um electrão dos átomos  $K^0_{ter}$  obtendo-se à saída da câmara de troca de carga um feixe neutro acelerado  $K^0_{hip}$  e um feixe iónico com energia térmica  $K^+_{ter}$ . A equação 3.1 expressa a reacção do processo de troca de carga.



### 3.2.1.1. Forno

O forno de potássio neutro,  $K_{\text{ter}}^0$ , é um dispositivo em aço inox, com geometria aproximadamente cúbica com duas resistências de aquecimento montadas em paralelo debitando cada uma delas uma potência de 200W (Watlow firerod ref. 0832K). A função destas resistências é permitir o aquecimento da amostra sólida de potássio que é colocada no interior do forno. O forno encontra-se normalmente a 420K sendo a sua temperatura determinada recorrendo a resistências PT100. Tanto as resistências de aquecimento como o medidor de temperatura são controlados exteriormente por um controlador PID (Proportional-Integrator-Differentiator), (CAL 3300, ref. 331100000). Para efectuar o carregamento da amostra de potássio a vaporizar no interior deste dispositivo é necessário retirar uma tampa colocada na sua face superior.

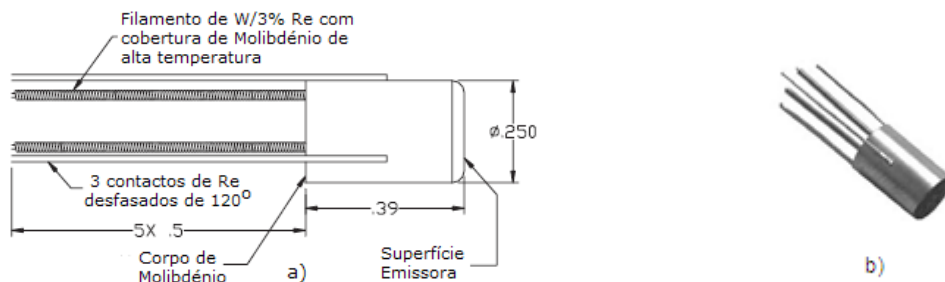
### 3.2.1.2. Câmara de troca de carga

À semelhança do componente anterior, também este é aquecido por duas resistências de 200W (Watlow firerod ref. 0832K), ainda que a uma temperatura superior à do forno (tipicamente 440K). Tal diferença de temperatura tem por objectivo evitar a possível condensação da amostra no seu interior, o que impediria o fluxo de potássio para as fendas que comunicam com o exterior desta câmara. As fendas possuem uma abertura central circular com diâmetro de 1,5 mm com a finalidade de manter uma densidade suficiente de átomos de potássio neutros térmicos ( $K_{\text{ter}}^0$ ) nesta zona, beneficiando desta forma o processo de troca de carga ressonante com os iões de potássio hipertérmicos ( $K_{\text{hiper}}^+$ ) provenientes da fonte iónica e funcionando simultaneamente como elemento de colimação do feixe.

### 3.2.1.3. Fonte de iões

A fonte emissora de iões  $K^+$  usada neste dispositivo experimental foi adquirida à empresa *HeatWave Labs, inc* (modelo 101139) e está particularmente adaptada para medidas experimentais de baixa energia (até 100 eV), nos quais é essencial que os feixes apresentem uma baixa dispersão em energia. Para tal, o material de emissão iónica tem a vantagem de não reagir quando em condições de armazenamento à pressão atmosférica. Para altas tensões de aceleração dos iões e em modo pulsado, a corrente do emissor apresenta comportamento semelhante ao

efeito de Schottky, que se manifesta num aumento da corrente iónica com o aumento da tensão de extracção. De acordo com as especificações do fornecedor desta fonte de iões, análises de massa efectuadas a este tipo de feixes indicam a presença de pequenas quantidades de impurezas que vão diminuindo tanto ao longo do tempo em que o emissor opera como à medida que a sua temperatura aumenta. No que diz respeito à razão entre átomos de potássio neutros e iões emitidos, este valor é tipicamente da ordem dos 10%, o que faz com que a fracção de iões seja claramente predominante em relação aos restantes (átomos e iões provenientes de impurezas). As densidades de corrente iónicas emitidas situam-se na gama 1-10 mA/cm<sup>2</sup>, a temperaturas de operação entre os 1220 e os 1370 K. A figura 3.2.a) mostra um emissor típico, o qual consiste numa superfície porosa, indirectamente aquecida por um filamento, no qual o material emissor foi fundido. O corpo de molibdénio que apoia a ligação é maquinado com uma estrutura sólida, para garantir um isolamento completo entre o emissor e a cavidade de aquecimento. Neste escudo exterior estão colocados três contactos de rénio espaçados de 120° entre si. O elemento de aquecimento tem o formato de uma bobina aberta não indutiva de fio de molibdénio solidamente colocado na cavidade do corpo do emissor composto por Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com elevado grau de pureza. A matriz emissora é constituída por um disco de tungsténio extremamente poroso, o qual está soldado ao corpo de aquecimento de molibdénio. O material de emissão iónico (neste caso potássio) está colocado na face do emissor em quantidades controladas e é derretido para a matriz porosa de tungsténio em atmosfera de hidrogénio, aquando do processo de fabricação. Dada a versatilidade destas fontes iónicas, foi necessário idealizar e construir um suporte de forma a adaptar este componente ao dispositivo de produção de feixe neutro já existente. Este suporte consiste num cilindro de aço inoxidável ao qual foram adicionadas algumas cerâmicas para isolar os contactos da fonte iónica. Tendo em conta a gama de temperaturas ideais para um bom funcionamento da fonte de iões, são utilizadas correntes de 2 A, às quais se atingem tensões de aproximadamente 7 V.



**Figura 3.2.** – A figura 3.2. apresenta duas perspectivas da fonte emissora de  $K^+$ . A figura a) diz respeito a um esquema representativo dos diferentes componentes do emissor. A figura b) evidencia o aspecto exterior do emissor utilizado no trabalho experimental.

### 3.2.2. Placas Deflectoras de iões “Tira-Iões”

Estas placas de geometria rectangular, têm por função a remoção da maior quantidade possível de iões (hipertérmicos e térmicos) produzidos pela fonte iónica e que não tenham sofrido troca de carga (ressonante) aquando da sua passagem pela câmara de troca de carga. Para tal, coloca-se uma das duas placas a um potencial positivo em relação à outra de forma a provocar a deflexão dos iões de encontro a esta. Apenas os átomos de potássio neutros não são afectados por este campo extractor. Ao medir a corrente colectada nesta placa poder-se-á então controlar a taxa de produção de iões  $K^+$  obtendo também uma estimativa indirecta da taxa de produção de  $K^0_{hip}$ .

### 3.2.3. Detector de ionização do tipo Langmuir-Taylor

Este detector de ionização consiste num colector com formato cilíndrico (semelhante em funcionamento a uma gaiola de Faraday), e possui ao longo do seu eixo central um filamento ionizador de Iridio (0,125 mm de espessura, pureza >99%). O colector possui duas aberturas que coincidem com a zona de passagem do feixe de potássio neutro, que, juntamente com o pequeno diâmetro do filamento, minimiza a alteração da intensidade e uniformidade do feixe de potássio que chega ao centro de colisão. A presença deste detector na montagem experimental prende-se com a necessidade de medir a corrente de potássio neutro que chega à zona de colisões, dado que o detector se encontra imediatamente antes desta. Para tal, é aplicada ao filamento uma corrente típica de 0,630 A e tensão de deflecção +60 V em relação ao colector, criando-se um campo eléctrico

entre filamento e colector que deflecte os iões provenientes da ionização dos átomos neutros ( $K^0_{\text{hip}}$ ), para o colector. É então produzida uma corrente no colector, a qual é proporcional à intensidade do feixe neutro acelerado. Esta corrente do filamento é suficiente para "distinguir" apenas os átomos de potássio neutros hipertérmicos.

### 3.2.4. Forno de Biomoléculas

O forno de biomoléculas é o local onde são colocadas directamente as amostras sólidas, enquanto as amostras gasosas e a maioria das amostras líquidas são introduzidas através de um sistema de introdução de amostras que passa posteriormente pelo forno. Este forno tem por finalidade, através de aquecimento, aumentar a tensão de vapor das amostras sólidas, criando um feixe efusivo de moléculas neutras, o qual vai passar posteriormente por uma fenda colimadora de 1 mm. O objectivo desta fenda é manter (tal como o conjunto de fendas colimadoras do feixe atómico) o volume de colisão com dimensões que permitam uma melhor resolução espacial do espectrómetro de massa do tipo tempo de voo (TOF). O forno é composto por uma blindagem, que consiste numa estrutura cilíndrica em cobre, com aberturas de ambos os lados. Um dos lados possui duas pequenas aberturas, através das quais são inseridos a extremidade por onde vai sair um feixe efusivo de moléculas e o troço final de tubo do sistema de introdução de amostras gasosas. No lado oposto encontra-se uma abertura onde se coloca o reservatório com a amostra sólida a aquecer. No interior da blindagem está inserido um sensor de temperatura do tipo termopar com uma junção crómio-alumínio. O termopar do tipo K permite determinar com grande precisão a temperatura do forno (2,5% de incerteza entre 230 K e 600 K). O controlo de temperatura é muito importante, dado que, para aumentar a tensão de vapor das moléculas sólidas necessitamos de as aquecer. No entanto, um aquecimento demasiado elevado das mesmas pode levar à sua decomposição térmica antes de se dar a colisão com o feixe neutro de potássio. O reservatório, como referido anteriormente, encontra-se no interior da blindagem, sendo apenas usado directamente no caso das moléculas em estudo se encontrarem em estado sólido. Estas são colocadas no seu interior, sendo posteriormente aquecidas para vaporizarem formando assim o feixe efusivo secundário. Este componente é de aço inoxidável, embora a extremidade que o fixa no interior da blindagem seja de cobre.

O terceiro e último componente do forno é a extremidade. Esta consiste num cilindro com terminação em forma de cone. Possui uma abertura de 1 mm ao longo de todo o cilindro permitindo a passagem do feixe de biomoléculas.

### 3.2.5. Sistema de introdução de amostras gasosas e líquidas

A presença deste sistema deve-se ao facto de nem todas as moléculas em estudo necessitarem de ser aquecidas no interior do forno. Para tal, está dotado de três entradas convergentes numa única linha, a qual entra numa válvula de safira, que permite um doseamento muito preciso da quantidade de amostra a inserir no interior da câmara. Após a válvula de safira segue-se ainda uma linha de tubagem, a qual entra no interior do forno, dito de biomoléculas, por uma abertura situada na sua face inferior, seguindo então um trajecto semelhante ao que realizaria uma amostra que é colocada directamente no interior do forno. O sistema de inserção de amostras possui um bombeamento independente do restante sistema de vácuo da câmara de colisões e é assegurado por uma bomba turbomolecular acoplada a uma bomba rotatória, garantindo nesta linha um valor de pressão inferior a  $10^{-1}$  Pa.

### 3.2.6. Sistema de detecção de partículas

Com o intuito de efectuar uma detecção apropriada das espécies aniónicas resultantes das colisões átomo-molécula, utilizou-se um espectrómetro de massa do tipo tempo de voo (também designado por TOF - "Time of Flight"). Os componentes deste sistema foram previamente simulados<sup>22</sup> recorrendo ao programa SIMION<sup>®</sup> e totalmente construídos no Laboratório de Colisões Atómicas e Moleculares (LCAM) da Linha 2 / Física Molecular, Plasmas e Aplicações/CEFITEC/DF/FCT/UNL. É composto por duas fendas de colimação, um prato de extracção, duas redes, um sistema de lentes Einzel, uma zona livre de campo e um detector de partículas do tipo canaltrão. O espectrómetro de massa possui um comprimento efectivo de 1,4m.

#### 3.2.6.1. Fendas de colimação

O sistema de tempo de voo possui duas fendas de colimação na zona de colisões. Uma das fendas é circular, com 1 mm de diâmetro e encontra-se na direcção principal do forno de biomoléculas. Esta fenda permite definir um volume de colisão, melhorando assim a resolução em termos espaciais do aparelho. A outra fenda é rectangular, com 1mm de altura por 5 mm de largura e está voltada para a válvula inter-câmaras, servindo para colimar o feixe de potássio neutro que chega à zona de colisões, delimitando também o volume de colisão do sistema de medida permitindo melhorias na resolução espacial.

### 3.2.6.2. Prato de extracção

Conjuntamente com a primeira rede de aceleração, o prato extractor de iões delimita a zona de extracção. Nesta zona forma-se o volume de colisão, que resulta da interacção entre o feixe atómico de potássio e o feixe neutro da molécula-alvo, localizando-se no seu centro geométrico entre o prato e a 1ª rede de aceleração. Ao aplicar um sinal pulsado negativo com referência à primeira rede conseguem extrair-se os fragmentos carregados negativamente em direcção ao detector.

### 3.2.6.3. 1ª Rede de aceleração

Conjuntamente com a 2ª rede de aceleração, esta rede delimita a zona de aceleração. É estabelecido um potencial com o intuito de criar uniformidade de aceleração para todos os iões antes que estes entrem no sistema de focagem de lentes Einzel e no tubo de tempo de voo (zona livre de campo).

### 3.2.6.4. 2ª Rede de aceleração

A 2ª rede de aceleração funciona como limite superior da zona de aceleração. É aplicada nela um potencial nulo com o intuito de que todos os iões possuam uma trajectória sem qualquer aceleração, permitindo então a sua separação tendo em conta a sua razão carga-massa ( $-q/m$ ).

### 3.2.6.5. Sistema de lentes Einzel

Este sistema tem por função a focagem dos iões gerados na colisão que chegam ao detector canaltrão. É composto por três elementos com o mesmo formato, estando o primeiro e terceiro componentes sujeitos à mesma diferença de potencial. O sistema funciona como uma lente óptica que faz convergir partículas carregadas, enquanto que o valor da tensão aplicada no elemento central define a distância focal. O sistema pode facilmente ser optimizado, variando o valor de tensão para o qual a distância focal coincide com a entrada do detector.

### 3.2.6.6. Pratos deflectores

Estes dois componentes de geometria rectangular surgem nesta zona com uma função semelhante à desempenhada pelos seus análogos na zona de produção do feixe atómico. O objectivo particular destes pratos é efectuar pequenas

correções na convergência dos fragmentos que voam ao longo do tubo de tempo de voo, funcionando como complemento do sistema de lentes Einzel.

### **3.2.6.7. Tubo de tempo de voo**

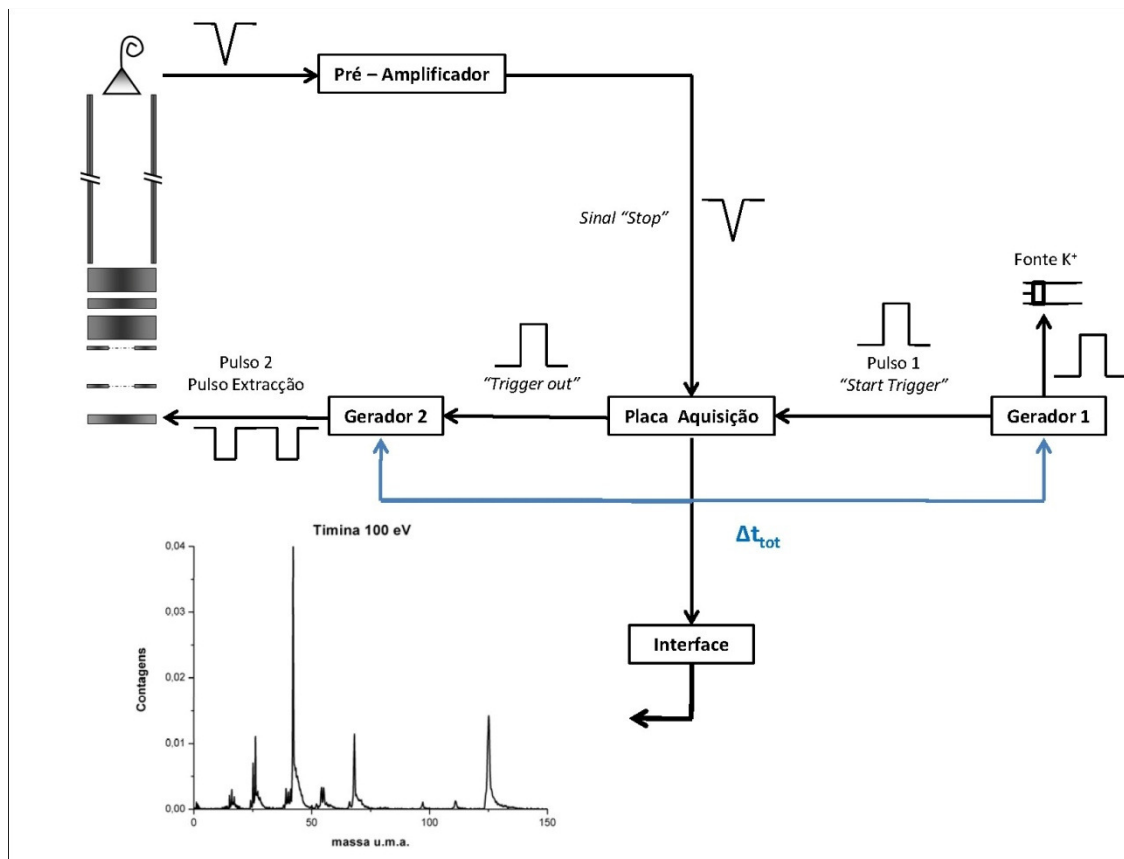
O tubo de tempo de voo é uma zona na qual não existe qualquer potencial aplicado, isto é, encontra-se ao potencial de referência do aparelho (potencial da terra, 0V). Como tal, os fragmentos entram neste tubo com um movimento rectilíneo uniforme. A separação segundo a razão carga-massa é feita em função da massa dos fragmentos aniónicos, e portanto, do tempo que levam até chegar ao detector de partículas do tipo canaltrão.

### **3.2.6.8. Detector do tipo canaltrão**

O detector de partículas do tipo canaltrão surge neste dispositivo experimental para colectar os fragmentos iónicos criados da colisão entre os átomos de potássio e a molécula alvo. O canaltrão usado (modelo Burle 7010) é adequado a medições em modo de contagem de impulsos. O princípio de funcionamento deste detector consiste na criação de uma cascata de electrões secundários criados a partir de um embate inicial dos iões (acelerados a alguns keV) que se pretendem detectar. O detector usado apresenta uma forma tubular espiralada, com entrada cónica de 1 cm de diâmetro. Desta forma, assim que um determinado fragmento com uma dada energia cinética entra no canaltrão, choca com a sua parede criando um grupo de electrões secundários, os quais vão criar um outro conjunto ainda maior e assim sucessivamente até ao final do detector. O processo de produção destes electrões em cascata dá-se à custa de uma diferença de potencial aplicada entre as extremidades do detector e que, na detecção de iões negativos (como é no presente caso) toma um valor típico de cerca de 2000 V. Neste tipo de detector existem parâmetros que podem ser usados tendo em conta a aplicação em causa. São eles a tensão aplicada na entrada e a tensão aplicada na saída do detector. Para as partículas a detectar, neste caso em particular, iões negativos, é usada uma tensão positiva na extremidade do detector, enquanto que na entrada pode ser usada uma tensão nula ou então ligeiramente positiva, atraindo então o maior número de partículas possível para detecção. Este tipo de detectores apresenta um pequeno intervalo temporal de resposta (da ordem dos nanossegundos) para o qual não consegue detectar uma partícula incidente que colida no detector num intervalo temporal menor do que o tempo entre duas detecções possíveis.

### 3.2.6.9. Sistema de tratamento e aquisição de sinal

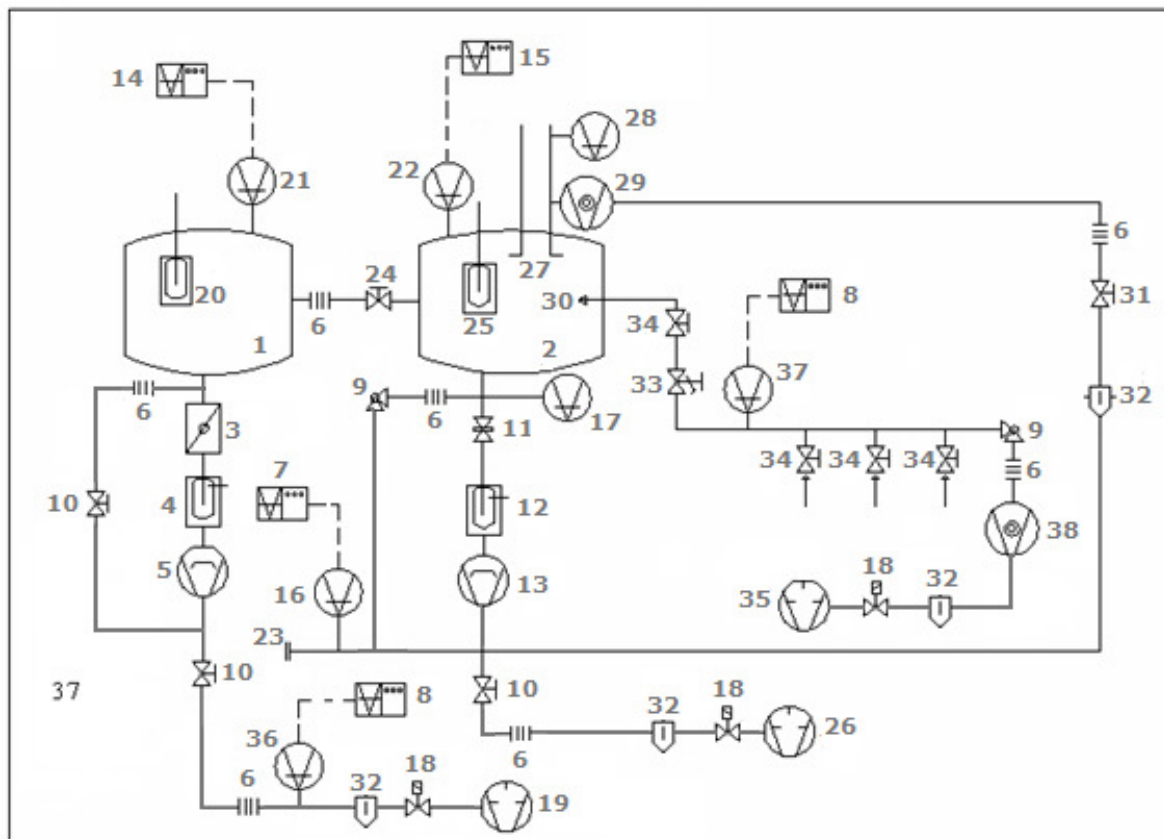
Na figura 3.3. apresenta-se um esquema de todo o sistema de tratamento e aquisição de sinal. Assim, pode-se classificar como sistema de tratamento de sinal, a parte do diagrama que inclui o sinal de saída do canaltrão, o pré-amplificador e a placa de aquisição. Este sistema consiste na produção de um impulso negativo de amplitude e duração aproximadas de 20  $\mu\text{V}$  e 8 ns, respectivamente, tendo formato semelhante ao do esquema (sinal típico de resposta de um canaltrão) aquando da detecção da chegada de um ião, o qual é posteriormente amplificado no pré-amplificador, obtendo-se assim um sinal que se encontra dentro das condições para as quais a placa de aquisição funciona. No que diz respeito ao sistema de tratamento de sinal, este é composto pelo gerador 1, que é responsável por aplicar um impulso com uma determinada amplitude e uma largura muito curta (tipicamente é usada uma amplitude de 100 V e uma largura de 2  $\mu\text{s}$ ). A amplitude do sinal fornece aos iões de potássio emergentes da fonte iónica uma aceleração igual ao seu valor enquanto que a largura do sinal permite apenas acelerar um determinado "pacote" de iões de potássio que vão trocar de carga e posteriormente seguir para a câmara de colisões. Ao mesmo tempo, o gerador 1 fornece um sinal de "trigger" para a placa de aquisição, na qual é estabelecido um *delay* ou atraso temporal no sinal que vem do gerador 1. Após este tempo é gerado um "trigger externo" que segue para o gerador 2, o qual gera um impulso, que é aplicado à zona de extracção para fazer com que o conjunto de fragmentos criados pela colisão entre o "pacote" de iões de potássio e a molécula em estudo seja dirigido para o tubo de tempo de voo e posteriormente para a sua detecção pelo canaltrão.



**Figura 3.3. – Esquema ilustrativo do sistema de tratamento e aquisição de sinal utilizado.**

### 3.2.7. Sistema de vácuo

Na figura seguinte encontra-se um esquema do sistema de vácuo utilizado neste aparelho de feixes moleculares cruzados. Toda a montagem do sistema de vácuo segue as normas DIN 28401. Seguidamente será efectuada também uma pequena descrição de alguns dos principais componentes do sistema.



**Figura 3.4. - Representação esquemática do sistema de vácuo utilizado.**

1. Câmara de criação de feixe neutro.
2. Câmara de colisões.
3. Válvula borboleta.
4. Trapa de azoto líquido.
5. Bomba difusora Edwards E06.
6. Tubo flexível em aço inoxidável.
7. Unidade de controlo de medida Boc Edwards TIC.
8. Unidade de controlo de medida Combivac-CM-31.
9. Válvula em ângulo recto.
10. Válvula manual speedivac edwards.
11. Válvula de gaveta Airco Temescal R-3.
12. Trapa de azoto líquido Varian 8".
13. Bomba difusora Varian NRC 0184.
14. Unidade de controlo de medida Edwards Penning 505.
15. Unidade de controlo de medida Edwards Penning 505.
16. Sensor de pressão Pirani Boc Edwards APG-NW-16.
17. Sensor de pressão Penning Balzers IKR250.
18. Válvula electromagnética Edwards Speedivac.
19. Bomba rotatória de dois estágios tipo E2M18 Edwards.
20. Trapa de azoto líquido.
21. Sensor de pressão Penning Edwards CP-25-EK.
22. Sensor de pressão Penning Edwards CP-25-EK.
23. Flange de ligação cega.
24. Válvula manual inter-câmaras.
25. Trapa de azoto líquido.
26. Bomba rotatória de dois estágios tipo E2M18 Edwards.

27. Espectrómetro de massa TOF.
28. Sensor de pressão Penning Balzers IKR20.
29. Bomba turbomolecular Varian turbo-V60.
30. Entrada bicónica.
31. Válvula manual Leybold AG.
32. Trapa de Zeólitos.
33. Válvula de safira Vacuum generators.
34. Válvulas manuais Swagelock.
35. Bomba rotatória de dois estágios D8B Leybold.
36. Sensor de pressão Pirani Leybold TR211.
37. Sensor de pressão Pirani Leybold TR211.
38. Bomba turbomolecular Leybold turbovac 150 csv

O sistema de vácuo encontra-se protegido por um sistema de segurança que consiste num circuito eléctrico, o qual desliga automaticamente todo o aparelho em caso de corte de água e aumento de pressão. Na câmara de produção do feixe neutro (referenciada na figura com o nº1), encontra-se um forno comunicante com uma fonte de troca de carga ressonante, uma fonte iónica de potássio e um sistema de dois eléctrodos imediatamente a seguir à fonte de troca de carga que possibilitam a extracção de iões também denominados por "tira-iões". As condições de vácuo nesta câmara são asseguradas por uma bomba difusora (5) e por duas trapas de azoto líquido (4 e 21) sendo que uma está colocada no interior da câmara e a outra entre a bomba difusora e a câmara. O bombeamento de apoio frequentemente denominado de bombeamento de "backup", é assegurado por uma bomba rotatória de dois estágios sequenciais que possui uma velocidade de bombeamento máxima de  $6 \text{ l.s}^{-1}$ , atingindo uma pressão limite de  $1 \times 10^{-2} \text{ Pa}$ . Imediatamente após esta bomba rotatória encontram-se uma válvula electromagnética de isolamento e uma trapa de zeólitos que tem por função a redução do fluxo de vapores de óleo da bomba rotatória para o interior da câmara de alto-vácuo. A referir ainda que a bomba difusora possui uma velocidade de bombeamento para o ar da ordem de  $1300 \text{ l.s}^{-1}$  atingindo uma pressão limite de  $\approx 7 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ .

Na câmara de colisões (referenciada na figura com o nº2), encontra-se um detector de ionização em superfície do tipo Langmuir-Taylor, um conjunto de fendas colimadoras (uma na direcção do feixe primário e outra que colima o feixe molecular), um forno de biomoléculas, um espectrómetro de massa tipo tempo de voo (TOF), o qual está disposto na vertical, tendo na sua extremidade colocado um detector de partículas do tipo canaltrão. Nesta câmara as condições de vácuo são asseguradas por uma bomba difusora que possui uma velocidade de bombeamento para o ar de cerca de  $1550 \text{ l.s}^{-1}$  atingindo uma pressão limite de  $\approx 5 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ . No topo do tubo de tempo de voo encontra-se uma bomba turbomolecular que permite um bombeamento diferencial no interior desta câmara assim como um "ambiente"

livre de contaminações imediatamente junto da zona do detector (canaltrão). O valor típico de pressão nesta zona é de  $10^{-5}$  Pa. À semelhança da câmara de criação de feixe neutro, também esta câmara de alto-vácuo tem assegurado o bombeamento de apoio por uma bomba rotatória com o mesmo modelo da bomba rotatória que exerce essa função na câmara de criação de feixe neutro. Imediatamente após esta bomba rotatória encontram-se uma válvula electromagnética de isolamento e uma trapa de zeólitos aí colocadas pelo mesmo motivo que foi referido anteriormente.

A comunicação entre as duas câmaras é assegurada por uma válvula inter-câmaras manual, a qual permite manter uma das câmaras em alto-vácuo enquanto a outra pode estar aberta à pressão atmosférica no mesmo instante. A importância destas válvulas centra-se no facto de se efectuar a substituição do potássio sólido na câmara de produção de feixe neutro e manter a câmara de colisões em alto-vácuo diminuindo assim o tempo de espera até efectuar novas aquisições de dados. No caso da câmara de colisões também é muito importante porque, quando se estudam moléculas sólidas pode ser necessário colocar mais amostra no interior da câmara sem ter de abrir também a câmara de produção de feixe neutro.

O sistema de introdução de amostras líquidas e/ou gasosas tem asseguradas as condições de vácuo graças a um sistema composto por uma bomba turbomolecular, que possui uma velocidade de bombeamento de  $150 \text{ l.s}^{-1}$  em série com uma bomba rotatória com velocidade de bombeamento de  $2,8 \text{ l.s}^{-1}$ . Para garantir uma maior pureza das amostras, também neste caso o bombeamento primário é assegurado por uma bomba rotatória possuindo uma válvula electromagnética e uma trapa de zeólitos.

Neste tipo de dispositivos experimentais é muitíssimo importante a gama de pressões de trabalho devido ao livre percurso médio<sup>31</sup> dos átomos de feixe primário que chocam com o feixe secundário, permitindo garantir que a colisão é binária, isto é, que se dá apenas uma colisão entre um átomo de potássio e uma molécula em estudo. Assim, torna-se importante definir o que é o livre percurso médio de um átomo ou molécula. De acordo com<sup>31</sup>, esta grandeza não é mais do que a distância média percorrida por um átomo ou molécula entre duas colisões sucessivas.

Tomando em conta a gama de pressões de trabalho que rondam  $5 \times 10^{-5}$  Pa, tendo ainda em conta a temperatura ambiente de 300 K e considerando um diâmetro médio das moléculas de  $5 \text{ \AA}$ , recorreu-se a uma expressão simplificada para calcular o livre percurso médio<sup>31</sup>:

$$\lambda \cong \frac{7 \times 10^{-3}}{P_{\text{trabalho}}} \text{ (cm)} \quad (3.1.)$$

Inserindo agora o valor da pressão de trabalho conseguida neste dispositivo experimental:

$$P_{\text{trabalho}} = 6 \times 10^{-5} \text{ Pa}$$

obtém-se :

$$\lambda \cong 11600 \text{ cm} = 116 \text{ m}$$

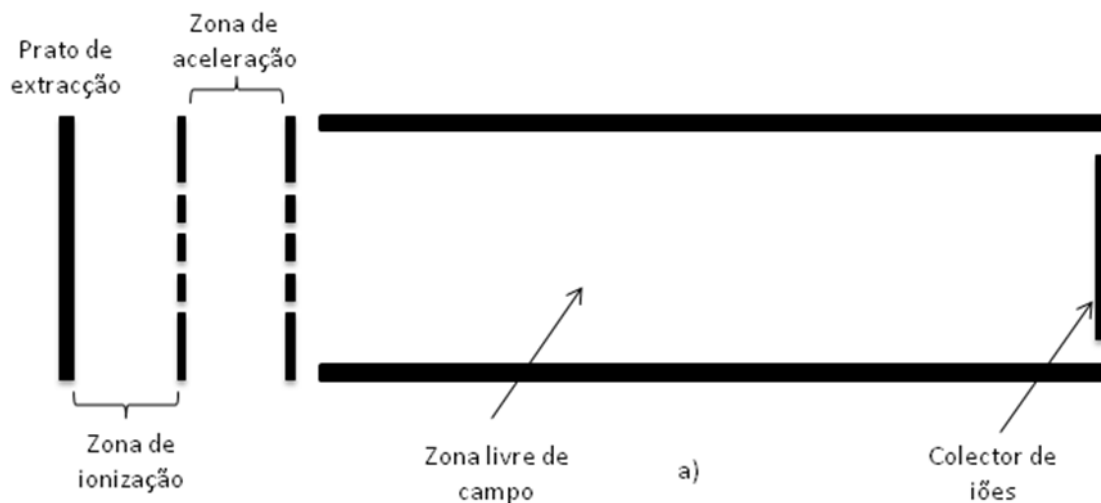
O valor obtido é enorme, e tendo em conta que a distância entre o local de produção do feixe neutro de potássio e o centro de colisões é de cerca de 50 cm, pode afirmar-se que a colisão entre o feixe primário e o feixe de biomoléculas a estas pressões é realmente binária, tal como era pretendido.

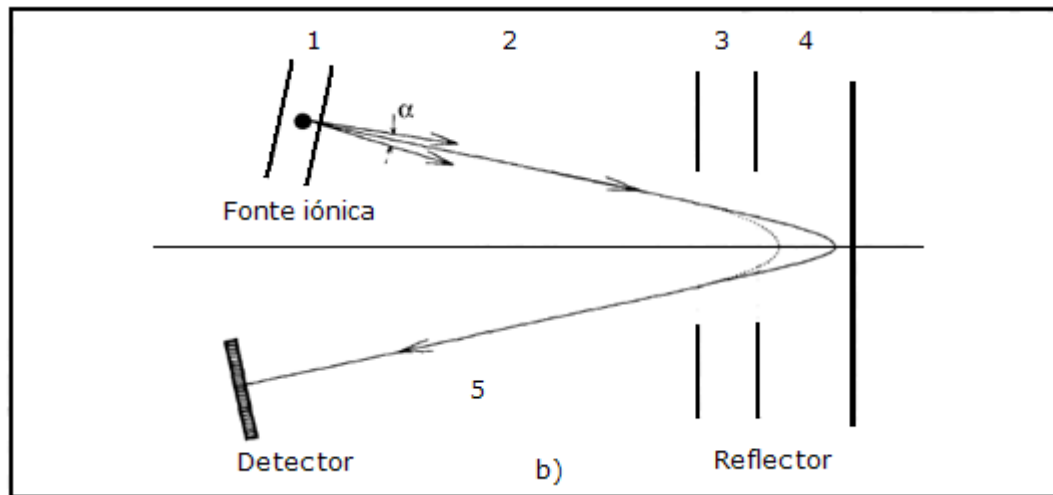
### 3.3. Espectrometria de massa do tipo tempo de voo

A espectrometria de massa do tipo tempo de voo consiste na determinação da razão massa-carga entre espécies iónicas tendo por princípio base o tempo que estas levam a percorrer uma determinada distância, sendo este intervalo temporal denominado por tempo de voo. Num espectrómetro que funciona segundo este princípio, a separação das espécies iónicas baseia-se no facto de lhes ser "fornecida" mesma energia; desta forma iões de massas diferentes terão diferentes velocidades. Se todos os iões percorrerem a mesma distância predefinida, o tempo que a demorarem a percorrer irá variar de acordo com a sua massa, isto é, as massas mais leves irão percorrer a distância em menor tempo do que as mais pesadas, chegando com uma pequena diferença temporal ao detector. Os primeiros espectrómetros de tempo de voo, (também os mais simples) eram apenas compostos por uma fonte iónica e um colector situado no extremo oposto de um tubo em vácuo. Então, as espécies iónicas formadas nesta fonte eram posteriormente aceleradas através de um ou mais campos eléctricos em direcção ao colector.

Os primeiros espectrómetros deste tipo reportam a 1932, através de *Smythe and Mattauch*<sup>32</sup>, os quais realçam o facto da não utilização de qualquer tipo de campo magnético neste tipo de dispositivo. Essa mesma razão faz com que o espectrómetro apresente algumas deficiências, nomeadamente no que diz respeito à correcta selecção das velocidades pretendidas, introduzindo picos extra nos espectros de massa e complicando bastante a sua análise. Contudo, ao longo dos

anos, foram propostas algumas geometrias que melhoraram a resolução e a gama de detecção deste tipo de espectrómetros, tornando-os mais versáteis em relação a outros devido à sua simplicidade e maior acessibilidade em termos de custo. As duas propostas que mais melhoraram a resolução e potencialidade da espectrometria TOF, incidiram, na introdução de um segundo campo de aceleração, cujo conceito foi inicialmente proposto por *Wiley e McLaren*<sup>33</sup> em 1955 (ver figura 3.5.a)), e a introdução da geometria de reflectão, conceito que foi introduzido experimentalmente por *Mamyrin et al.*<sup>34</sup>. Este conceito centra-se na variação das energias dos iões e na imposição de estes passarem muito pouco tempo na região de aceleração comparado com o seu tempo total de voo. Observando o esquema da figura 3.5 b), pode dizer-se que, os iões são acelerados na região 1 com uma certa energia  $W$ , entrando então numa zona livre de campo a que corresponde a região 2 sendo desacelerados, reflectidos e acelerados de novo nas regiões 3 e 4 entrando na região 5, que é uma zona livre de campo, chegando por fim ao detector. A distinção dos diferentes iões formados é feita com base nas variações de energia  $W$ , (devido ao facto de iões serem formados com energias diferentes) fazendo com que estas sejam compensadas através do tempo que os iões passam sob a acção dos campos aplicados na zona do reflector.

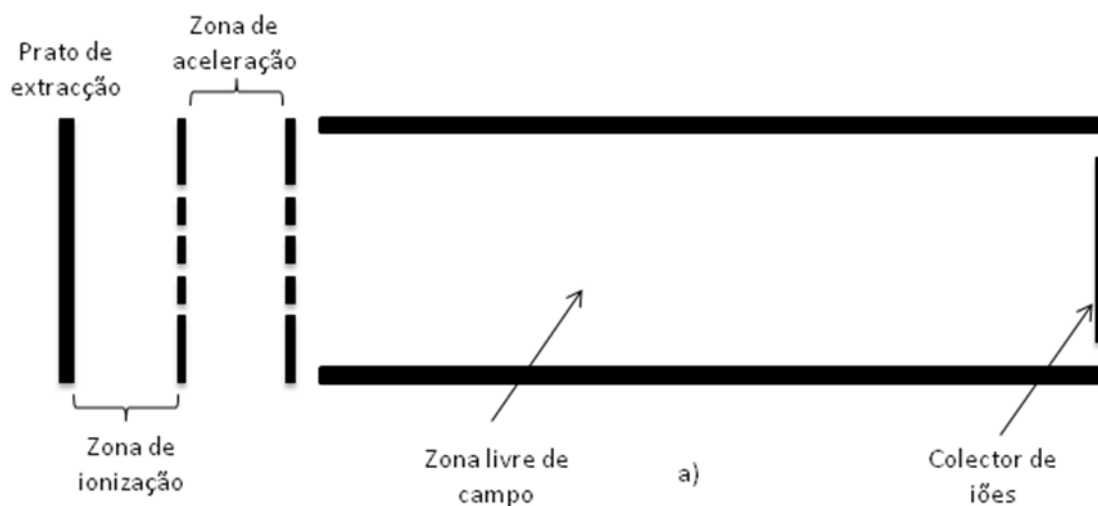




**Figura 3.5.** Na figura a) encontra-se uma representação esquemática da geometria utilizada por Wiley e McLaren (adaptado de<sup>33</sup>) e na figura b) apresenta-se esquematicamente um espectrómetro de tempo de voo do tipo reflector (adaptado de<sup>16</sup>).

### 3.4. Tempo de voo

Seguindo a conformação do tipo de espectrómetro de massa linear idealizado por Wiley e McLaren<sup>33</sup> sugerida em 1955, considere-se o seguinte esquema representativo do espectrómetro tipo tempo de voo com dois estágios:



**Figura 3.6.** - Esquema genérico de um sistema de tempo de voo de dois estágios.

Tendo em conta que, neste tipo de conformação existem duas zonas de extracção dos iões, e sabe-se que o tempo de voo é dado por:

$$t_{TOF} = t_a + t_b + t_D \quad (\text{Equação 3.2.})$$

Em que  $t_a$  representa o tempo de voo na zona de extracção,  $t_b$  o tempo de voo na zona de aceleração e  $t_D$  o tempo de voo na zona livre de campo. De igual modo, se se quiser determinar a energia total de um ião, a mesma obtém-se da seguinte forma:

$$U = U_0 + U_a + U_b = U_0 + q.E_a.s + q.E_b.d \quad (3.3.)$$

Em que  $U_0$  representa a energia inicial da partícula,  $U_a$  a energia adquirida na zona de extracção e  $U_b$  a energia adquirida na zona de aceleração. Na decomposição destes dois últimos termos obtêm-se  $s$  e  $d$ . O termo  $s$  é uma variável que indica a posição inicial de onde partem os iões formados enquanto  $d$  representa o comprimento da zona de aceleração.  $E_a$  e  $E_b$  representam os valores de campo eléctrico das duas zonas.

Considerando que a maior parte das partículas é formada no centro da zona de extracção, defina-se  $s_0$  como metade da distância da zona de extracção e  $D$  o comprimento da zona livre de campo.

Para uma partícula que se encontra em  $s$  e sobre o eixo dos  $xx$  como representado na figura (3.5) tem-se:

$$x = x_0 + v_0 t_a + \frac{1}{2} a_a t_a^2 \quad (3.4.)$$

Sabendo que  $x - x_0 = s$ , a equação das posições rearranja-se da seguinte forma:

$$\frac{1}{2} a_a t_a^2 + v_0 t_a - s = 0 \quad (3.5.)$$

A velocidade inicial da partícula é dada por:

$$U_0 = \frac{1}{2} m v_0^2 \Leftrightarrow v_0^2 = \frac{2U_0}{m} \Leftrightarrow v_0 = \pm \sqrt{\frac{2U_0}{m}} \quad (3.6.)$$

Neste caso têm de ser consideradas tanto a solução positiva como a negativa da velocidade inicial. Tal deve-se ao facto de a velocidade inicial da partícula ao ser criada poder ter o mesmo sentido do campo na zona de extracção (tomando o sinal +) como ter sentido contrário a este (tomando o sinal -).

A aceleração da partícula é dada pela 2ª Lei de Newton:

$$a_a = \frac{F}{m} = \frac{qE_a}{m} \quad (3.7.)$$

Tendo então determinado todos os parâmetros necessários, resolve-se agora a equação 3.4. em ordem ao tempo recorrendo à fórmula resolvente para equações de 2º grau:

$$t_a = \frac{-v_0 \pm \sqrt{v_0^2 + 2a_a \cdot s}}{a_a} \quad (3.8.)$$

Substituindo  $a_a$  pela expressão obtida na equação 3.7. e  $v_0$  pela expressão obtida na equação 3.6. obtém-se:

$$\frac{qE_a}{m} \cdot t_a = \pm \sqrt{\frac{2U_0}{m}} \pm \sqrt{2} \cdot \sqrt{\frac{U_0}{m} + \frac{qE_a}{m} s} \quad (3.9.)$$

Da equação 3.9. verifica-se a existência de quatro soluções possíveis matematicamente, sendo duas delas positivas e duas negativas. Ora, fisicamente sabe-se não ter sentido que  $t_a < 0$ , portanto, o tempo de voo de um ião na zona de extracção é dado por:

$$t_a = \frac{(2m)^{1/2}}{qE_a} \cdot \left[ (U_0 + qsE_a)^{1/2} \pm U_0^{1/2} \right] \quad (3.10.)$$

Ao analisar mais atentamente a equação 3.10., chama-se a atenção para o facto serem obtidas duas soluções. A solução que apresenta sinal negativo no termo  $(U_0)^{1/2}$  corresponde a uma partícula criada na zona de colisões que se desloca com velocidade no mesmo sentido do campo extractor enquanto a que apresenta sinal positivo no termo  $(U_0)^{1/2}$  corresponde a uma partícula criada na zona de colisões e que se desloca com velocidade em sentido contrário ao do campo extractor, fazendo com que o tempo de voo seja menor ou maior nesta zona, respectivamente. Então, analisando esta zona do espectrómetro desta forma, podem ser obtidos os valores máximo (vectores de velocidade e aceleração contrários) e mínimo (vectores de velocidade e aceleração no mesmo sentido) de tempo de voo para duas partículas iguais que tenham sido criadas num mesmo

ponto do espaço mas que não possuam a mesma energia cinética inicial, garantindo-se que, para qualquer outra orientação inicial dos vectores velocidade e aceleração, o tempo de voo varia entre estes dois valores considerados extremos.

Na zona de aceleração, a energia adquirida pela partícula é dada por:

$$U_b = q \cdot E_b \cdot d \quad (3.11.)$$

Utilizando a equação 3.3. sabe-se que a energia da partícula ao entrar na zona de aceleração é:

$$U - U_b = U_o + U_a \quad (3.12.)$$

A equação do movimento para uma partícula que atravessa a zona de aceleração é dada por:

$$x = x_b + v_b t_b + \frac{1}{2} a_b t_b^2 \quad (3.13.)$$

Sabe-se ainda que:

$$x - x_b = d \quad (3.14.)$$

Como tal, substituindo na equação 3.13. obtém-se:

$$\frac{1}{2} a_b t_b^2 + v_b t_b - d = 0 \quad (3.15.)$$

Calculando agora a velocidade da partícula ao entrar na zona de aceleração, esta é dada por:

$$U_o + U_a = \frac{1}{2} m v_b^2 \Leftrightarrow v_b^2 = \frac{2(U_o + U_a)}{m} \Leftrightarrow v_b = \sqrt{\frac{2(U_o + U_a)}{m}} \quad (3.16.)$$

Neste caso, e ao contrário do que foi considerado na equação 3.6., apenas é considerada a solução positiva no que diz respeito à velocidade, dado que esta, devido ao campo que foi aplicado na zona da extracção à partícula, é garantidamente no sentido deste sendo portanto obrigatoriamente positiva.

Em relação à aceleração, esta é dada por:

$$a_b = \frac{F}{m} = \frac{qE_b}{m} \quad (3.17.)$$

Efectuando então a resolução da equação em ordem ao tempo obtém-se:

$$t_b = \frac{-v_b \pm \sqrt{v_b^2 + 2a_b d}}{a_b} \quad (3.18.)$$

Substituindo  $v_b$  e  $a_b$  obtidos nas expressões das equações 3.16. e 3.17. na equação 3.18.:

$$\frac{qE_b}{m} t_b = -\sqrt{\frac{2(U_0 + U_a)}{m}} \pm \sqrt{2} \cdot \sqrt{\frac{U_0 + U_a}{m} + \frac{qE_b}{m} d} \quad (\text{Equação 3.19.})$$

Utilizando a equação 3.12. e assumindo que a segunda parcela da equação 3.19. tem de ser positiva, dado que se for negativa o tempo de voo nesta zona teria um valor negativo, o que não tem significado físico, obtém-se:

$$t_b = \frac{(2m)^{1/2}}{qE_b} \cdot \left[ U^{1/2} - (U_0 + qSE_a)^{1/2} \right] \quad (3.20.)$$

Através da expressão anterior pode-se calcular o tempo de voo de uma partícula na zona de aceleração do espectrómetro, a qual está de acordo com a encontrada em<sup>33</sup>.

Por fim, relativamente à zona livre de campo, pode-se efectuar um tratamento matemático semelhante ao feito anteriormente. Assim, e recorrendo à equação do movimento (Equação 3.4.) tem-se:

$$x - x_D = v_D \cdot t_D \quad (3.21.)$$

Em que  $v_D$  é a velocidade que a partícula possui no momento que entra na zona livre de campo, isto é, a velocidade com que sai da zona de aceleração. O termo que inclui a diferença  $x - x_D$  indica o comprimento da zona livre de campo  $D$ . Sabe-se também que nesta zona não é aplicado qualquer campo à partícula, o que faz com que ela viaje ao longo deste trajecto com a energia que adquiriu nas zonas de extracção e aceleração obtida a partir da equação 3.3. respectivamente. Assim, apenas se torna necessário o cálculo da velocidade  $v_D$ , a qual é dada por:

$$U = \frac{1}{2}mv_D^2 \Leftrightarrow v_D^2 = \frac{2U}{m} \Leftrightarrow v_D = \sqrt{\frac{2U}{m}} \quad (3.22.)$$

Sabe-se ainda que o tempo de voo na zona livre de campo é dado por:

$$t_D = \frac{D}{v_D} \quad (3.23.)$$

Substituindo  $v_D$  pela expressão obtida na equação 3.22. na equação 3.23. pode definir-se o tempo de voo na zona livre de campo como:

$$t_D = \frac{D}{\sqrt{\frac{2U}{m}}} \Leftrightarrow t_D = \frac{\sqrt{2mD}}{2\sqrt{U}} \quad (3.24.)$$

Em que o tempo que uma partícula demora a percorrer esta zona livre de campo depende fundamentalmente da sua massa, dado que a distância  $D$  é igual para qualquer partícula e a energia total adquirida pela partícula só depende das zonas de extracção e aceleração do espectrómetro. Pode-se então agora sintetizar os resultados obtidos através das expressões calculadas para cada um dos tempos de voo parciais de uma partícula, obtidos tendo por base a geometria sugerida por *Wiley e McLaren* em 1955<sup>33</sup>:

$$\begin{cases} t_a = \frac{(2m)^{1/2}}{qE_a} \cdot \left[ (U_0 + qsE_a)^{1/2} \pm U_0^{1/2} \right] \\ t_b = \frac{(2m)^{1/2}}{qE_b} \cdot \left[ U^{1/2} - (U_0 + qsE_a)^{1/2} \right] \\ t_D = \frac{D}{\sqrt{\frac{2U}{m}}} \Leftrightarrow t_D = \frac{\sqrt{2mD}}{2\sqrt{U}} \end{cases} \quad (3.25.)$$

Com a obtenção destas expressões torna-se então possível o cálculo do tempo de voo total de uma dada partícula. Então, trabalhando o sistema de equações 3.25. obtém-se:

$$t_{TOF} = \sqrt{\frac{m}{2}} \times \left[ \frac{D}{U_0 + q.s.E_a + q.d.E_b} + \frac{2(\sqrt{U_0 + q.s.E_a} \pm \sqrt{U_0})}{q.E_a} + \frac{2(\sqrt{U} - \sqrt{U_0 + q.s.E_a})}{qE_b} \right]$$

$$(3.26.)$$

Por forma a proceder a uma análise mais efectiva, recorre-se a um caso particular, em que  $s = s_0$  e  $U_0 = 0$  definindo-se também a seguinte variável:

$$k_0 = \frac{(s_0 E_a + d E_b)}{s_a E_a} \quad (3.27.)$$

Usando as condições impostas e a variável definida na equação 3.27., é possível expressar o tempo total de voo de uma partícula da seguinte forma:

$$t_{TOF}(U_0 = 0, s = s_0) = \left(\frac{m}{2U}\right)^{1/2} \left(2k_0^{1/2} s_0 + \frac{2k_0^{1/2}}{k_0^{1/2} + 1} d + D\right) \quad (3.28.)$$

Recorrendo à equação 3.28. pode-se calcular a resolução em massa, a qual consiste na diferença de tempos de voo entre duas massas consecutivas  $m$  e  $m+1$ , assumindo que as partículas correspondentes a essas massas consecutivas foram criadas com o mesmo valor em módulo de  $s$  e  $U_0$ .

$$\Delta T_m = t_{m+1} - t_m = \left(2k_0^{1/2} s_0 + \frac{2k_0^{1/2}}{k_0^{1/2} + 1} d + D\right) \left[\frac{1}{(2U)^{1/2}} (m+1)^{1/2} - m^{1/2}\right] \quad (3.29.)$$

Considerando o termo dependente de  $k_0$  uma constante  $\alpha$  (isto é, considerando os campos eléctricos  $E_a$  e  $E_b$  constantes assim como a distância da zona de aceleração ( $d$ ) tem-se após algumas aproximações<sup>33</sup>:

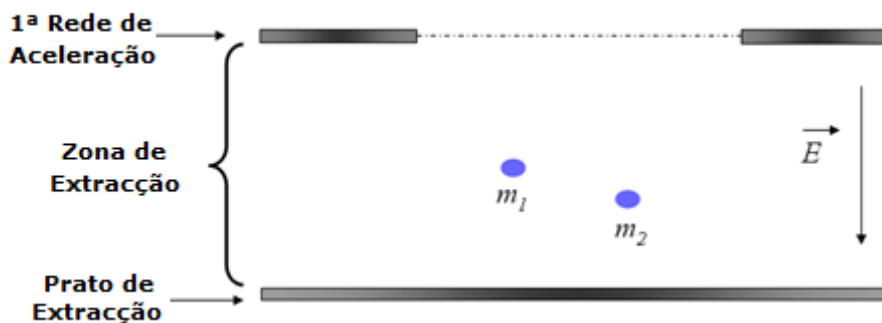
$$\Delta T_m = \frac{\alpha}{(2U)^{1/2}} m^{1/2} \left[\left(\frac{m+1}{m}\right)^{1/2} - 1\right] = t_m \left[\left(1 + \frac{1}{m}\right)^{1/2} - 1\right] \approx \frac{t_m}{2m} \quad (3.30.)$$

Analisando o resultado da equação anterior verifica-se que a capacidade de separação de dois fragmentos correspondentes a massas sucessivas diminui à medida que o valor das massas aumenta. Numa análise puramente conceptual, se os iões forem todos formados num plano paralelo às placas geradoras do campo de extracção e sem qualquer velocidade inicial, o tempo de voo para iões que tivessem a mesma razão massa-carga seria exactamente o mesmo, sendo a resolução apenas dependente das limitações do detector e de toda a electrónica associada.

Na realidade, a situação não é exactamente essa, existindo dois tipos de resolução que têm de ser tidas em conta, a resolução espacial e a resolução em energia.

### 3.4.1. Resolução Espacial

A resolução espacial define a capacidade do sistema para conseguir distinguir massas que são formadas em pontos diferentes da zona de colisão, que na realidade não é pontual mas sim um volume que resulta da intersecção dos perfis de interacção do feixe neutro hipertérmico atómico e do feixe neutro molecular (sendo assumido anteriormente pontual por uma questão de simplificação de cálculos). Na figura 3.7. encontra-se uma representação esquemática da zona de extracção onde são criadas duas partículas idênticas mas em pontos diferentes, as quais estão sujeitas a um campo eléctrico uniforme. Assume-se que as partículas têm massas  $m_1 = m_2 = m$  sendo criadas com energia cinética inicial nula, que são iões negativos e que a tensão aplicada no prato de extracção é negativa em relação à 1ª rede.



**Figura 3.7. – Representação de duas massas iguais criadas em diferentes localizações espaciais na zona de extracção (adaptado de<sup>22</sup>).**

Uma vez que o campo eléctrico aplicado entre o prato de extracção e a 1ª rede repele ambas as partículas em direcção a esta, pode afirmar-se que a velocidade das partículas aumenta proporcionalmente ao tempo, ou seja:

$$v = v_0 + a.t \quad (3.31.)$$

Para  $v_0$  e  $a$  constantes:  $v \propto t$

Desta forma, sabe-se que uma partícula que passe mais tempo nesta zona vai adquirir maior velocidade que outra, que passe menos tempo, isto é, uma partícula que esteja mais perto da 1ª rede de aceleração sai desta zona com menor

velocidade do que uma outra que esteja mais longe da rede dado que esta passa mais tempo sob a influência do campo extractor.

Admitindo que ambas as partículas serão igualmente aceleradas na zona de aceleração (dado que na zona livre de campo não existe nenhum campo aplicado), existe uma distância de convergência, isto é, uma distância para a qual as partículas mais rápidas (que passaram mais tempo na zona de extracção, vindo mais atrasadas) alcançam as mais lentas (que passaram menos tempo na zona de extracção e por isso vão adiantadas em relação às outras).

Com o intuito de calcular esta distância de convergência e baseando os cálculos seguidamente efectuados no tratamento já elaborado por Wiley e McLaren<sup>33</sup>, considere-se que ambas as partículas não apresentam energia cinética inicial, isto é,  $U_o = 0$  e que ambas partem do centro da zona de extracção, ou seja,  $s = s_o$  tornando desta forma os cálculos mais simples.

Para este tipo de análise é necessário garantir uma separação de massas significativa, isto é, obter um valor para o comprimento da zona livre de campo que seja o suficiente para permitir uma boa separação das massas. Desta forma, ao calcular:

$$\left( \frac{dt_{TOF}(U_o, s)}{ds} \right)_{0, s_o} = 0 \quad (3.32.)$$

tentam determinar-se os valores de  $s$  para os quais o tempo de voo é máximo, dado que, pontos com valores de  $s$  em torno destes máximos apresentam valores de tempo total de voo muito semelhantes entre eles (tal deve-se ao facto de a derivada local nestes pontos ser muito pequena), o que significa que, num dado intervalo de valores de  $s$ , o tempo de voo para partículas com a mesma massa é aproximadamente o mesmo.

Aplicando a expressão 3.32. na expressão 3.26. obtém-se:

$$\left( \frac{dt_{TOF}(U_o, s)}{ds} \right)_{0, s_o} = \sqrt{2m} \left[ \frac{1}{2E_s \sqrt{\frac{s_o}{E_s}}} - \frac{DE_s}{4(dE_d + E_s s_o)^{3/2}} + \frac{\frac{E_s}{2\sqrt{dE_d + E_s s_o}} - \frac{E_s}{2\sqrt{E_s s_o}}}{E_d} \right] \quad (3.33.)$$

Resolvendo a equação 3.33. em ordem à distância da zona livre de campo e usando a substituição pela variável definida na equação 3.27. obtém-se a seguinte relação também obtida em<sup>33</sup>:

$$D = 2s_o k_o^{3/2} \left( 1 - \frac{1}{k_o + k_o^{1/2} s_o} d \right) \quad (3.34.)$$

Ao analisar mais atentamente a relação obtida, é evidente a sua independência no que diz respeito à massa das partículas. Esta expressão permite, no caso de um espectrómetro de massa tipo tempo de voo com dois estágios, escolher os valores dos campos a aplicar tanto na zona de extracção como na zona de aceleração tendo em vista a optimização da resolução espacial do aparelho.

Para além da determinação de parâmetros importantíssimos como as tensões de extracção, aceleração e o tamanho da zona livre de campo, é também importante determinar qual a maior massa para a qual é possível resolver um deslocamento em torno de  $s_o$ . Neste caso considere-se  $\Delta t_{\Delta s}$  como a diferença de tempo de voo resultante de uma pequena alteração em torno do centro da zona de extracção. Este parâmetro é uma função, a qual pode ser expandida recorrendo a uma série de Taylor em torno de  $s_o$ <sup>33</sup>

$$\Delta t_{\Delta s} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n!} \left( \frac{dT(0,s)}{ds^n} \right)_{s_0} (\Delta s)^n \quad (3.35.)$$

Nesta série, o termo de ordem 1 foi forçado pela equação 3.32. a ser nulo, e, sabe-se que basta apenas obter o somatório da série até ao termo de ordem 2 dado que indica os pontos de inflexão da função, permitindo resolver o problema que determina o parâmetro  $\Delta t_{\Delta s}$ , por forma a optimizar todos os parâmetros do espectrómetro beneficiando o aparelho em termos de resolução espacial. Recorrendo a algumas aproximações é possível obter uma expressão, a qual indica qual a maior massa para a qual é possível resolver um deslocamento em torno do ponto  $s_o$ <sup>33</sup>:

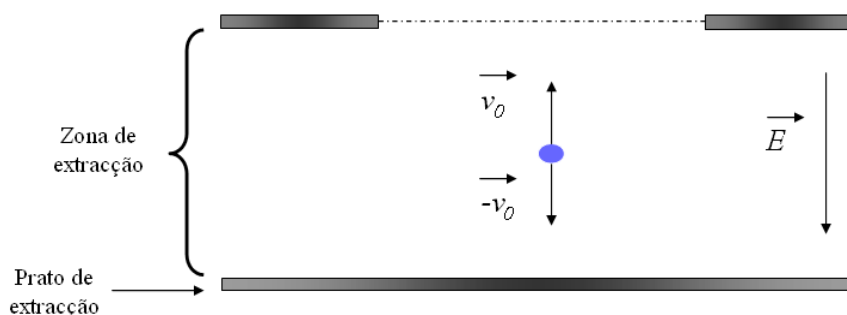
$$M_{\Delta s} \approx 16k_o \left( \frac{s_o}{\Delta s} \right)^2 \quad (3.36.)$$

Para analisar mais atentamente assumam-se que  $k_o \gg 1$  e  $k_o \gg \frac{d}{s_o}$ . Então, verifica-se que, para aumentar o valor de  $M_{\Delta s}$  é necessário ter em conta duas hipóteses: 1) aumentar a razão  $\frac{s_o}{\Delta s}$  ou, 2) aumentar, ainda que indirectamente, o valor de  $k_o$  sabendo que, para tal será necessário um aumento em  $d$ , ou seja, uma aumento na distância da zona de aceleração do espectrómetro. De notar ainda que,

como foi referido no início deste sub-capítulo todos estes cálculos foram realizados assumindo que as partículas não apresentavam energia cinética inicial. De seguida serão apresentados alguns cálculos tendo em vista a determinação da resolução do aparelho tendo em conta que as partículas são formadas com energias cinéticas iniciais diferentes de zero.

### 3.4.2. Resolução em Energia

A resolução em energia consiste na capacidade do sistema distinguir massas que, apesar de serem formadas no mesmo ponto, possuem velocidades iniciais diferentes. Na figura 3.8. representam-se as duas condições consideradas para análise no que diz respeito às velocidades iniciais dos fragmentos formados.



**Figura 3.8.** - Esquema representativo do vector velocidade de dois fragmentos com massa idêntica criados na mesma posição na zona de extracção (adaptado de<sup>22</sup>).

Para tornar a análise mais simples no que diz respeito tanto à abordagem como ao tratamento matemático, considere-se a diferença temporal entre uma partícula que é criada com vector velocidade de sentido e direcção iguais à aceleração do campo aplicado à zona de extracção e uma outra com vector velocidade de direcção igual mas com sentido contrário ao da aceleração do campo (vd. Figura 3.8.). O caso considerado define a maior diferença em termos temporais, uma vez que, por um lado a partícula que apresenta vector velocidade na mesma direcção e sentido do campo extractor vai ser a que terá menor tempo de voo enquanto a que possui vector velocidade com a mesma direcção mas sentido oposto ao do campo extractor terá o maior tempo de voo. Este factor já foi anteriormente considerado na equação 3.10., uma vez que o termo  $U_o^{1/2}$  é antecedido de um sinal  $\pm$  o qual indica o sentido do vector velocidade (- no caso

de o sentido do vector ser igual ao do campo extractor e + no caso de o sentido ser contrário ao do campo extractor).

Considerem-se então duas partículas (partícula 1 e partícula 2) de massas iguais, isto é,  $m_1 = m_2 = m$  as quais são criadas no mesmo ponto ( $s_1 = s_2 = s$ ) mas com vectores velocidade de direcções opostas ( $\vec{v}_{o1} = -\vec{v}_{o2}$ ), tal como representado na Figura 3.8. Recorrendo à equação 3.10. podem calcular-se os tempos de voo de ambas as partículas na zona de extracção:

$$\begin{cases} t_{a1} = \frac{(2m)^{1/2}}{qE_a} \left[ (U_{o1} + qsE_a)^{1/2} - (U_{o1})^{1/2} \right] \\ t_{a2} = \frac{(2m)^{1/2}}{qE_a} \left[ (U_{o2} + qsE_a)^{1/2} + (U_{o2})^{1/2} \right] \end{cases} \quad (3.37.)$$

Após a obtenção dos tempos de voo na zona de extracção para as duas partículas pode então calcular-se a diferença entre os dois tempos de voo da seguinte forma:

$$\Delta t_{\Delta U} = t_{a1} - t_{a2} \Leftrightarrow \Delta t_{\Delta U} = \frac{2 \cdot (2mU_0)^{1/2}}{qE_s} \quad (3.38.)$$

A maior massa distinguível  $M_{\Delta U}$  para partículas que cumpram todos os pressupostos referidos anteriormente é a massa para a qual a diferença de tempos  $\Delta t_{\Delta U}$  é igual à diferença de tempo entre massas adjacentes, isto é:

$$\frac{T_m}{2m} = \Delta t_{\Delta U} \Leftrightarrow M_{\Delta U} = \frac{T}{2\Delta t_{\Delta U}} \quad (3.39.)$$

Assumindo  $T$  como o tempo total que a partícula passa na zona de extracção e substituindo na equação 3.39. as equações 3.37. e 3.38., obtém-se a seguinte equação que relaciona a maior massa distinguível com as distâncias e campos aplicados ao longo de todas as zonas do espectrómetro:

$$M_{\Delta U} = \frac{1}{4} \left( \frac{U}{U_0} \right)^{1/2} \left( \frac{k_0 + 1}{k_0^{1/2}} - \frac{k_0^{1/2} - 1}{k_0 + k_0^{1/2}} \frac{d}{s_0} \right) \quad (3.40.)$$

Analisando atentamente a equação 3.40. verifica-se que existe uma grande dependência de  $M_{\Delta U}$  em relação ao parâmetro  $k_0$ , sendo esta dependência algo

complexa. Portanto, para mais facilmente otimizar o valor de  $M_{\Delta U}$  deve-se diminuir a razão  $d/s_0$  diminuindo assim a influência do segundo termo da expressão.

### 3.4.3. Resolução total

Como foi amplamente descrito anteriormente, a resolução em massa do espectrómetro, isto é, a capacidade de este distinguir duas massas adjacentes é influenciada pela posição e energia iniciais das partículas. A determinação exacta deste parâmetro é extremamente difícil de encontrar, contudo, e através da análise dos factores referidos anteriormente pode-se extrapolar um valor para a resolução total a partir destes. Baseando então o cálculo deste parâmetro no estudo realizado por Wiley e McLaren<sup>33</sup>, este pode ser obtido através de:

$$\frac{1}{M_{total}} = \frac{1}{M_{\Delta s}} + \frac{1}{M_{\Delta U}} \quad (3.41.)$$

Em que  $M_{total}$  é a maior massa que é possível distinguir em relação à massa anterior, considerando as incertezas relacionadas tanto com a posição como com a energia inicial das partículas.

### 3.5. Considerações ao método

A ideia de implementar um espectrómetro de massa tipo tempo de voo baseado na configuração de Wiley e McLaren<sup>33</sup> baseou-se na *elevada transmissão iónica*, dado que, apenas em alguns microssegundos consegue adquirir-se todos os acontecimentos resultantes da formação de fragmentos. Neste tipo de espectrómetro o *intervalo de detecção de massas é idealmente ilimitado*, uma vez que apenas (em teoria) seria necessário aumentar a janela temporal para aumentar o alcance mássico detectado. Tem *dimensões consideradas dentro dos padrões normais deste tipo de espectrómetros* (1,4 m), *baixo custo*, uma vez que a electrónica utilizada não é muito dispendiosa e *facilidade de construção*<sup>35</sup>. Como principal desvantagem deste espectrómetro indica-se a sua limitação de resolução em massa, a qual não passa de algumas centenas e que no presente caso é estimada em cerca de 200. Como é sabido, o tempo de voo de um ião não depende apenas da sua razão massa/carga, fazendo com que, o intervalo de detecção de

massas não seja ilimitado como idealmente é proposto, mas sim reduzido devido aos seguintes factores: *efeito de carga espacial*, que consiste no aumento da velocidade inicial dos iões, fazendo com que seja incrementado o desfasamento entre os iões formados devido a interacções coulombianas; *não-homogeneidade de campos eléctricos*, devida à construção dos eléctrodos aceleradores e que pode causar deformação dos campos eléctricos aplicados; *tempo finito de resposta do detector*, que é o tempo mínimo para o qual o detector está pronto a detectar (no caso do detector canaltrão utilizado é da ordem de  $\sim 20$  ns), e este pode não ser suficientemente curto para detectar com exactidão todas as partículas que a ele chegam; *desfasamento temporal da fonte ionizadora* (não é ionizadora pois o potássio cede o electrão, será melhor *da fonte dadora de electrão*), que se deve à largura do impulso do feixe atómico hipertérmico, o qual não segue a forma ideal de impulso, influenciando a velocidade inicial dos iões e produzindo alargamento nos picos<sup>35</sup>. No que diz respeito a estas limitações, Wiley e McLaren introduziram uma condição especial de focagem do espectrómetro, que torna o tempo de voo, em primeira aproximação independente da posição inicial dos iões<sup>33</sup> (como visto anteriormente). O uso de campos eléctricos tanto na zona de aceleração como na zona de extracção mostrou ser bastante eficaz na minimização da dispersão da distribuição das velocidades iniciais dos iões<sup>35,36,37</sup>. Por outro lado, o uso de campos eléctricos ou magnéticos combinados com regiões livres de campo foram bastante estudados e verificou-se serem factores bastante importantes no aumento da resolução deste tipo de espectrómetro<sup>38,39,40</sup>.

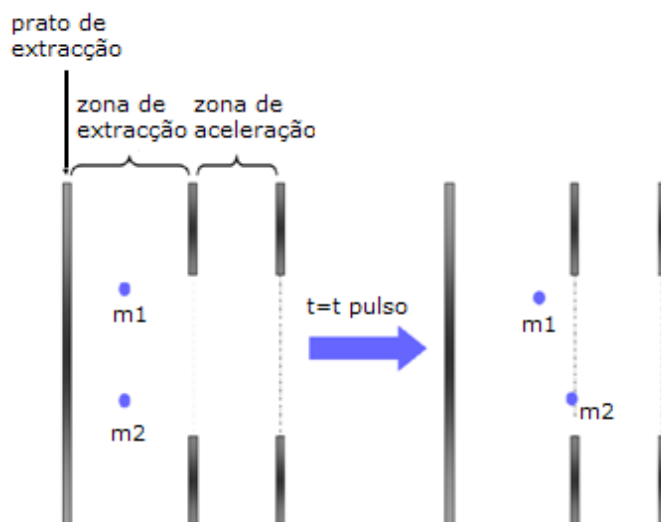
### 3.6. O método de pulsação e suas desvantagens

Como se apresenta evidenciado através da figura 3.3., o procedimento usado no espectrómetro concebido no Laboratório de Colisões Atómicas e Moleculares do CEFITEC, consiste num conjunto de impulsos devidamente sincronizados. À semelhança de muitos outros espectrómetros deste tipo, começa por se pulsar o feixe projectil (feixe atómico) de forma a que as colisões entre este e a molécula alvo aconteçam na forma de "pacotes". Este procedimento elimina alguns dos efeitos experimentais e que possivelmente podem influenciar a resolução do sistema de detecção. No entanto, e neste caso em particular, a aplicação deste procedimento é bastante complexa, uma vez que o feixe projectil é neutro (ao contrário de outras experiências semelhantes nas quais são usados electrões livres, impossibilitando o uso de elementos deflectores eléctricos para parar o feixe. Por outro lado, ao nível mecânico também não existem soluções que operem no regime pretendido, isto é, que operem em alguns nanossegundos,

influenciando também por isso a própria resolução do aparelho. Como tal, a solução encontrada para operar com uma conjugação de impulsos, ou seja em "*modo pulsado*", que passa por aplicar um impulso negativo ao prato de extracção, ou seja, quando é aplicado um impulso de valor negativo ao prato de extracção relativamente à 1ª rede de aceleração os fragmentos que se encontram na zona de colisão (e que já foram criados graças a um "pacote" de átomos de potássio) vão ser extraídos desta zona sendo posteriormente acelerados na zona de aceleração e voando livremente até ao detector. Este tipo de abordagem provoca alguns efeitos que contribuem para a diminuição da resolução em massa do espectrómetro. O mais importante de todos será, porventura o impulso de extracção. Os seus parâmetros, nomeadamente a duração e amplitude têm influência tendo em conta o intervalo de tempo e a posição em que um determinado fragmento é criado. Para mais facilmente perceber este fenómeno, considerem-se dois fragmentos de massa igual (fragmento 1 e 2), os quais são criados na mesma posição, com a mesma energia inicial, mas com um intervalo de tempo de atraso de criação  $\Delta t$  entre eles. Assuma-se ainda que, o fragmento 1 é criado num instante temporal  $t$  e o tempo que passa até ele entrar na zona de aceleração coincide com a duração do impulso de extracção. Sabe-se também que o fragmento 2, o qual é criado com um atraso  $\Delta t$  em relação ao fragmento 1 tem o mesmo tempo de voo até entrar na zona de aceleração. Neste caso, o fragmento 1 segue um movimento uniformemente acelerado desde que é criado até entrar na zona de aceleração. Já no que diz respeito ao fragmento 2, o seu movimento apenas será uniformemente acelerado durante o intervalo de tempo em que o impulso ainda perdura, sendo que, quando o impulso acaba entra num regime de movimento uniforme. Esta transição faz com que exista uma diferença temporal significativa de tempos de voo entre estes dois fragmentos, traduzindo-se no espectro final com uma "cauda" na assinatura espectral correspondente a esse fragmento.

Considere-se ainda um outro caso no qual existem dois fragmentos (fragmento 1 e 2) com massas diferentes ( $m_1 \neq m_2$ ) mas que são criados na mesma posição e no mesmo instante temporal. Admita-se ainda que a largura do impulso de extracção é a suficiente para extrair o fragmento 1, isto é, tem a duração necessária para fazer com que o fragmento 1 chegue à zona de aceleração. Como as massas dos dois fragmentos são diferentes têm de ser considerados dois casos:

- $m_1 > m_2$

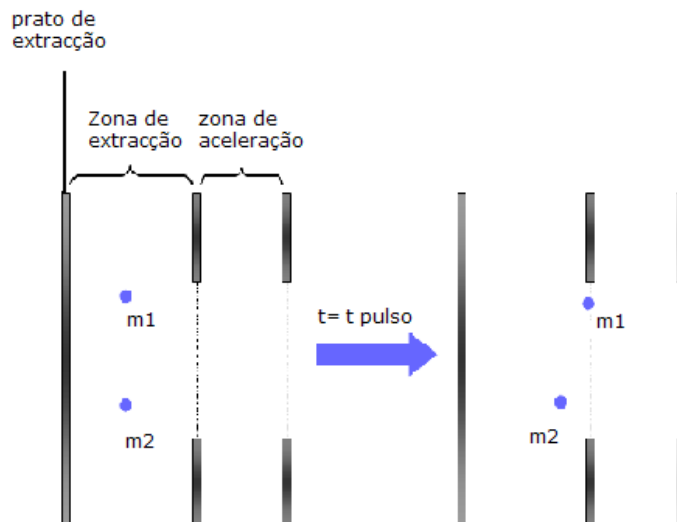


**Figura 3.9.- Possível localização dos fragmentos 1 e 2 no início e no fim do impulso cuja largura é o tempo que o fragmento 1 leva a chegar à 1ª rede.**

Neste caso, como a massa do fragmento 1 é superior à do fragmento 2, o tempo que o fragmento 1 levaria a chegar à primeira rede de aceleração pode ser suficiente para que, mesmo que o fragmento 2 que tenha sido criado ligeiramente depois consiga entrar na zona de aceleração sendo também ele extraído, como mostra a figura 3.9.

- $m_1 < m_2$

No caso em que a massa do fragmento 2 é maior do que a do fragmento 1, poderá acontecer que, quando o fragmento 1 chega à zona de aceleração o fragmento 2 não teve tempo suficiente para chegar a esse ponto. Como o impulso de extracção acaba nesse preciso instante, o fragmento 2 vai passar a um movimento rectilíneo uniforme, o que faz com que não seja correctamente detectado, dado que o seu tempo de voo total não corresponde a uma extracção efectiva através do campo acelerador da zona de extracção. Esta situação pode ser mais facilmente visualizada através da figura 3.10.



**Figura 3.10.** – Possível localização dos fragmentos 1 e 2 no início e fim de um impulso cuja largura é o tempo necessário para levar o fragmento 1 à 1ª rede de aceleração.

Todos estes efeitos produzidos apenas por uma escolha inapropriada do impulso de extracção mostram a sua real importância. Então, para que se consiga obter um pico de um espectro de massa correspondente a um dado fragmento iónico, que não apresente qualquer estrutura resultante de efeitos experimentais é necessário ajustar o valor da largura do impulso de extracção tendo em conta a massa que se pretende detectar, minimizando os efeitos referidos. Assuma-se então que a largura de impulso escolhida é inferior à necessária para extrair massas maiores e maior do que a necessária para extrair as massas mais leves. Os picos correspondentes a massas maiores não terão a intensidade real dado que nem todos os fragmentos conseguem ser extraídos. Já no que diz respeito às massas mais pequenas, como o tempo de impulso de extracção é excessivo significa que alguns dos fragmentos criados durante a duração do impulso estão a ser extraídos. Por este motivo, o procedimento adoptado no que diz respeito à aquisição de espectros de massa passou pela selecção de um impulso que permitisse extrair a maior massa comprometendo, ainda que sem grandes efeitos negativos a resolução da parte inicial do espectro.

### 3.7. Materiais

#### 3.7.1. Nitrometano

Trata-se de um composto químico com a fórmula empírica  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ . É usado como combustível em aerodelos e em alguns automóveis de competição sendo também usado como estabilizante para solventes clorados, como por exemplo o clorofórmio. É ainda conhecido pelo seu elevado carácter cancerígeno devido à sua volatilidade e reactividade. A molécula foi adquirida no estado líquido à *Sigma Aldrich* com o número CAS 75-52-5, massa molar de 61,04 g/mol e pureza  $\geq 98\%$ .

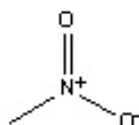


Figura 3.9. – Representação esquemática da molécula de nitrometano.

#### 3.7.2. Nitrometano deuterado

Este composto químico é semelhante ao nitrometano e tem como fórmula empírica  $\text{CD}_3\text{NO}_2$ . Trata-se de uma molécula bastante volátil e reactiva e foi adquirido no estado líquido à *Sigma Aldrich* com o número CAS 13031-32-8, massa molar 64,0585 g/mol e pureza 99%.

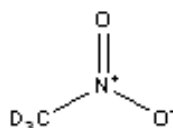


Figura 3.10 – Representação esquemática da molécula de nitrometano deuterado.

#### 3.7.2. Timina

A timina é uma das quatro bases do ADN. Consiste num anel aromático azotado, sendo por isso designada de pirimidina. A sua fórmula empírica é  $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ . A molécula foi adquirida à *Sigma Aldrich* com o número CAS 65-71-4, massa molar de 126,11 g/mol e pureza  $\geq 99\%$ .

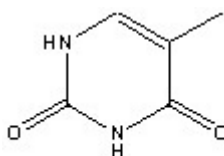


Figura 3.11. – Representação esquemática da molécula de timina.

## Capítulo 4. Resultados Experimentais

### 4.1. Considerações gerais

Tendo em conta objectivo primordial desta dissertação que passa pela tentativa de identificar mecanismos de degradação ao nível do ADN induzidos por electrões de baixa energia provenientes da interacção da radiação ionizante com tecido celular, utilizou-se o fenómeno de transferência de electrão entre um átomo dador (potássio) e uma molécula receptora. Neste caso, a molécula que se pretende estudar é a base de ADN, timina ( $C_5H_6N_2O_2$ ).

Para efectuar o estudo de transferência de electrão nesta molécula foi necessário proceder à calibração do aparelho de feixes moleculares cruzados, nomeadamente do espectrómetro de massa do tipo tempo de voo, usando-se para esse efeito a molécula de nitrometano, dado ter sido estudada anteriormente<sup>41</sup> num dispositivo experimental com uma conformação similar e o seu padrão de fragmentação de iões negativos ser conhecido<sup>42,43,44,45</sup>.

Tendo em conta a maior exigência em termos de concepção do espectrómetro TOF em relação ao referido em<sup>41</sup>, efectuou-se a calibração do aparelho, constatando-se ainda que a resolução do espectrómetro permitia visualizar mais fragmentos do que anteriormente. Os resultados serão mostrados de seguida e será feita uma comparação entre os resultados actuais e outros realizados por diferentes autores<sup>41,42,43,44,45</sup>.

No que diz respeito à molécula de timina, segue-se um estudo mais aprofundado, tentando-se estabelecer um paralelismo com os fenómenos que ocorrem ao nível fisiológico tendo em conta diversos factores tais como a produção de radicais, nomeadamente o radical hidróxilo e o radical hidrogénio, assim como a fragmentação específica da base. Esta molécula em conjunto com as restantes bases de ADN e com a base de ARN, Uracilo ( $C_4H_4N_2O_2$ ), tem sido alvo de muitos estudos principalmente de captura electrónica dissociativa com os quais os dados obtidos serão comparados.

### 4.2. Interpretação de resultados

Os espectros de tempo de voo obtidos resultam da aquisição de conjuntos de impulsos gerados pela chegada dos diversos fragmentos iónicos ao detector canaltrão formados pela colisão da molécula em estudo com átomos de potássio. São dependentes do número de contagens por unidade de tempo (C/s), em função

do tempo de voo característico de cada uma das partículas ( $\mu\text{s}$ ). Em relação à conformação referida por Almeida<sup>22</sup>, os melhoramentos do espectrómetro passaram essencialmente por um aumento tanto do campo pulsado aplicado na extracção dos iões formados, sendo este de -400 V e com impulso variável tendo em conta a maior massa a extraír, assim como um aumento do campo aplicado à zona de aceleração, passando a ser -3500 V, para além da introdução de fendas de colimação para ambos os feixes, o que diminui o volume de colisão formado aumentando a resolução espacial (vd. capítulo 3.4.2). Em suma, alterações melhoraram a resolução do espectrómetro tanto em termos espaciais como em termos de energia, permitindo obter resultados inovadores.

#### 4.2.1. Calibração em massa

O processo de calibração para o espectrómetro de massa TOF baseou-se num sistema iterativo, isto é, à medida que foram identificadas as massas que surgiam nos espectros, introduziram-se também no cálculo da curva de calibração para o espectrómetro. Inicialmente começou por se usar fragmentos formados pela colisão de átomos de potássio neutros com nitrometano cujo padrão era conhecido<sup>41</sup>. Na tabela 4.1 podem consultar-se os fragmentos usados nesta primeira calibração em massa do aparelho.

**Tabela 4.1- Tempo de voo das massas usadas para a calibração do espectrómetro tendo em conta a fragmentação conhecida<sup>41</sup>.**

M (u.m.a)	Canal	Tempo de voo ( $\mu\text{s}$ )	Fragmento
1*	290	2,32	(H) <sup>-</sup>
16	962	7,696	O <sup>-</sup>
46	1584	12,672	(NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>
61	1814	14,512	(CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>

\* Este fragmento não tinha sido obtido anteriormente.

Com estes pontos, ajustou-se a uma função do tipo:

$$m_{\text{fragmento}} = \left( \frac{t_{\text{TOF}} - A}{B} \right)^2 \quad (4.1)$$

onde A e B são duas constantes arbitrárias adimensionais.

A equação obtida para este primeiro ajuste encontra-se definida na equação 4.2.

$$m_{\text{fragmento}} = \left( \frac{t_{\text{TOF}} - 67,269}{-223,642} \right)^2 \quad (4.2)$$

Recorrendo a esta primeira iteração, usaram-se todas as massas obtidas no espectro de nitrometano, sendo também usadas duas massas as quais se devem a fragmentos devidamente relatados na bibliografia<sup>46</sup> permitindo obter assim um melhor ajuste em termos de calibração de massas, dado que a timina possui uma massa muito superior em relação ao nitrometano (126 u.m.a. para 61 u.m.a. respectivamente), o que poderia gerar algumas discrepâncias em termos de calibração, nomeadamente para massas superiores. Assim, na tabela 4.2. encontram-se todos os fragmentos usados na calibração definitiva deste espectrómetro.

**Tabela 4.2 - Tempo de voo das massas usadas para a calibração definitivado espectómetro tendo em conta toda a fragmentação da molécula de nitrometano e dois fragmentos da molécula de timina (massas 55 u.m.a. e 125 u.m.a.).**

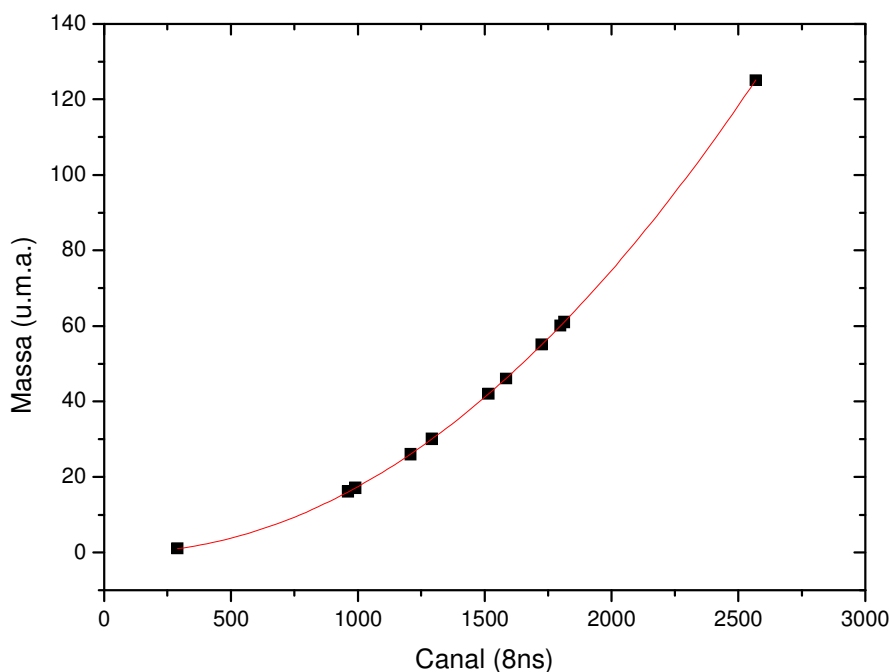
M (u.m.a)	Canal	Tempo de voo ( $\mu\text{s}$ )	Fragmento
1	290	2,32	(H) <sup>-</sup>
16	962	7,696	(O) <sup>-</sup>
17	990	7,92	(OH) <sup>-</sup>
26	1208	9,664	(CN) <sup>-</sup>
30	1292	10,336	(NO) <sup>-</sup>
42	1516	12,121	(CNO) <sup>-</sup>

46	1584	12,672	(NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>
55	1725	13,8	(C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O) <sup>-</sup>
60	1799	14,392	(CH <sub>2</sub> NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>
61	1814	14,512	(CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>
125	2569	20,552	(T-H) <sup>-</sup>

Utilizando novamente a curva-tipo referida na equação 4.1, chegou-se à expressão numérica para a calibração do espectrómetro, que se encontra definida na equação 4.3.

$$m_{\text{fragmento}} = \left( \frac{t_{\text{TOF}} - 65,583}{-223,876} \right)^2 \quad (4.3)$$

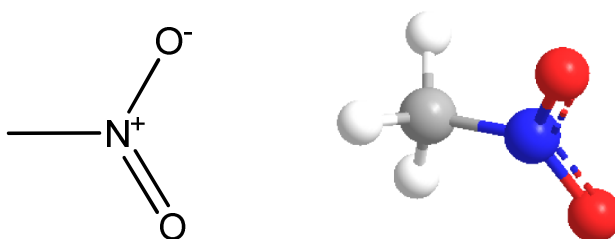
O facto de se ter usado este tipo de expressão baseia-se na proporcionalidade existente entre as massas dos fragmentos e os seus tempos de voo (já que como referido no capítulo 3,  $m \propto t^2$ ). O coeficiente de correlação deste ajuste é dado por  $R^2=0,9997$ , o que indica que o ajuste realizado é adequado ao pretendido. Na figura 4.1 encontra-se uma representação gráfica do ajuste realizado. Desta forma consegue-se então passar de um espectro que tinha por abcissas o tempo de voo dos iões para a massa desses iões.



**Figura 4.1 – Curva utilizada para efectuar a calibração do espectrómetro TOF.**

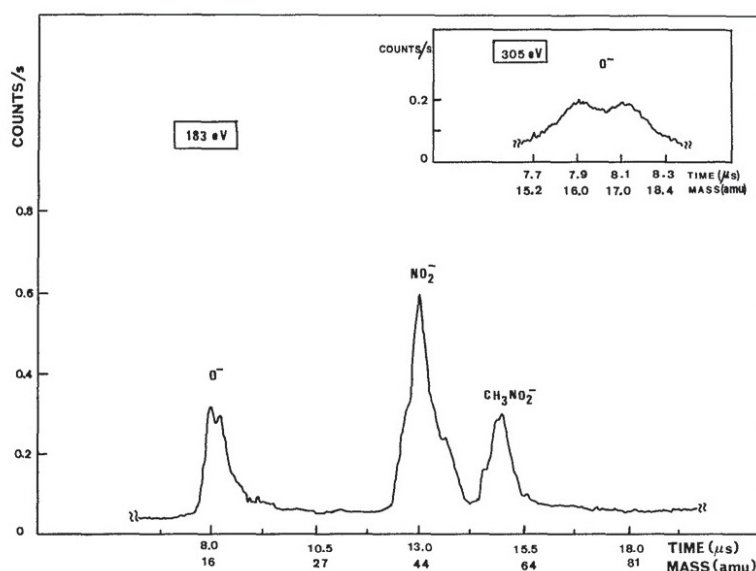
#### 4.2.2. Nitrometano

A molécula de nitrometano ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) é a mais simples de todos os nitroderivados e tem sido muito estudada<sup>41,43,44,45,47,48</sup> devido ao facto de: 1) ter um papel muito importante na mediação de processos na atmosfera, mais propriamente ao nível da estratosfera, onde resulta da reacção entre radicais metilo ( $\text{CH}_3^\bullet$ ) e óxidos de azoto ( $\text{NO}_2$ ); 2) apresentar características típicas dos explosivos e propelentes e 3) poder agir como agente carcinogénico, daí também ter alguma relevância biológica.



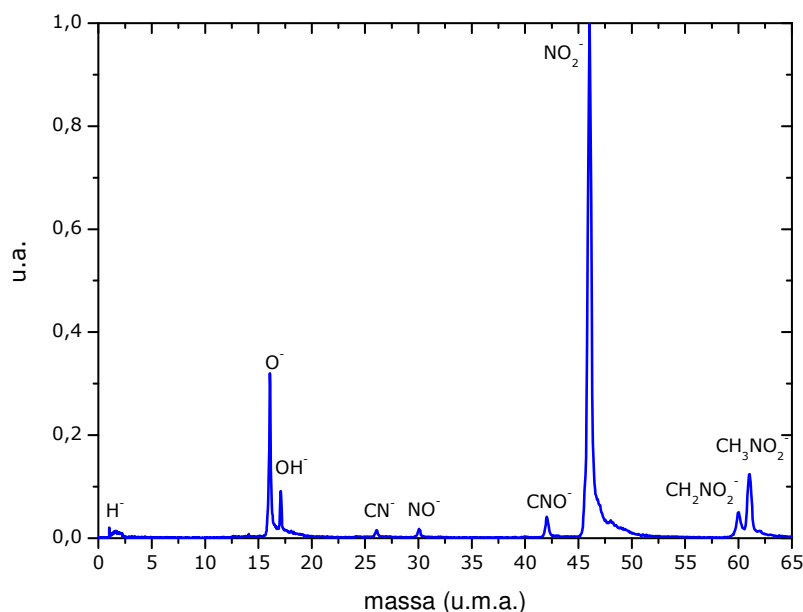
**Figura 4.2 – Esquemas bidimensional e tridimensional da molécula de nitrometano.**

Inicialmente estudada por *Fluendy et al.*<sup>48</sup>, por transferência de electrão, os autores verificaram a existência do ião progenitor negativo ( $\text{CH}_3\text{NO}_2^-$ ) identificando ainda ressonâncias bastante específicas (0,72 eV e 2,4 eV) para a molécula excitada vibracionalmente, o que pressupõe a auto-libertação do electrão para estas energias. Posteriormente, *Lobo et al.*<sup>41</sup> obtiveram os resultados de espectrometria de massa do tipo TOF que podem ser visualizados na figura 4.3:

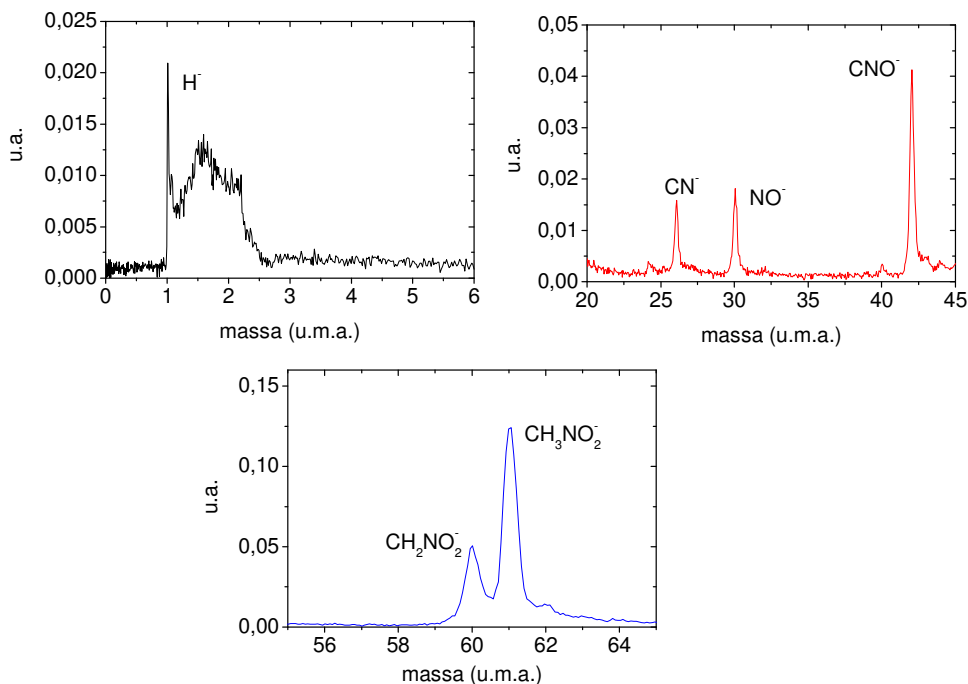


**Figura 4.3 - Espectro típico de nitrometano obtido a uma energia de colisão de 183 eV. No canto superior direito da imagem pode ver-se em maior pormenor a estrutura identificada do fragmento  $\text{O}^-$  (adaptado de<sup>41</sup>).**

Analisando mais cuidadosamente o trabalho destes autores, nota-se que, devido à falta de resolução experimental, as estruturas apresentadas sugerem a presença de um ou mais picos que não estão resolvidos pelo que foram identificadas apenas 3 espécies aniónicas as quais se encontram listadas na tabela 4.3. No trabalho actual, e tendo em conta a conformação do espectrómetro de massa tipo TOF desenvolvido pelo grupo, foram detectadas nove espécies aniónicas de entre as quais as mais intensas são: o anião progenitor negativo ( $\text{CH}_3\text{NO}_2^-$ ), o anião-pai desidrogenado ( $\text{CH}_3\text{NO}_2\text{-H}^-$ ),  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{CNO}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}^-$  e outros fragmentos de menor intensidade, os quais se apresentam bastante melhor resolvidos, fazendo com que informações que podem ser retiradas de um espectro desta molécula sejam muito mais completas, como pode ser observado nas figuras 4.4 e 4.5. Através dos espectros adquiridos a diversas energias de colisão (nomeadamente 30, 70 e 100eV) constata-se que o fragmento mais intenso é sempre o anião  $\text{NO}_2^-$ , enquanto que os aniões  $\text{OH}^-$  (massa 17),  $\text{CN}^-$  (massa 26),  $\text{NO}^-$  (massa 30),  $\text{CNO}^-$  (massa 42) e ( $\text{CH}_3\text{NO}_2\text{-H}^-$ ) (massa 60) têm intensidades muito reduzidas (inferiores a 10%) em relação a este. Se por um lado os aniões  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{O}^-$  têm como origem a simples dissociação de uma ligação após a formação do TNI, a formação de fragmentos tais como  $\text{CNO}^-$ ,  $\text{OH}^-$  e  $\text{CN}^-$  deve resultar de reacções mais complexas que envolvem quebras múltiplas de ligações assim como rearranjos de energia interna do TNI.

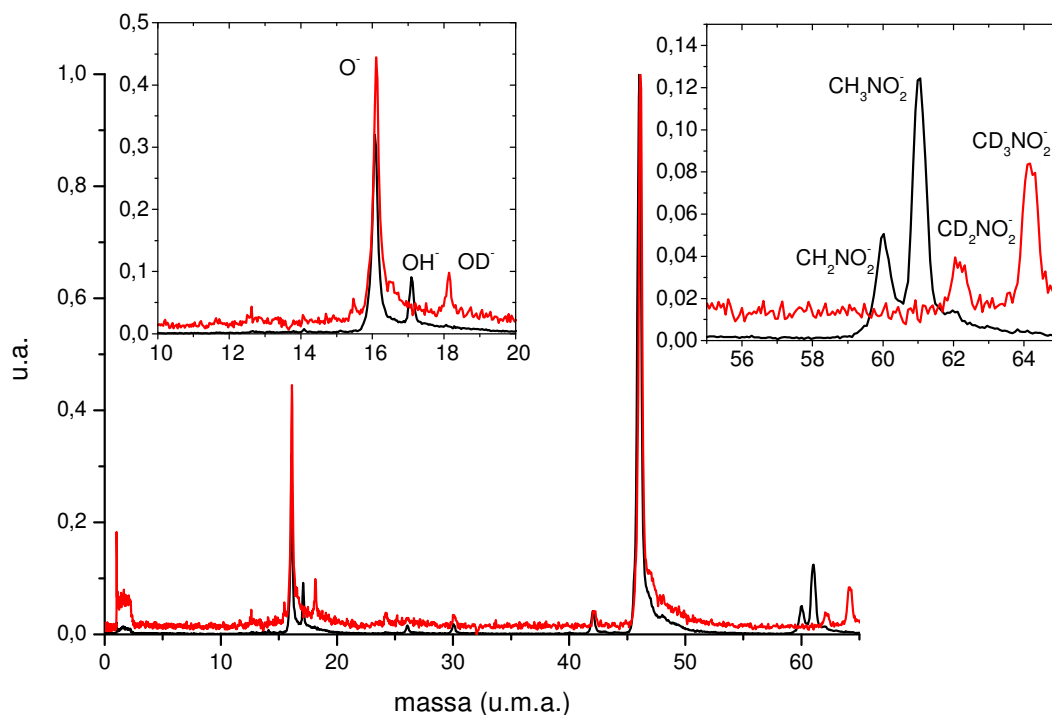


**Figura 4.4 – Espectro típico da molécula de nitrometano obtido com a recente configuração de espectrómetro a uma energia de colisão de 100 eV. O espectro encontra-se normalizado ao pico de maior intensidade, neste caso o correspondente ao anião  $\text{NO}_2^-$ .**



**Figura 4.5 - Espectros mais detalhados de determinadas zonas para a molécula de nitrometano resultantes de ampliações da figura 4.4.**

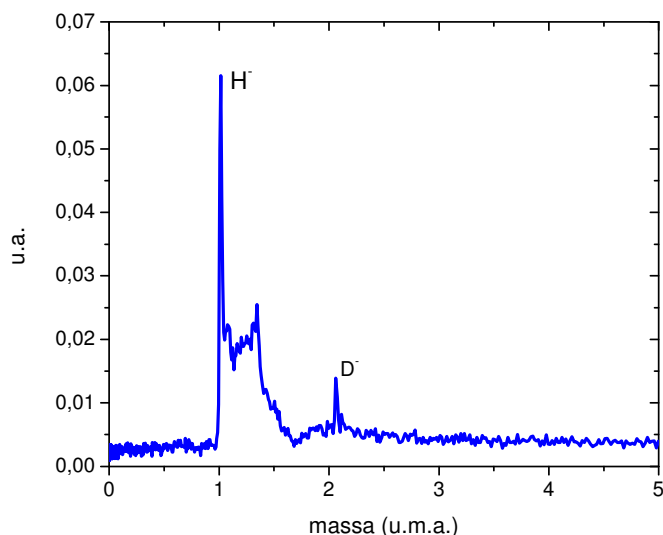
A grande novidade destes resultados relativamente aos estudos realizados anteriormente prende-se com a diferenciação constatada em relação ao pico referente ao anião  $O^-$ . Segundo *Lobo et al.*<sup>41</sup> e um estudo realizado por Almeida<sup>22</sup> com uma configuração ligeiramente diferente do espectrómetro, ao fragmento  $O^-$  era atribuída uma estrutura de dois picos que os autores referenciados designavam como um rearranjo do ião progenitor molecular, ou seja, uma isomerização, que permitia que este fragmento surgisse em duas escalas temporais distintas. Esta assumpção baseava-se fundamentalmente na falta de resolução de ambos os espectrómetros de tempo de voo. Actualmente e graças não só a uma melhor resolução como também à custa da deuteração da molécula de nitrometano (substituindo todos os hidrogénios da molécula por átomos de deutério:  $CD_3NO_2$ ), verificou-se um afastamento destes dois picos podendo assim atribuir-se a estrutura referida a duas espécies aniónicas distintas:  $O^-$  e  $OH^-$  ( $OD^-$ ). Na figura 4.6 pode visualizar-se a sobreposição de dois espectros, um de nitrometano ( $CH_3NO_2$ ) e outro de nitrometano deuturado ( $CD_3NO_2$ ) na qual se verifica o afastamento entre os dois picos que, no caso do deutério por ter 2 u.m.a permitiu distinguir os aniões  $O^-$  e  $OH^-$  ( $OD^-$ ).



**Figura 4.6 – Figura demonstrativa da distinção dos fragmentos aniônicos  $O^-$  e  $OH^-$  à custa da deuteração da molécula de nitrometano. Na ampliação mais à direita encontra-se a zona do anião-progenitor e o seu correspondente deuturado.**

Observando mais atentamente o espectro da figura 4.6, pode também observar-se a formação do ião progenitor de nitrometano deuturado ( $CD_3NO_2^-$ ) e o anião ( $CD_2NO_2^-$ ) que se apresentam mais afastados devido à deuteração da molécula, permitindo também demonstrar a existência do anião progenitor ao contrário do que sucede em CED. A detecção do ião progenitor com esta técnica deve-se fundamentalmente ao elevado momento dipolar da molécula (3,46 D), que permite a formação de um estado dipolar ligado, à semelhança do que acontece em transferência de electrão com átomos de Rydberg<sup>49</sup>. Em 1996, este facto foi confirmado por *Compton et al.*<sup>50</sup>, que inclusivamente determinaram uma afinidade electrónica adiabática de 12 meV para o estado dipolar ligado. Em relação à deuteração da molécula de nitrometano pode ainda constatar-se a formação do fragmento  $D^-$  de 2 u.m.a., como é possível verificar através da figura 4.7. Neste caso, e apesar de não ser previsível a detecção do anião  $H^-$ , a sua presença pode facilmente ser explicável à custa de dois factores. A molécula nitrometano deuturado foi adquirida com 99% de pureza, e, sendo uma molécula sintetizada não muito estável (os átomos de deutério facilmente se dissociam da molécula sendo preenchidos por átomos de hidrogénio provenientes de água, impurezas, etc.), faz com que as impurezas possam contribuir para o aparecimento deste fragmento. Contudo, isso não explica a maior intensidade do anião  $H^-$  em relação

ao anião  $D^-$ . Esta maior intensidade pode ser explicada estabelecendo um termo de comparação com o estudo de *Ptasinska et al.*<sup>51</sup>, no qual, para o caso da molécula de timina deuterada em algumas posições verifica que existem algumas impurezas devidas à não-deuteração de todas as posições pretendidas, para além de uma maior eficiência de detecção do anião  $H^-$  em relação ao  $D^-$ .



**Figura 4.7 – Espectro de nitrometano deuterado no qual se consegue visualizar a formação do fragmento  $D^-$ .**

Na tabela 4.3 estão listados os padrões de fragmentação da molécula de nitrometano estudados por diversos autores, em colisões átomo-molécula e em captura electrónica dissociativa.

**Tabela 4.3 – Padrões de fragmentação aniónicos da molécula de nitrometano identificados no trabalho actual e em estudos anteriores.**

M (u.m.a)	Fragmento	Di					Trabalho Actual
		Lobo et al. <sup>41</sup>	Domenico et al. <sup>42</sup>	Walker et al. <sup>43</sup>	Sailer et al. <sup>44</sup>	Alizadeh et al. <sup>45</sup>	
1	$(H)^-$	-	-	-	-	✓	✓
13	$(CH)^-$	-	✓	✓	✓	✓	-
14	$(CH_2)^-$	-	-	-	-	✓	-
15	$(CH_3)^-$	-	-	-	-	✓	-
16	$(O)^-$	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17	$(OH)^-$	-	✓	✓	✓	✓	✓
18	$(^{18}O)^-$	-	-	-	-	✓	-
26	$(CN)^-$	-	✓	✓	✓	✓	✓
30	$(NO)^-$	-	✓	-	✓	✓	✓
32	$(H_2NO)^-$	-	-	-	-	✓	-

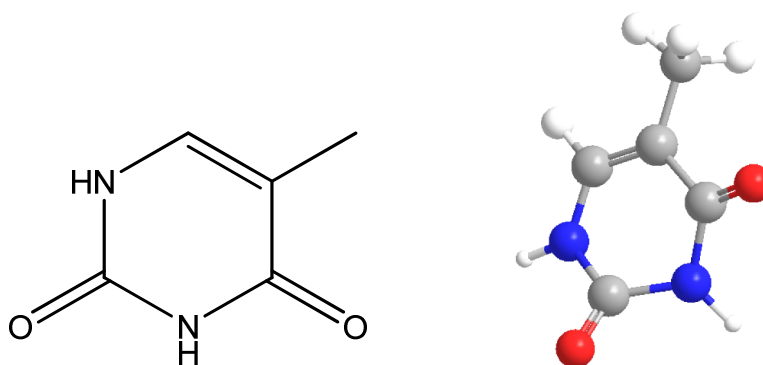
42	(CNO) <sup>-</sup>	-	√	√	√	√	√
44	(CH <sub>2</sub> NO) <sup>-</sup>	-	-	-	-	√	-
46	(NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	√	√	-	√	√	√
47	( <sup>15</sup> NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	-	-	-	-	√	-
59	(CHNO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	-	√	-	-	√	-
60	(CH <sub>2</sub> NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	-	√	-	-	√	√
61	(CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	√	-	-	-	-	√

Observando atentamente a tabela 4.3, pode constatar-se a grande quantidade de fragmentos detectados no estudo actual. Em relação ao estudo realizado anteriormente com esta técnica<sup>41</sup> salienta-se a identificação de aniões tais como: H<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, CNO<sup>-</sup>, CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Comparando os resultados actuais com os obtidos por CED, nomeadamente por *Alizadeh et al.*<sup>45</sup> verifica-se que o padrão de fragmentação mais intenso diz respeito ao anião NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Contudo, existem alguns fragmentos que não se conseguem identificar com esta técnica. O facto de não serem identificados deve-se predominantemente a questões de resolução, uma vez que os referidos autores possuem selectores magnéticos que lhes permitem seleccionar massas desejadas conseguindo identificar os diversos isotopómeros de algumas moléculas como é o caso dos fragmentos <sup>18</sup>O<sup>-</sup> e <sup>15</sup>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. No que diz respeito aos fragmentos CH<sup>-</sup>, CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub><sup>-</sup>, a sua não-identificação através do processo de TE pode ter duas origens. Em primeiro lugar tem de se ter em conta o facto de as secções eficazes destes fragmentos serem bastante baixas<sup>45</sup>, por outro lado, tem também de se ter em conta as afinidades electrónicas destes fragmentos, AE(CH)=1,238 ± 0,008 eV<sup>52</sup>; AE(CH<sub>2</sub>)=0,652 ± 0,006 eV<sup>53</sup>; AE(CH<sub>3</sub>)=0,08 ± 0,03 eV<sup>54</sup>, as quais são muito menores do que a afinidade electrónica do grupo NO<sub>2</sub> (AE(NO<sub>2</sub>)=2,273 ± 0,05 eV<sup>55</sup>), explicando desta forma a grande intensidade do pico deste último fragmento em detrimento dos outros, que nem sequer são visualizados.

Há ainda a salientar que, no espectro da Figura 4.7, à direita do pico de H<sup>-</sup> aparece uma estrutura que corresponde a um artefacto experimental resultante do impulso de pulsação dos átomos de potássio. Na realidade este impulso não é perfeitamente quadrado, o que introduz uma distribuição de átomos neutros na zona de colisão com uma energia até 10% do valor nominal escolhido. O patamar observado corresponde efectivamente à taxa de formação dos aniões H<sup>-</sup>. A largura deste patamar pode ser controlada experimentalmente, e no caso da Figura 4.7, foi ajustada de forma a permitir a detecção de D<sup>-</sup>.

### 4.2.3. Timina

A timina é um composto orgânico da família das pirimidinas, sendo também um importante constituinte do ácido desoxirribonucleico (ADN). Tal como os outros ácidos nucleicos (bases), a timina está ligada na dupla cadeia do ADN por um grupo fosfato e um açúcar (desoxirribose). Na figura 4.7 pode observar-se estruturalmente a molécula de timina.

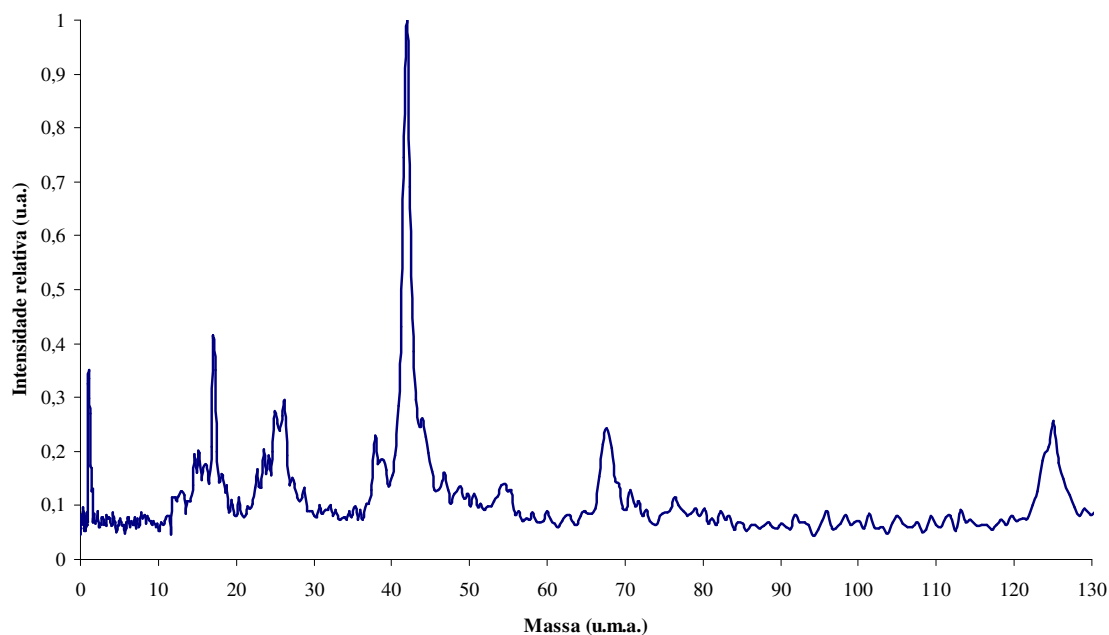


**Figura 4.7 – Esquemas bidimensional e tridimensional da molécula de timina.**

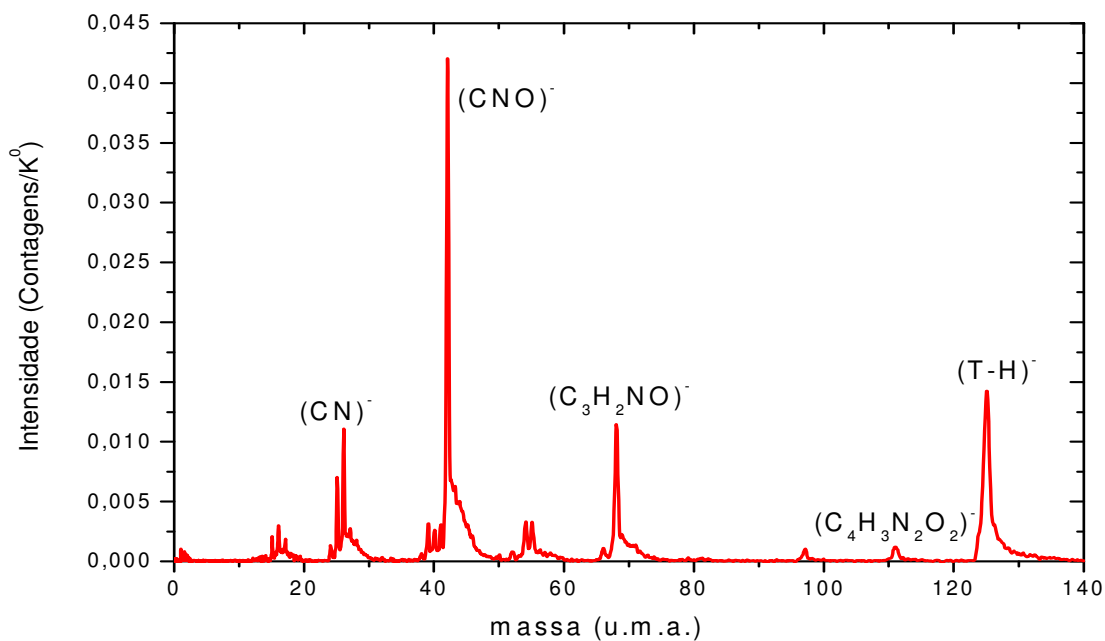
Sendo uma das unidades fundamentais do ADN e sabendo também que electrões de baixa energia têm a capacidade de a degradar, efectuou-se um estudo pormenorizado, à semelhança do realizado para a molécula de nitrometano. Dado que a molécula se encontra disponível comercialmente sob a forma de pó, foi necessário recorrer ao forno de biomoléculas (vd. capítulo 3), depositando o pó no seu interior e aquecendo-o para aumentar a pressão de vapor da molécula. Para este efeito foi tida em conta a temperatura, já que, um aquecimento exagerado pode levar à decomposição térmica da molécula. Recorrendo à literatura, nomeadamente aos estudos de *Huels et al.*<sup>46</sup> e *Denifl et al.*<sup>56</sup>, as temperaturas aconselhadas para a vaporização da molécula de timina são de 400K-450K e 450K-470K respectivamente. Dado que a temperatura de decomposição da timina é de cerca de 600K<sup>46</sup>, foi utilizada uma temperatura de vaporização de 470K, optimizando a aquisição do espectro, isto é, tendo não só uma melhor razão sinal-ruído, como maior estatística em menor tempo. Também a câmara de colisões foi aquecida até cerca de 390 K por duas razões: 1) evitar a condensação da molécula nas suas paredes, podendo provocar também um entupimento da fenda de colimação do feixe de biomoléculas impedindo-o de chegar à zona de colisões; 2) manter a câmara em condições suficientemente estáveis durante um longo período que permita a aquisição de todos os dados necessários ao trabalho.

Após todo o conjunto de melhoramentos realizados no espectrómetro TOF desde o estudo previamente publicado por *Almeida*<sup>22</sup>, verificou-se uma melhoria

clara em termos de resolução em massa do espectrómetro, como pode ser visualizado nas figuras 4.8 e 4.9.

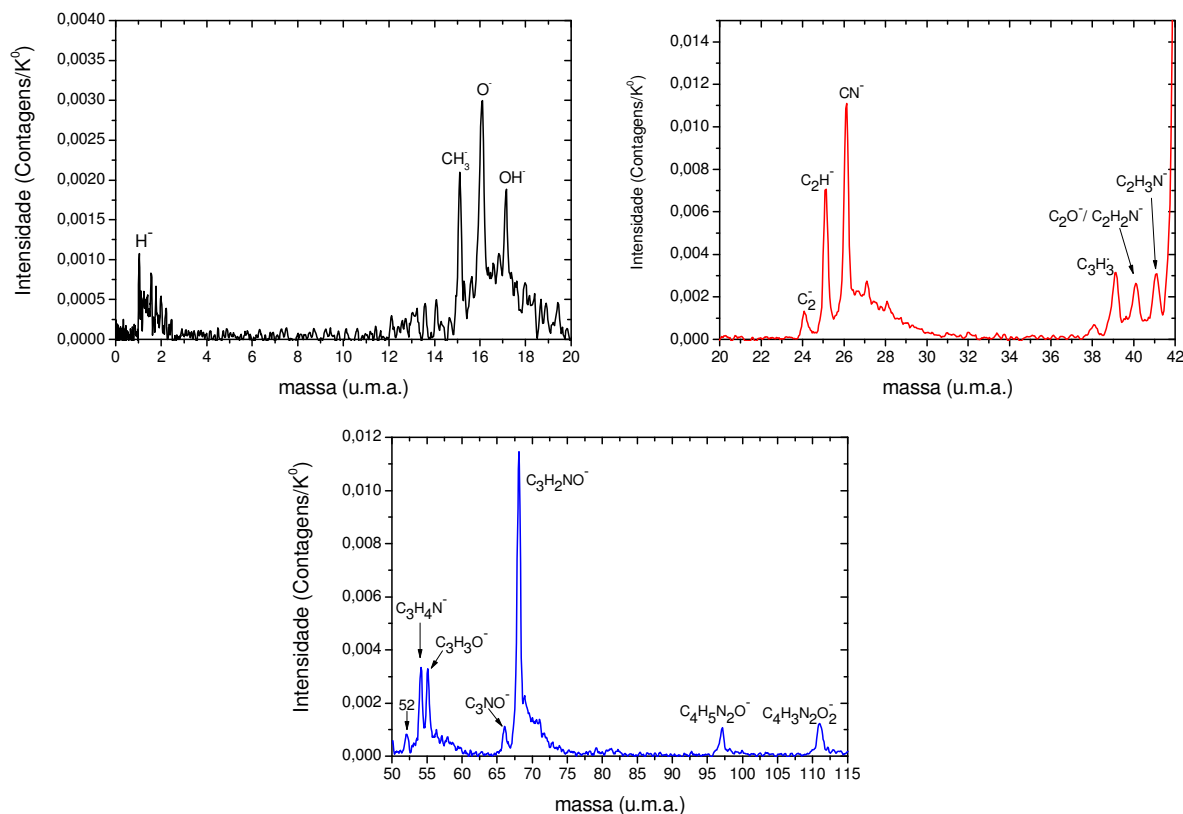


**Figura 4.8 – Espectro típico de timina obtido a uma energia de colisão de 100 eV (adaptado de<sup>22</sup>).**



**Figura 4.9 – Espectro típico de timina obtido com a actual conformação do espectrómetro TOF, para uma energia de colisão de 100 eV.**

Ao comparar as figuras 4.8 e 4.9, verifica-se que foram detectados novos padrões de fragmentação, permitindo realizar uma análise mais fundamentada do processo de TE na molécula de timina. Na figura 4.10 podem observar-se algumas zonas do espectro de timina em maior pormenor.



**Figura 4.10 – Ampliações de zonas de interesse do espectro de timina para uma energia de colisão de 100 eV.**

Como é possível depreender da figura 4.10, existem padrões de fragmentação bastante variados os quais apresentam inclusive, algumas novidades em relação aos restantes estudos previamente realizados, como é possível verificar a partir da tabela 4.4.

**Tabela 4.4 – Tabela de comparativa dos padrões de fragmentação da molécula de timina segundo diversos autores e o estudo actual.**

M (u.m.a)	Fragmento	Electrões Livres		Transferência de Electrão	
		Huels et al. <sup>46</sup>	Denifl et al. <sup>56</sup>	Almeida <sup>22</sup>	Actual
1	(H) <sup>-</sup>	√	-	√	√
14	(CH <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	√	-	-	-
15	(CH <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	-	-	-	√
16	(O) <sup>-</sup>	√	√	√	√

17	(OH) <sup>-</sup>	-	-	-	√
24	(C <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	-	-	-	√
25	(C <sub>2</sub> H) <sup>-</sup>	-	-	-	√
26	(CN) <sup>-</sup>	√	√	√	√
39	(C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	-	-	-	√
40	(C <sub>2</sub> O) <sup>-</sup> / (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N) <sup>-</sup>	-	-	-	√
41	(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N) <sup>-</sup>	-	-	-	√
42	(CNO) <sup>-</sup>	√	√	√	√
43	(CNHO) <sup>-</sup>	√	-	-	-
44	(CNH <sub>2</sub> O) <sup>-</sup>	√	-	-	-
52	?	-	-	-	√
54	(C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N) <sup>-</sup>	-	√	√	√
55	(C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O)?	-	-	-	√
66	(C <sub>3</sub> NO) <sup>-</sup>	-	-	-	√
68	(C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> NO) <sup>-</sup>	-	√	√	√
71	(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O) <sup>-</sup>	-	√	√	-
97	(C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O) <sup>-</sup>	-	√	-	√
111	(C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	-	-	-	√
124	(T-2H) <sup>-</sup>	-	√	√	-
125	(T-H) <sup>-</sup>	-	√	√	√
126	(T) <sup>-</sup>	√	-	-	-

Observando atentamente a tabela 4.4. podem constatar-se algumas diferenças em relação aos restantes autores referenciados. A primeira grande diferença diz respeito à formação do anião-progenitor. Este anião foi apenas detectado por *Huels et al.*<sup>46</sup>, em estudos de CED sendo que, num estudo posterior, *Gohlke et al.*<sup>57</sup> questionaram a detecção deste mesmo fragmento pelo seu grupo. Também *Abouaf et al.*<sup>58</sup>, com uma experiência de CED de electrões de baixa energia contestaram a detecção do anião-progenitor reportando apenas a detecção do anião molecular timina desidrogenado (T-H<sup>-</sup>). Mais recentemente *Deniff et al.*<sup>59</sup> questionaram também a existência deste fragmento alertando inclusive para um possível equívoco na detecção do mesmo, centrada na falta de resolução do aparelho, uma vez que *Huels et al.*<sup>46</sup> tinham usado como gás calibrante o SF<sub>6</sub> (146 u.m.a.) e um dos fragmentos aniónicos detectados deste gás é SF<sub>5</sub><sup>-</sup> (127 u.m.a.). Como a estrutura de ressonâncias para este fragmento é muito similar à atribuída por *Huels et al.*<sup>46</sup> ao ião progenitor negativo (T)<sup>-</sup> (126 u.m.a.) a falta de resolução em massa do dispositivo experimental seria uma justificação válida. Analisando também os valores calculados para as electroafinidades adiabática (EA<sub>adiab</sub>) e vertical (EA<sub>v</sub>) da molécula de timina, constatou-se que existe uma grande

quantidade de estudos realizados para esta molécula<sup>60,61,62,63,64</sup>, oscilando os resultados entre valores ligeiramente positivos ou negativos de EA, dependendo do método de cálculo. Segundo o estudo de *Li et al.*<sup>64</sup>, a  $EA_v(\text{timina}) = -0,3\text{eV}$ , enquanto que segundo *Lyngdoh et al.*<sup>65</sup>, o valor teórico de  $EA_{\text{adiab}}(\text{timina}) = 0,14\text{eV}$ , o que é muito concordante com o valor experimentalmente obtido por *Schiedt et al.*<sup>66</sup>,  $EA_{\text{adiab}}(\text{timina}) = 0,12 \pm 0,12\text{eV}$ . Como é possível deduzir da diferença entre as afinidades electrónicas adiabática e vertical, a timina “relaxa” bastante ao longo dos seus graus de liberdade quando tenta acomodar o electrão extra que neste caso lhe é cedido pelo átomo de potássio. Pode ainda afirmar-se que, tendo em conta estes valores para as electroafinidades, torna-se bastante improvável a formação do anião progenitor, que é o que acaba por se comprovar com a sua não detecção através dos mais diversos estudos deste tipo.

No seguimento da análise dos resultados experimentais pode ainda verificar-se que existem vários padrões de fragmentação, os quais não são observáveis pelos restantes autores referenciados. Numa tentativa de justificar a possível existência destes fragmentos, efectuou-se o cálculo das entalpias de formação gasosas ( $\Delta_f H_g^\circ$ ) para esses mesmos fragmentos tendo em conta a energia das ligações que terão de ser quebradas para a sua formação ( $E_{\text{diss}}$ ) e a sua afinidade electrónica ( $EA_{\text{adiab}}$ ), as quais se encontram listadas na tabela 4.5. No que diz respeito às energias das ligações consideraram-se os valores referenciados por *Vall-Ilosera et al.*<sup>67</sup>.

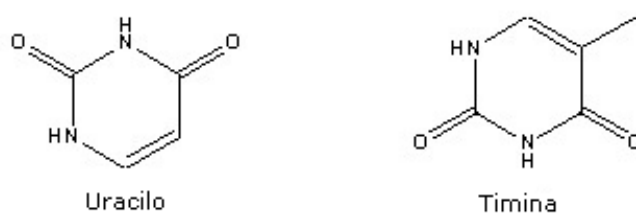
**Tabela 4.5 – Entalpia de formação ( $\Delta_f H_g^\circ$ ) de diversos fragmentos tendo em conta a energia de dissociação das ligações ( $E_{\text{diss}}$ ) e a afinidade electrónica (EA).**

M (u.m.a)	Fragmento	$E_{\text{diss}}$ (eV)	EA (eV)	$\Delta_f H_g^\circ$ (eV)
14	(T-CH <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	8,1	$0,652 \pm 0,006^{53}$	7,448
15	(T-CH <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	3,6	$0,08 \pm 0,03^{54}$	3,52
17	(T-OH) <sup>-</sup>	12,05	$1,827 \pm 4,0 \times 10^{-6}^{68}$	10,223
24	(T-C <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	14,9	$3,269 \pm 0,006^{69}$	11,631
25	(T-C <sub>2</sub> H) <sup>-</sup>	10,4	$2,969 \pm 0,006^{69}$	7,431
39	(T-C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	11,3	$2,718 \pm 0,008^{70}$	8,582

Observando atentamente a tabela 4.5 pode constatar-se que são bastantes os fragmentos que apenas surgem neste estudo. Aliás, tendo em conta a estimativa feita com base em valores da literatura, estes são bastante elevados, encontrando-se inclusivamente na gama de energias para as quais os danos no ADN são

maximizados<sup>1</sup>. Este facto é extremamente relevante para atestar a importância da transferência de electrão nos fenómenos à escala molecular em meio fisiológico.

Após uma leitura bastante atenta da bibliografia relevante para o estudo realizado na base de ADN, timina, surgiram também outros fragmentos que não apareciam nos restantes estudos realizados nomeadamente por captura electrónica dissociativa (CED). Após algumas tentativas de atribuição de fragmentação sem grande sucesso em termos de fiabilidade, recorreu-se à bibliografia disponível para a molécula de uracilo, dada a sua semelhança estrutural com a molécula de timina (diferem apenas na posição 5, sendo que no caso da timina o carbono está ligado a um grupo metilo e no caso do uracilo este está ligado a um átomo de hidrogénio), como é possível constatar a partir da figura 4.11.



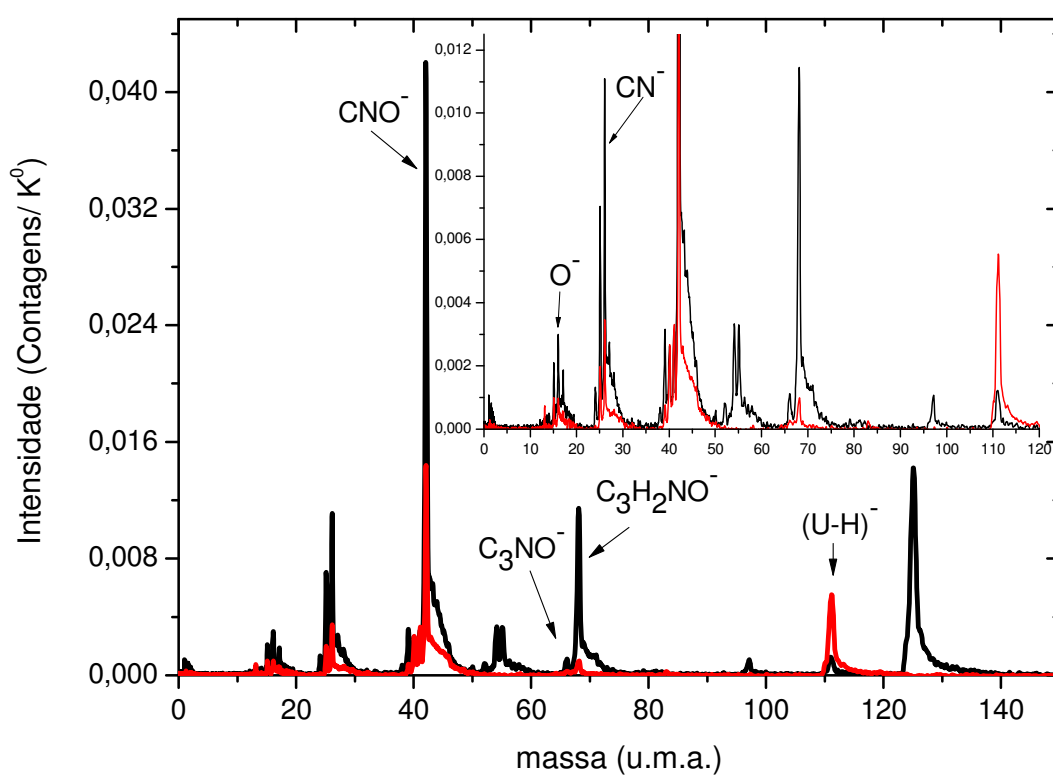
**Figura 4.11 – Esquema representativo da estrutura das moléculas de timina e uracilo.**

Tendo em conta a fragmentação atribuída para a molécula de uracilo por *Denifl et al.*<sup>71</sup>, verificou-se que existiam bastantes fragmentos em comum com a fragmentação obtida para a molécula de timina neste estudo. Assim, na tabela 4.6 encontram-se os fragmentos comuns para as duas moléculas resultantes da comparação entre a fragmentação da timina deste estudo e a fragmentação da molécula estudada pelos autores referenciados anteriormente.

**Tabela 4.6 – Fragmentação em comum entre a molécula de uracilo estudada por *Denifl et al.*<sup>71</sup> e a molécula de timina estudada para esta dissertação.**

M (u.m.a)	Fragmento
16	(CH <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>
26	(CN) <sup>-</sup>
40	(C <sub>2</sub> O) <sup>-</sup> /(C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N) <sup>-</sup>
41	(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N) <sup>-</sup>
42	(CNO) <sup>-</sup>
66	(C <sub>3</sub> NO) <sup>-</sup>
68	(C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> NO) <sup>-</sup>
111	(C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>

Partindo da tabela 4.6 e tendo também em conta a tabela 4.4, pode constatar-se que a fragmentação da molécula de timina e da de uracilo são bastante similares, ao contrário do que referido no estudo de *Denifl et al.*<sup>56</sup> para a molécula de timina. A suportar esta afirmação destaca-se a formação do fragmento de massa 111 u.m.a., que corresponde no uracilo ao anião-progenitor sem um átomo de hidrogénio (U-H), para além dos fragmentos  $(C_2O)^-/(C_2H_2N)^-$  e  $(C_3NO)^-$ , sendo estes também unicamente observados para a molécula de uracilo. Para atestar ainda mais a validade desta comparação é apresentado na figura 4.12 um espectro no qual são sobrepostas a fragmentação da timina e de uracilo medidas por transferência de electrão neste estudo.



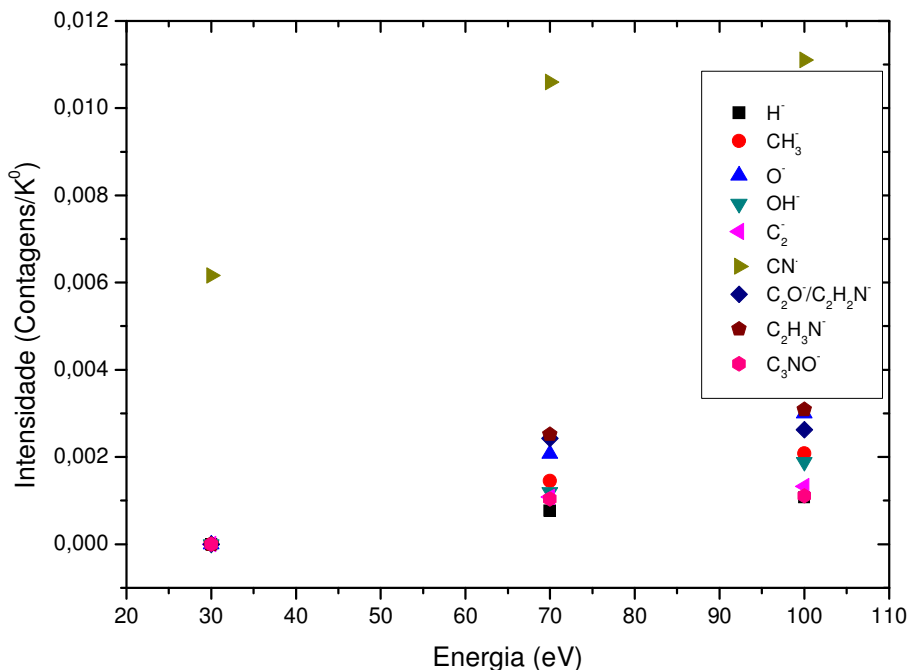
**Figura 4.13 – Espectros de timina (preto) e uracilo (vermelho) sobrepostos, tendo sido ambos obtidos para uma energia de colisão de 100 eV.**

Como é possível verificar a partir da figura 4.13, as fragmentações de ambas as moléculas são bastante similares, facto que não é demasiado inesperado, dada a semelhança estrutural entre timina e uracilo. A discussão relacionada com os padrões de fragmentação da molécula de uracilo não faz parte do intuito desta dissertação tendo sido apenas inserido este espectro para comparar as fragmentações destas duas moléculas. Podem retirar-se ainda algumas informações importantes em relação à relevância dos processos de transferência de electrão em meio biológico, nomeadamente a existência de fragmentos no espectro que, para

os estudos de CED realizados apresentam ressonâncias muito próximas de 10 eV, como é o caso do anião oxigénio ( $O^-$ ), as quais são concordantes com os resultados de *Boudaïffa et al.*<sup>1</sup>, que notou no seu espectro um aumento das quebras de cadeia simples e quebras de cadeia dupla nesta gama de energia. Uma outra forma de tentar perceber melhor qual a relevância da transferência de electrão neste tipo de moléculas é estudar a sua fragmentação para diferentes energias do feixe projectil. Foram realizadas experiências de transferência de electrão para a molécula de timina a três energias de colisão diferentes: 30, 70 e 100 eV. Para melhor visualizar as diferenças de intensidade dos diferentes fragmentos, os resultados encontram-se representados na tabela 4.7 e nos gráficos das figuras 4.14, 4.15 e 4.16.

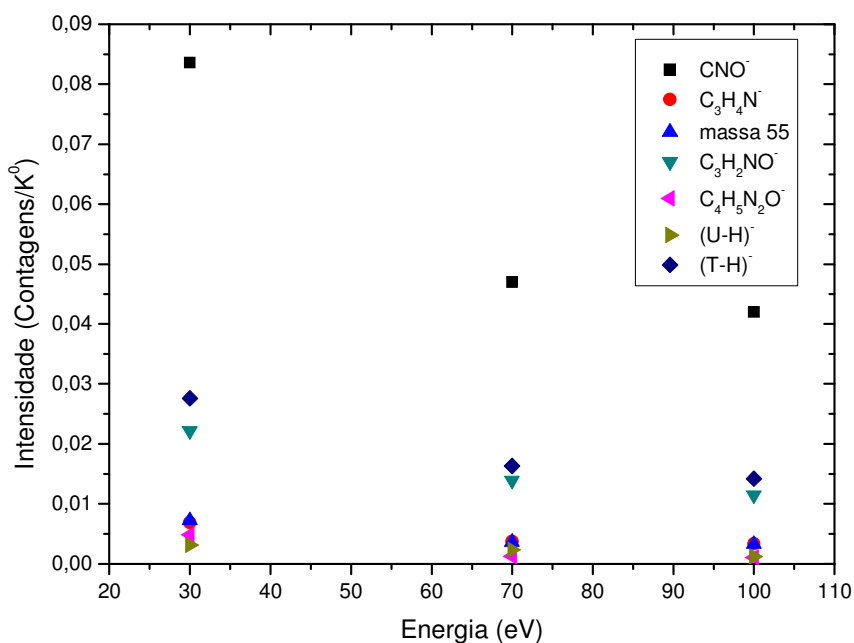
**Tabela 4.7 – Tabela de comparação de fragmentação e intensidade de fragmentação para energias de feixe de 30 eV, 70 eV e 100 eV.**

Massa (u.m.a.)	Fragmento	Intensidade do fragmento (contagens/átomo K <sup>o</sup> )		
		100 eV	70 eV	30 eV
1	(H) <sup>-</sup>	1,073x10 <sup>-3</sup>	7,65x10 <sup>-4</sup>	-
15	(CH <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	2,079x10 <sup>-3</sup>	1,45x10 <sup>-3</sup>	-
16	(O) <sup>-</sup>	3,0x10 <sup>-3</sup>	2,07x10 <sup>-3</sup>	-
17	(OH) <sup>-</sup>	1,88x10 <sup>-3</sup>	1,2x10 <sup>-3</sup>	-
24	(C <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	1,33x10 <sup>-3</sup>	1,08x10 <sup>-3</sup>	-
25	(C <sub>2</sub> H) <sup>-</sup>	7,06x10 <sup>-3</sup>	7,56x10 <sup>-3</sup>	6,47x10 <sup>-3</sup>
26	(CN) <sup>-</sup>	1,11x10 <sup>-2</sup>	1,06x10 <sup>-2</sup>	6,16x10 <sup>-2</sup>
39	(C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	3,15x10 <sup>-3</sup>	3,38x10 <sup>-3</sup>	-
40	(C <sub>2</sub> O) <sup>-</sup> / (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N) <sup>-</sup>	2,63x10 <sup>-3</sup>	2,42x10 <sup>-3</sup>	-
41	(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N) <sup>-</sup>	3,09x10 <sup>-3</sup>	2,52x10 <sup>-3</sup>	-
42	(CNO) <sup>-</sup>	4,2x10 <sup>-2</sup>	4,7x10 <sup>-2</sup>	8,63x10 <sup>-2</sup>
52	?	8,2x10 <sup>-4</sup>	9,62x10 <sup>-4</sup>	-
54	(C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N) <sup>-</sup>	3,34x10 <sup>-3</sup>	3,76x10 <sup>-3</sup>	6,86x10 <sup>-3</sup>
55	(C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O) <sup>-</sup> ?	3,3x10 <sup>-3</sup>	3,63x10 <sup>-3</sup>	7,22x10 <sup>-3</sup>
66	(C <sub>3</sub> NO) <sup>-</sup>	1,11x10 <sup>-3</sup>	1,04x10 <sup>-3</sup>	-
68	(C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> NO) <sup>-</sup>	1,14x10 <sup>-2</sup>	1,39x10 <sup>-2</sup>	2,22x10 <sup>-2</sup>
97	(C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O) <sup>-</sup>	1,07x10 <sup>-3</sup>	1,24x10 <sup>-3</sup>	4,83x10 <sup>-3</sup>
111	(C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>	1,21x10 <sup>-3</sup>	2,3x10 <sup>-3</sup>	3,11x10 <sup>-3</sup>
125	(T-H) <sup>-</sup>	1,42x10 <sup>-2</sup>	1,63x10 <sup>-2</sup>	2,76x10 <sup>-2</sup>



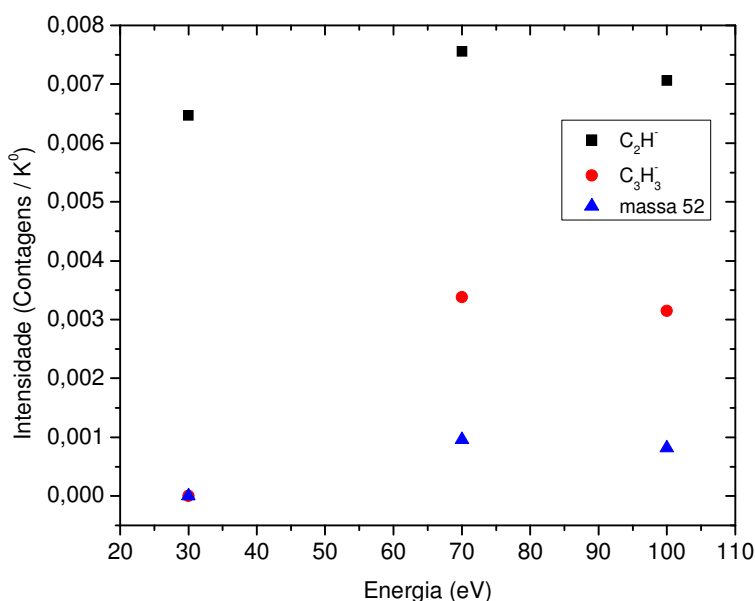
**Figura 4.14 – Representações gráficas da evolução crescente na intensidade de produção de diversos fragmentos em função da energia de colisão.**

Ao observar atentamente a figura 4.14, pode verificar-se que, à medida que se aumenta a energia do feixe projectil, a intensidade dos fragmentos referidos aumenta, tendo em especial atenção que, todos eles correspondem a massas mais pequenas, isto é, a molécula de timina decompõe-se em fragmentos mais pequenos com o aumento de energia do feixe de potássio neutro.



**Figura 4.15 – Gráficos identificativos do comportamento decrescente de alguns fragmentos em função da energia de colisão.**

Em relação à figura 4.15, as intensidades dos fragmentos aí apresentados diminuí com o aumento de energia do feixe atómico, significando que, a menores energias do feixe de potássio a molécula de timina continua a fragmentar-se, contudo, a sua decomposição dá-se em fragmentos “mais pesados”. Uma evidência bastante interessante nestes resultados permite ainda concluir que o anião  $(T-H)^-$  é uma anião precursor do anião  $CNO^-$ , uma vez que a razão entre intensidades dos dois picos se mantém constante para esta gama de energias ( $\approx 0,35$ ), que significa que, cerca de 30% das moléculas de timina que dão origem ao anião  $(T-H)^-$  seguem sob a forma deste anião enquanto que as restantes 70% se fragmentam numa segunda fase originando o anião  $CNO^-$ .



**Figura 4.16 – Representação gráfica da variação das intensidades de alguns fragmentos resultantes da transferência de electrão entre átomos de potássio e moléculas de timina com a variação da energia do feixe projectil.**

Na figura 4.16 encontram-se ainda alguns fragmentos que não apresentam um comportamento tão evidente como os da figura 4.14, contudo a linha de tendência é semelhante, tornando necessário um estudo mais cuidadoso e com diferentes energias do feixe de potássio para comprovar estas linhas de tendência.

Ponderando com alguma atenção os resultados obtidos em função da energia, prova-se efectivamente a importância dos processos de TE, para além das diferenças identificadas em relação aos resultados obtidos por CED. Na verdade, para energias do feixe de potássio mais baixas, o electrão mais externo do átomo de potássio é captado pela molécula de timina com a energia necessária para a fragmentar segundo todos os padrões de fragmentação, contudo, a presença do átomo de potássio durante um maior intervalo temporal na zona de cruzamento

com a molécula de timina permite a sua estabilização, isto é, a re-distribuição da energia do electrão recebido por todos os seus graus de liberdade e, se necessário libertar alguma dessa energia para o átomo de potássio que ainda se encontra nas suas imediações, fazendo com que a molécula possa quebrar, ainda que segundo ligações singulares, mantendo-a praticamente intacta. Para energias superiores do feixe projectil a passagem do átomo de potássio pela molécula é muito mais rápida, permitindo a transferência do electrão para esta, mas não a libertação da energia em excesso fornecida pelo electrão transferido, o que faz com que a molécula quebre em diversos locais formando aniões de massa inferior.

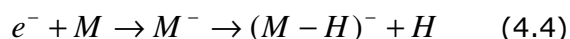
Em suma, o processo de transferência de electrão entre átomos de potássio e moléculas de timina tem como produtos principais os aniões  $(T-H)^-$ , e  $CNO^-$ , enquanto a intensidade dos restantes fragmentos depende fundamentalmente da energia de colisão. Os aniões  $(T-H)^-$  e  $CNO^-$  são sempre os mais intensos independentemente da energia de colisão e as suas intensidades relativas aumentam com a diminuição da energia de colisão, mantendo constante a razão entre as suas intensidades (como referido acima  $\approx 0,35$ ). Este facto pode indicar que a energia dos estados ressonantes que resultam na formação destes dois aniões é de alguma forma similar, como aliás pode ser verificado através de um estudo recente de CED<sup>72</sup> no que diz respeito à ressonância a  $\sim 4$  eV. Então o anião  $CNO^-$  não deve ser formado por captura directa de um electrão mas sim como resultado da decomposição do anião transiente  $[(T-H)^-]^*$ , o que está de acordo com o facto do anião-progenitor desidrogenado ser um produto intermediário para a formação deste anião. Esta interpretação pode na verdade ser ponderada tendo em conta o forte acoplamento entre o estado dipolar ligado e o estado de valência aniónico temporário que está relacionado com a ocupação das orbitais  $\sigma^*$ , as quais podem representar um papel muito significativo em captura electrónica por moléculas de timina.

As orbitais moleculares desocupadas de menor energia (LUMO) para a timina são  $\pi_1^*$ ,  $\pi_2^*$  and  $\pi_3^*$  e encontram-se a 0,29, 1,71, e 3,83 eV<sup>73</sup>. Dado que o limite assintótico do sistema molecular  $(T-H)^-H$  se encontra a 1,4 eV, a ressonância de menor energia não pode dar origem a CED, enquanto que as duas seguintes dão origem à criação do anião  $(T-H)^-$  em experiências de CE<sup>56</sup>. Assim, nos estudos de transferência de electrão por colisões de átomos de potássio com moléculas de timina, podemos afirmar que o electrão só pode ser transferido para as orbitais  $\pi_2^*$  and  $\pi_3^*$ , dando origem a formação de processos dissociativos, que são observados nos espectros de massa de TOF da Fig. 4.9.

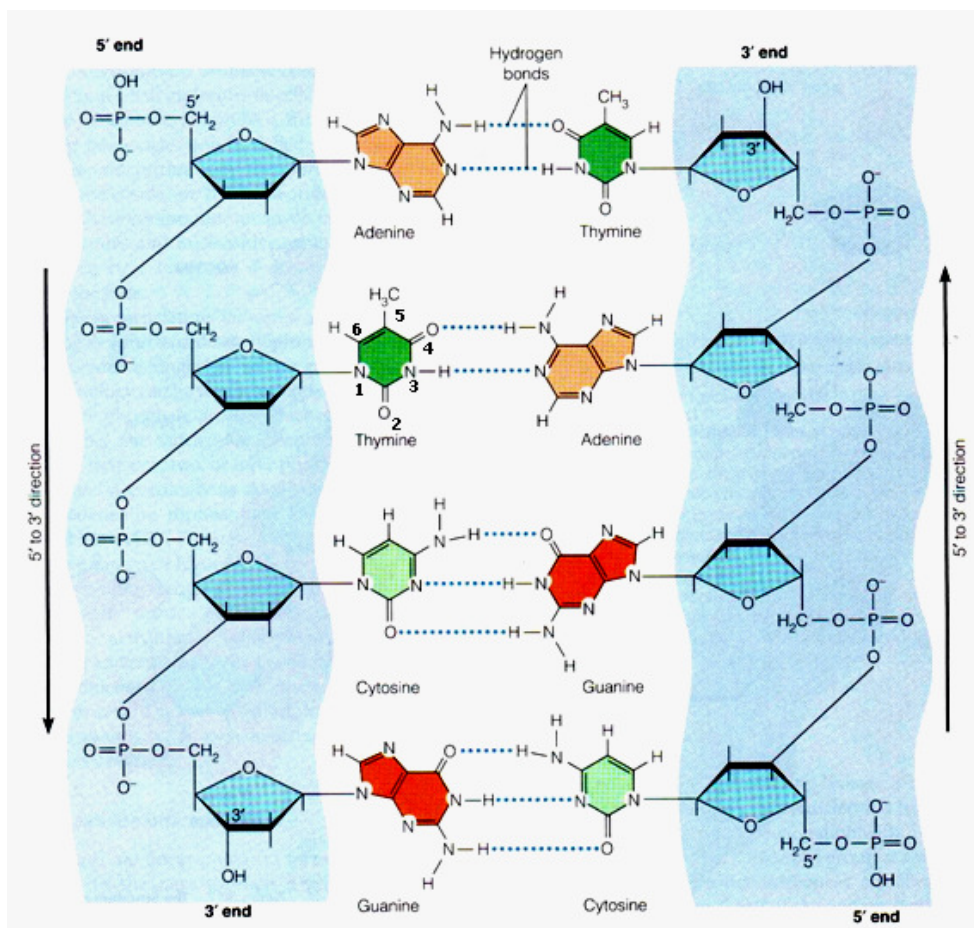
### 4.3. Mecanismo multi-efectivo de produção de degradação no ADN

O estudo da transferência de electrão na base de ADN timina efectuado no âmbito desta dissertação assim como muitos outros estudos de CED com electrões de baixa energia realizados acerca desta e das restantes bases de ADN, têm como objectivo final tentar perceber que fenómenos ocorrem na molécula-mãe (ADN), quando é sujeita à interação de espécies secundárias (electrões, iões, radicais livres) proveniente de radiação de elevada energia.

Como foi referido no capítulo 2 desta dissertação, a capacidade que electrões de baixa energia (<20eV) têm de induzir degradação ao nível do ADN é irrefutável<sup>1</sup>. Estas alterações irreversíveis causadas na dupla-hélice são iniciadas pela formação de estados electrónicos associados a iões temporários negativos – TNI, localizados em várias unidades estruturais da molécula<sup>1,58,71</sup> os quais, ao dissociarem, produzem entre outros fragmentos aniónicos, o anião desidrogenado associado à base (por exemplo para a timina (T-H)<sup>-</sup>). A sua intensidade leva-o a ter um papel muito importante na dissociação das bases, especialmente no que diz respeito à posição da qual o átomo de hidrogénio é “libertado”. Na figura 4.17 encontra-se esquematicamente representado um pequeno troço da dupla cadeia de ADN. Observando mais atentamente a molécula de timina incluída nesse esquema pode constatar-se a numeração das posições associadas a cada grupo substituinte desta base que permitirão indentificar qual a ligação em causa que será referida ao longo do texto. Em relação à libertação de radical neutro hidrogénio, esta dá-se genericamente segundo o seguinte esquema reactivo:



no qual o electrão extra é alojado na molécula numa orbital molecular desocupada, originando posteriormente um radical neutro hidrogénio, enquanto a carga em excesso é “aprisionada” pela base desidrogenada devido à afinidade electrónica deste fragmento, que é positiva (entre 2 e 4 eV dependendo da posição de onde é libertado o hidrogénio). Esta desidrogenação das bases pode ter origem tanto a partir das ligações N-H (ligações 1 e 3 da figura 4.17) como de ligações C-H (identificadas como ligações 5 e 6 da figura 4.17).



**Figura 4.17 – Representação esquemática da dupla hélice do ADN com especial enfoque para o par de bases Timina-Adenina (adaptado de<sup>74</sup>).**

Para tentar perceber de onde provinha o radical hidrogénio foram realizados alguns estudos<sup>6,7,75</sup>, recorrendo a deuterações e metilações de posições específicas para a molécula de timina, através dos quais foram retiradas as seguintes conclusões: 1) A quebra das ligações C-H só é termodinamicamente acessível a partir de 1,6 eV embora não sejam observadas evidências experimentais deste fenómeno até 3 eV; 2) A partir de 1,4 eV é visível a perda de hidrogénio proveniente das posições 1 e 3 associadas às ligações do tipo N-H. Estes resultados dão indicação da selectividade em relação ao tipo de ligação que é quebrada ou também denominada de "*site selective loss of H*", no entanto um outro tipo de estudos pormenorizados também foi realizado, visando a indentificação de qual seria a ligação quebrada para dar origem ao radical H<sup>6,7,71,76</sup>. Neste caso pretendeu-se provar a selectividade do processo em relação à ligação quebrada, tendo sido concluído que: 1) Para a posição 1 da molécula de timina a quebra da ligação N-H se dá a energias abaixo de 1,4 eV; 2) a partir de 1,4 eV se pode dar a quebra das ligações 1 e 3 (ambas do tipo N-H) para a molécula de timina; 3) que no caso da formação do anião H<sup>-</sup> (o que pressupõe a formação do radical neutro

(M-H)), a sua ablação das ligações N-H se dá abaixo dos 7 eV. No entanto, devido ao facto do átomo N na posição 1 se encontrar ligado ao açúcar, assim como o átomo de H (que se encontra ligado ao átomo N na posição 3) ser participante da ponte de hidrogénio estabelecida entre as duas bases complementares faz com que se altere consideravelmente a energia das ligações provocando um aumento da sua estabilidade. Tal faz com que a detecção deste fragmento aniónico seja desviada para energias mais elevadas podendo transformá-las em intervenientes nas quebras duplas e simples da cadeia de ADN; 4) Numa comparação efectuada entre os resultados obtidos para a formação de  $H^-$  em fase gasosa com a formação de quebras simples e duplas do ADN, verifica-se que há uma correlação entre os resultados, especialmente para a gama de energias em que a produção de  $H^-$  se deve à quebra das ligações C-H. Este facto sugere que a remoção de hidrogénio dos átomos de carbono possa representar um passo inicial na criação de quebras no ADN.

Para além de todas as conclusões relatadas anteriormente, o estudo de *Ptasinska et al.*<sup>6</sup> refere ainda que, à custa da metilação da posição 1 da timina, a não-deteccção do anião  $CH_3^-$  pode ter consequências significativas na descrição molecular das quebras na cadeia de ADN através de electrões de muito baixa energia. Os autores pressupõem que um electrão capturado por uma base de ADN será transferido internamente pela molécula para a ligação C-O que associa o açúcar ao grupo fosfato. Contudo, tendo em conta os resultados do estudo, a assumption não tinha fundamento. Então, para electrões de muito baixa energia (sub-excitation energy electrons <3eV) a ressonância detectada a 1,2 eV dever-se-ia a um excesso de carga localizada no açúcar, como foi comprovado por um estudo de CED para a unidade orgânica timidina<sup>77</sup> (base timina associada ao açúcar), causado pela libertação de dois átomos de hidrogénio do açúcar, facto que poderia levar posteriormente à quebra da ligação glicosídica  $N_1-C$  (ligação que une a base ao açúcar), sendo a dissociação da ligação  $N_3-H$  detectada através de uma ressonância localizada a 1,8 eV. Por sua vez, a quebra directa da ligação  $N_1-C$  foi detectada a energias superiores a 5,5 eV devido a um excesso de carga na base (timina). Os três mecanismos de reacção referidos (quebra directa ou indirecta da ligação glicosídica  $N_1-C$  e quebra da ligação  $N_3-H$ ) podem então ser considerados como os três eventos primários para produção de quebras ao nível do ADN. Enquanto a quebra da ligação  $N_3-H$  dá origem a um radical H extremamente reactivo, os dois mecanismos associados à quebra da ligação  $N_1-H$  podem ser responsáveis pela excisão da base timina da dupla cadeia do ADN.

Em relação ao caso mais particular da experiência actual, todos estes factores têm de ser tidos em conta, especialmente por existir alguma similaridade

entre os processos de CED e TE. A grande ressalva aos estudos de CED centra-se porém, no facto de em meio biológico não existirem electrões livres, exceptuando o caso muito próprio dos electrões pré-solvatados (vd. capítulo 2). Comparando os resultados actuais com os de CED, verifica-se que a transferência de electrão permite aceder ao canal dissociativo que dá origem ao anião  $(T-H)^-$ , uma vez que se trata de um dos mais intensos nos testes feitos com a molécula de timina. Então o modelo sugerido para a degradação do ADN com base na transferência de electrão centra-se numa associação de dois tipos de processos. Em primeiro lugar, ao estudar atentamente a fragmentação da molécula de timina verifica-se a formação de inúmeros fragmentos. Deste leque há a salientar um conjunto de fragmentos que pode ter um papel fundamental na indução de dano no ADN: os aniões  $O^-$  e  $OH^-$ . A sua detecção por TE indica uma enorme possibilidade de que estejam associados à produção de quebras de cadeias simples e duplas no ADN. Segundo *Denifl et al.*<sup>56</sup>, no seu estudo realizado através de CED, apenas se começa a detectar a formação do fragmento  $O^-$  a partir de 8 eV, e recorrendo à tabela 4.5, o valor estimado para a entalpia de formação do fragmento  $OH^-$  situa-se a aproximadamente 10 eV, sabendo-se ainda que estes valores são provavelmente deslocados para energias superiores, tal como para o caso da formação do anião  $H^-$  descrita nos estudos de *Ptasinska et al.*<sup>76</sup> acima referidos. Esta assumpção é verdadeiramente concordante com a descoberta inovadora de *Boudaïffa et al.*<sup>1</sup>, que constataram um aumento de quebras simples e duplas para energias de electrões próximas de 10 eV. A presença destes dois aniões ( $O^-$  e  $OH^-$ ) sugere que uma das ligações C=O da molécula de timina é quebrada (posições 2 ou 5). Assumindo que um dos canais de reacção acessíveis por transferência de electrão para a libertação de um radical hidrogénio (e conseqüente formação do anião  $(T-H)^-$ ) provém da quebra da ligação N<sub>3</sub>-H (uma vez que em CED a ressonância correspondente à quebra desta ligação é detectável a partir de 1,4 eV) e juntando a esse facto a quebra da ligação 4, cria-se uma zona onde se encontram quebradas as pontes de hidrogénio entre ambas as bases (timina e adenina), desestabilizando a dupla cadeia do ADN. Já o anião  $OH^-$  pode resultar inclusivamente num rearranjo do anião  $O^-$  com o radical H aquando da quebra das ligações 3 e 4 da molécula de timina. A dissociação das ligações inter-nucleobases (pontes de hidrogénio) proposta no âmbito deste trabalho, em conjunto com a decomposição da ligação glicosídica entre a base timina e o açúcar correspondente<sup>76</sup>, pode provocar a excisão da base timina, criando uma quebra de cadeia simples. Contudo, há ainda a considerar um segundo efeito: os radicais livres. Os radicais livres são átomos ou moléculas extremamente reactivas e que são produzidas a partir da interacção de radiação de elevada energia com as moléculas de água. É este o caso do radical livre hidróxilo

(OH<sup>\*</sup>), que, como é sabido<sup>26</sup>, é um radical altamente móvel e reactivo tipicamente proveniente da interacção entre iões H<sub>2</sub>O<sup>+</sup> e moléculas de água, H<sub>2</sub>O (vd. Capítulo 2). Segundo o estudo de *Ward et al.*<sup>26</sup>, os danos provocados no ADN tanto por ionização directa (acção da radiação primária) como por acção de radicais livres são distribuídos aleatoriamente entre as bases e os açúcares da dupla-cadeia. Este autor afirma ainda que a conformação do ADN não é importante no ataque dos radicais, já que num estudo sobre a produção de quebras simples com radicais hidróxilo em ADN na conformação Z (conformação esta que expõe mais a dupla-hélice formada pelas bases), não foi verificada uma variação relevante em termos de quebras simples, aumentando ainda mais as certezas em termos da aleatoriedade da interacção dos radicais livres no ADN. A acção destes radicais nos açúcares é, contudo, mais efectiva do que nas bases, dado que a maioria dos danos provocam quebras simples na cadeia, o que acaba por complementar as interacções descritas através do processo de transferência de electrão e ainda de captura electrónica dissociativa. Em relação ainda aos radicais livres, estes podem não ter a capacidade de provocar danos irreversíveis, nomeadamente quebras de dupla cadeia, que causem mutações não reparáveis ou até morte celular. Contudo, em associação aos efeitos produzidos pelos electrões de baixas energias transferidos em meio biológico e, dada capacidade de induzir danos pela parte de electrões pré-solvatados<sup>5</sup>, gera-se um modelo multi-efectivo que cria danos irreversíveis em organismos vivos (nomeadamente o ser humano), o qual é responsável pelo aparecimento de múltiplas anomalias que conduzem ao cancro.

#### 4.4. Notas finais

Neste capítulo começou por se explicar qual o tipo de calibração em massa realizado para o espectrómetro de massa do tipo tempo de voo construído no LCAM/CEFITEC, conseguindo-se um ajuste a uma curva de calibração que garante grande fiabilidade em termos da distinção das massas a atribuir. Foram mostradas evidências irrefutáveis no que diz respeito à identificação de novos padrões de fragmentação para a molécula de nitrometano que permitem melhorar os resultados já publicados<sup>41</sup>. A salientar este facto destaca-se a identificação do fragmento OH<sup>-</sup> até então atribuído a uma isomerização do anião O<sup>-</sup>, inequivocamente determinado à custa da deuteração de molécula de nitrometano. A molécula de timina apresentou também resultados bastante relevantes do ponto de vista de fragmentação podendo destacar-se a não-identificação do anião-progenitor, facto que seria esperado dadas as características da molécula (vd. sub-capítulo 4.2). As assinaturas espectrométricas desta molécula permitem estabelecer também comparações com as da molécula de uracilo, o que seria de

esperar dadas as semelhanças estruturais (diferem apenas num grupo substituinte) entre timina e uracilo. Foi ainda realizado um estudo fazendo variar a energia do feixe projectil, o qual permite tirar ilações acerca da dependência energética das quebras na molécula, verificando-se ainda que o anião (T-H)<sup>-</sup> (125 u.m.a.) é um anião precursor do anião CNO<sup>-</sup>. Com o auxílio destes resultados e tendo em conta toda a literatura existente para este tipo de fenómenos de interacção do ADN à escala molecular foi ainda elaborado um possível modelo de degradação do ADN.

## Capítulo 5. Conclusões e trabalho futuro

### 5.1. Conclusões

Os objectivos deste trabalho consistem no estudo dos processos de transferência de electrão em bases isoladas de ADN. O estudo da base de ADN Timina ( $C_5H_6N_2O_2$ ) foi realizado com recurso a uma técnica de feixes moleculares cruzados. Em primeiro lugar, e dado que o dispositivo experimental utilizado foi completamente projectado e implementado no Laboratório de Colisões Atómicas e Moleculares (LCAM) da linha 2 do CEFITEC, foi necessário calibrar o espectrómetro de massa do tipo tempo de voo para que fosse possível realizar uma identificação inequívoca das assinaturas aniónicas provenientes da molécula de timina quando sujeita à interacção com um feixe de potássio neutro acelerado. Para tal foi utilizada a molécula de nitrometano, amplamente conhecida na literatura (vd. Capítulo 4.1.), para a qual foram identificados novos fragmentos aniónicos até então desconhecidos. No que diz respeito ao nitrometano, foram identificados 6 fragmentos aniónicos mais intensos, de entre os quais o anião  $OH^-$  que até então se pensava ser produto de uma isomerização do TNI e que corresponderia ao um fragmento  $O^-$  ligeiramente "atrasado" no tempo. A distinção inequívoca destes dois fragmentos deve-se à deuteração total da molécula de nitrometano ( $CD_3NO_2$ ), à custa da qual se conseguiu ainda visualizar um afastamento entre o anião-progenitor ( $CD_3NO_2^-$ ) e o anião-progenitor sem um átomo de deutério ( $CD_2NO_2^-$ ), para além da identificação da produção do anião  $D^-$ .

Após a análise da molécula de nitrometano, procedeu-se então à aquisição e tratamento de dados espectrométricos para a molécula de timina. O estudo desta molécula revelou-se verdadeiramente significativo para estabelecer algumas diferenças em relação a um estudo anteriormente realizado com esta técnica e os muitos estudos deste tipo de moléculas realizados por CED de electrões livres. Em termos de assinaturas aniónicas, conseguiram identificar-se um grande leque de fragmentos para os quais se retiraram algumas conclusões. Através de uma estimativa em termos das entalpias de formação de alguns aniões até então não detectados, notou-se que os seus valores se revelaram bastante condizentes com a gama de valores para a qual a produção de danos ao nível do ADN é verdadeiramente mais significativa. Foi ainda provada a não-existência do anião progenitor negativo nas assinaturas aniónicas que também já tinha sido anteriormente provado à custa da electronegatividade da molécula. Esta mesma conclusão também já tinha sido provada por CED anteriormente. Os dados

experimentais permitiram ainda concluir que a molécula de timina tem na realidade bastantes assinaturas aniónicas semelhantes à molécula de uracilo, ao contrário do afirmado por algumas experiências já realizadas por CED. Tal revela-se perfeitamente aceitável dada a semelhança estrutural entre as moléculas de uracilo e timina. Por fim foi ainda realizado um estudo que visava a determinação do comportamento em termos de intensidade das assinaturas aniónicas em função da energia do feixe projectil. Foi verificada a dependência em termos de energia para massas mais "leves", para as quais a sua intensidade aumentava com o aumento de energia, enquanto para as massas mais "pesadas" se verificava um comportamento inverso. Tal foi explicado tendo em conta o intervalo temporal que o átomo de potássio passaria junto da molécula (maior para menores energias), que lhe permitiria actuar como um receptor de energia em excesso proveniente da molécula, isto é, enquanto o átomo de potássio estava junto da molécula em estudo esta re-distribuiria o excesso de energia por todos os seus graus de liberdade enquanto a interacção entre as nuvens electrónicas do átomo e da molécula permitiam a libertação de um excesso de energia. Para energias mais elevadas seria precisamente o contrário, dado que o facto do tempo de colisão ser bastante curto (da ordem dos femto-segundos), tempo este muito superior ao tempo característico dos modos de vibração da molécula, faria com que o electrão do átomo de potássio fosse capturado pela molécula de timina não tendo esta tempo de "relaxar", o que a faria quebrar em fragmentos aniónicos de massas mais reduzidas.

Por fim e à custa dos novos dados fornecidos pelos padrões de fragmentação da molécula de timina, assim como de anteriores estudos de CED foi elaborado um possível modelo multi-efectivo de degradação do ADN. Este modelo assenta fundamentalmente na selectividade da molécula de timina não só em termos de tipo de ligação-"bond selective"-(N-H versus C-H) como também na posição de ligação-"site-selective"-(posição 1 ou 3), para as quais foram determinadas energias de dissociação muito próprias. Como se trata de um modelo multi-efectivo foi ainda tido em conta o papel dos radicais livres provenientes sobretudo da radiólise da molécula de água. O seu carácter pouco efectivo isoladamente, para além da pouca especificidade no que diz respeito à unidade funcional do ADN com a qual interactua (base, açúcar ou grupo fosfato) torna-os num "perfeito aliado" dos electrões de baixa energia na degradação do ADN.

## 5.2. Trabalho futuro

Do ponto de vista de trabalho futuro existem imensas hipóteses a seguir, tendo muitas elas especial interesse tanto do ponto de vista mais físico como de um ponto de vista totalmente biológico. Numa fase imediatamente a seguir a este estudo é fundamental realizar um estudo pormenorizado no que diz respeito à determinação das características de selectividade de tipo de ligação e da posição de ligação para a molécula de timina recorrendo a deutações e/ou metilações em ligações específicas desta molécula. Outra fonte de estudo interessante é também o estudo das restantes bases isoladas com a posterior introdução de outras unidades orgânicas da dupla cadeia do ADN, nomeadamente a desoxirribose (açúcar) e o grupo fosfato.

O estudo de moléculas radiosensibilizadoras é também ele uma área de grande interesse para comunidade científica. Os radiosensibilizadores são moléculas que potenciam grandemente o efeito de radiação, e a sua administração num paciente em fase de tratamento radioterapêutico diminui drasticamente o número de tratamentos a realizar minimizando as doses de radiação a que este é exposto, obtendo contudo efeitos semelhantes a um tratamento dito de regular.

Em termos biológicos seria também de extrema relevância o estudo de bases de ADN em agregados moleculares de água. A introdução destes agregados permitirá "simular" mais fidedignamente o ambiente intra-celular (já que cada célula é composta por cerca de 70% de água), e ter uma maior certeza quanto papel da água em contacto com electrões de baixa energia, verificando ou não a presença de radicais livres, e qual a sua capacidade de induzir dano na molécula ADN.

Em termos mais físicos, a instalação de um analisador de energia permite tirar mais conclusões no que diz respeito à energia de formação de cada um dos aniões formados podendo posteriormente relacioná-los também com a produção de lesões ao nível do ADN.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup>**Boudaïffa, B.; Cloutier, P.; Hunting, D.; Huels, M. A.; Sanche, L.;** *Science*, **287**, 1658, (2000).
- <sup>2</sup>**Limão-Vieira, P.;** Comunicação privada, *Cellular environment approach at the molecular level: synchrotron radiation studies*, Rio de Janeiro, (2007).
- <sup>3</sup>**von Sonntag, C.;** *The Chemical Basis for Radiation Biology*, Taylor and Francis, London, (1987).
- <sup>4</sup>**Huels, M.A.; Boudaïffa, B.; Cloutier, P.; Hunting, D.; Sanche, L.;** *J Am Chem Soc*, **125**, 4467, (2003).
- <sup>5</sup>**Wang, C. R.; Nguyen, J.; Lu, Q. B.;** *J Am Chem Soc*, **131**, 11320, (2009).
- <sup>6</sup>**Ptasinska, S.; Denifl, S.; Scheier, P.; Illenberger, E.; Märk, T.;** *Angew Chem Int Ed*, **44**, 6941, (2005).
- <sup>7</sup>**Ptasinska, S.; Denifl, S.; Grill, V.; Märk, T. D.; Illenberger, E.; Scheier, P.;** *Phys Rev Lett*, **95**, 93201, (2005).
- <sup>8</sup>**Kleyn, A. W.; Los, J.; Gislason, E. A.;** *Phys Rep*, **90**, 1, (1982).
- <sup>9</sup>**Kleyn, A. W.; Moutinho, A. M. C.;** *J Phys B*, **34**, R1, (2001).
- <sup>10</sup>**Limão-Vieira, P.; Moutinho, A. M. C.; Los, J.;** *J Chem Phys*, **124**, 54306, (2006).
- <sup>11</sup>**Ward, J. F.;** *Advances in Radiation Biology 5*, Academic Press, New York, (1977).
- <sup>12</sup>**Yamamoto, O.;** *Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology*, **Smith, K. (ed)**, Plenum, New York, (1976).
- <sup>13</sup>**Fuciarelli, A. F.; Zimbrick, J. D. (eds);** *Radiation Damage in DNA: Structure/Function Relationships at Early Times*, Batelle, Columbus, (1995).
- <sup>14</sup>**Sanche, L.;** *Eur Phys Journal D*, **35**, 367, (2005).

- 
- <sup>15</sup>**Cai, Z.; Cloutier, P.; Hunting D.; Sanche, L.;** *J Phys Chem B*, **109**, 4796, (2005).
- <sup>16</sup>**Illenberger, E.; Momigny, J.;** *Gaseous Molecular Ions: An Introduction to Elementary Processes Induced by Ionization*, Springer, New York, (1992).
- <sup>17</sup>**Sanche, L.;** *Radiation Induced Phenomena in Nucleic Acids*, 531-575, Springer, (2008).
- <sup>18</sup>**Zamenhof, S.; DeGiovanni, R.; Greer, S.;** *Nature*, **181**, 827, (1958).
- <sup>19</sup>**Szybalski, W.;** *Cancer Chemotherapy Reports*, **58**, 539, (1974).
- <sup>20</sup>**Abdul-Carime, H.; Huels, M. A.; Brüning, F.; Illenberger, E.; Sanche, L.;** *J Chem Phys*, **113**, 7, 2517-2521, (2000).
- <sup>21</sup>**Kelly, R. L.;** *J Phys Chem Ref Data*, **16**, suppl 1, (1987).
- <sup>22</sup>**Almeida, D.;** *Transferência de electrão em bases de ADN: Espectrómetro de massa tipo tempo de voo*, Msc Thesis, FCT-UNL, Lisboa, (2007).
- <sup>23</sup>**Folkard, M.; Prise, K. M.; Vojnovic, B.; Davies, S.; Roper, M. J.; Michael, B. D.;** *Int J Radiat Biol*, **64**, 6, 651, (1993).
- <sup>24</sup>**Lennert, S.;** *Biomolecular Action of Ionizing Radiation*, Cap.6, Taylor & Francis, New York, (2008).
- <sup>25</sup>**Lennert, S.;** *Biomolecular Action of Ionizing Radiation*, Cap.2, Taylor & Francis, New York, (2008).
- <sup>26</sup>**Ward, J. F.;** *Prog Nucleic Acids Res*, **35**, 95, (1988).
- <sup>27</sup>**deLara, C. M.; Jenner, T. J.; Townsend, K. M. S.; Marsden, S. J.; O'Neill, P.;** *Radiat Res*, **144**, 43, (1995).
- <sup>28</sup>**Ito, T.; Baker, S. C.; Stickley, C. D.; Peak, J. G.; Peak, M. J.;** *Int J Radiat Biol*, **63**, 289, (1993).

- <sup>29</sup>**Migus, A.; Gauduel, Y.; Martin, K. L.; Antonetti, A.;** *Phys Rev Lett*, **58**, 1559, (1987).
- <sup>30</sup>**Sanche, L.;** *Nature*, **461**, 358, (2009).
- <sup>31</sup>**Moutinho, A. M. C.; Silva, M. E. F.; Cunha, M. A.;** *Tecnologia de vácuo*, UNL, (1980).
- <sup>32</sup>**Smythe, W. R.; Mattauch, J.;** *J Phys Rev*, **40**, 429, (1932).
- <sup>33</sup>**Wiley, W. C.; McLaren, I. H.;** *Rev Sci Instr*, **26**, 1150, (1955).
- <sup>34</sup>**Karataev, V. I.; Mamyrin, B. A.; Shmikk, D. V.;** *Sov Phy Tech Phys*, **16**, 1177, (1972).
- <sup>35</sup>**Opsal, R. B.; Owens, K. G.; Reilly, J. P.;** *Anal Chem*, **57**, 1884, (1985).
- <sup>36</sup>**Marable, N. L.; Sanzone, G.;** *Int J Mass Spectrom Ion Phys*, **13**, 185, (1974).
- <sup>37</sup>**Bowder, J. A.; Miller, R. L.; Thomas, W. A.; Sanzone, G.;** *Int J Mass Spectrom Ion Phys*, **37**, 99, (1981).
- <sup>38</sup>**Poschenrieder, W. P.;** *Int J Mass Spectrom Ion Phys*, **6**, 413, (1971).
- <sup>39</sup>**Poschenrieder, W. P.;** *Int J Mass Spectrom Ion Phys*, **9**, 357, (1972).
- <sup>40</sup>**Müller, E. W.; Krishnaswamy, S. V.;** *Rev Sci Instrum*, **45**, 1053, (1974).
- <sup>41</sup>**Lobo, R. F. M.; Moutinho, A. M. C.; Lacmann, K.; Los, J.;** *J Chem Phys*, **95**, 166, (1991).
- <sup>42</sup>**Di Domenico, A.; Franklin, J. L.;** *Int J Mass Spectrom Ion Phys*, **9**, 171, (1972).
- <sup>43</sup>**Walker, I. C.; Fluendy, M. A. D.;** *Int J Mass Spect*, **205**, 171, (2001).
- <sup>44</sup>**Sailer, W.; Pelc, A.; Matejcik, S.; Illenberger, E.; Scheier, P.; Märk, T. D.;** *J Chem Phys*, **117**, 7989, (2002).

- <sup>45</sup>Alizadeh, E., Ferreira da Silva, F., Zappa, F., Mauracher, A., Probst, M., Denifl, S., Bacher, A., Märk, T. D., Limão-Vieira, P., Scheier, P.; *Int J Mass Spect*, **271**, 12, (2008).
- <sup>46</sup>Huels, M. A.; Hahndorf, I.; Illenberger, E.; Sanche, L.; *J Chem Phys*, **108**, 4, (1998).
- <sup>47</sup>Modelli, A.; Venuti, M.; *Int J Mass Spect*, **205**, 7, (2001).
- <sup>48</sup>Fluendy, M. A. D.; Lunt, S.; *Mol Phys*, **49**, 5, 1007, (1983).
- <sup>49</sup>Stockdale, J. A.; Davis, F. J.; Compton, R. N.; Klots, C. E.; *J Chem Phys*, **60**, 4279, (1973).
- <sup>50</sup>Compton, R. N.; Carman Jr., H. S.; Desfrancois, C.; Abdul-Carime, H.; Schermann, J. P.; Hendricks, J. H.; Lyapustina, S. A.; Bowen, K. H.; *J Chem Phys*, **105**, 3472, (1996).
- <sup>51</sup>Ptasinska, S.; Denifl, S.; Mróz, B.; Probst, M.; Grill, V.; Illenberger, E.; Scheier, P.; Märk, T. D.; *J Chem Phys*, **123**, 124302, (2003).
- <sup>52</sup>Kasdan, A.; Herbst, E.; Lineberger, W. C.; *Chem Phys Lett*, **31**, 1, 78, (1975).
- <sup>53</sup>Leopold, D. G.; Murray, K. K.; Miller, A. E. S.; Lineberger, W. C.; *J Chem Phys*, **83**, 4849, (1985).
- <sup>54</sup>Ellison, G. B.; Engelking, P. C.; Lineberger, W. C.; *J Am Chem Soc*, **100**, 2556, (1978).
- <sup>55</sup>Ervin, K. M.; Ho, J.; Lineberger, W. C.; *J Phys Chem*, **92**, 5405, (1988).
- <sup>56</sup>Denifl, S., Ptasinska, S., Probst, M., Hrusak, J., Scheier, P., Märk, T. D.; *J Chem Phys A*, **108**, 6562, (2004).
- <sup>57</sup>Gohlke, S.; Illenberger, E.; *Europhys News*, **33**, 207, (2002).
- <sup>58</sup>Abouaf, R.; Pommier, J.; Dunet, H.; *Int J Mass Spect*, **226**, 397, (2003).

- <sup>59</sup>Denifl, S.; Ptasinska, S.; Hanel, G.; Gstir, B.; Scheier, P.; Probst, M.; Farizon, B.; Farizon, M.; Matejcik, S.; Illenberger, E.; Märk, T. D.; *Physica Scripta*, **T110**, 252, (2004).
- <sup>60</sup>Wetmore, S. D.; Boyd, R. J.; Eriksson, L. A.; *Chem Phys Lett*, **322**, 129, (2000).
- <sup>61</sup>Russo, N.; Toscano, M.; Grand, A.; *J Comput Chem*, **21**, 1243, (2001).
- <sup>62</sup>Becke, A. D.; *J Chem Phys*, **98**, 13762, (1993).
- <sup>63</sup>Wesolowski, S. S.; Leininger, M. L.; Pentchev, P. N.; Schaefer III, H. F.; *J Am Chem Soc*, **123**, 4023, (2001).
- <sup>64</sup>Li, X.; Cai, Z.; Sevilla, M. D.; *J Phys Chem A*, **106**, 9345, (2002).
- <sup>65</sup>Lyngdoh, R. H. D.; Schaefer III, H. F.; *Acc Chem Res*, **42**, 4, 563, (2009).
- <sup>66</sup>Schiedt, J.; Weinkauff, R.; Neumark, D. M.; Schlag, E. W.; *Chem Phys*, **239**, 511, (1998).
- <sup>67</sup>Vall-Ilosera, G.; Coreno, M.; Erman, P.; Huels, M. A.; Jakubowska, K.; Kivimäki, A.; Rachlew, E.; Stankiewicz, M.; *Int J Mass Spect*, **275**, 55, (2008).
- <sup>68</sup>Smith, J. R.; Kim, J. B.; Lineberger, W. C.; *Phys Rev A*, **55**, 2036, (1997).
- <sup>69</sup>Ervin, K. M.; Lineberger, W. C.; *J Am Chem Soc*, **95**, 1167, (1991).
- <sup>70</sup>Robinson, M. S.; Polak, M. L.; Bierbaum, V. M.; DePuy, C. H.; Lineberger, W. C.; *J Am Chem Soc*, **117**, 6766, (1995).
- <sup>71</sup>Denifl, S.; Ptasinska, S.; Hanel, G.; Gstir, B.; Probst, M.; Scheier, P.; Märk, T.D.; *J Chem Phys*, **120**, 14, 6557, (2004).
- <sup>72</sup>Edtbauer, A., Denifl, S., Ferreira da Silva, F., Sulzer, P., Ptasinska, S., Märk, T. D., Nunes, Y., Limao-Vieira, P., Scheier, P.; *Phys Chem Chem Phys*, (2010), submetido.

<sup>73</sup>**Scheer, A., Aflatooni, K., Gallup, G. A., Burrow, P. D.;** *Phys Rev Lett*, **92**, 068102, (2004).

<sup>74</sup>**Becker, W. M.; Kleinsmith, L. J.; Hardin, J.;** *The world of the cell*, 5<sup>th</sup> Edition, Benjamin Cummings, (2003).

<sup>75</sup>**Abdoul-Carime, H.; Gohlke, S.; Illenberger, E.;** *Phys Rev Lett*, **92**, 16, 168103, (2004).

<sup>76</sup>**Ptasinska, S.; Denifl, S.; Grill, V.; Märk, T. D.; Scheier, P.; Gohlke, S.; Huels, M. A.; Illenberger, E.;** *Angew Chem Int Ed*, **44**, 1647, (2005).

<sup>77</sup>**Ptasinska, S.; Denifl, S.; Gohlke, S.; Scheier, P.; Illenberger, E.; Märk, T. D.;** *Angew Chem Int Ed*, **45**, 1893, (2006).

