

## Contenido

Introducción.....	2
Cristales.....	2
Celda unitaria.....	3
Índices de Miller.....	4
Simetría de Cristales.....	5
Elementos de simetría.....	6
Clases y sistemas cristalinos.....	7
Proyección estereográfica.....	9
Métodos de cristalización de proteínas.....	11
Método de cristalización en “batch”.....	12
Método de siembra.....	12
Métodos de nucleación trascendente y local.....	13
Métodos por difusión de calor.....	13
Métodos de diálisis.....	13
Difracción de rayos X.....	14
Ecuación de Laue.....	15
Ecuación de Bragg.....	16
La red recíproca y la esfera de Ewald.....	18
Generadores de Rayos X.....	20
Generadores en tubo.....	20
Generadores de ánodo rotatorio.....	20
Sincrotrón.....	22
Métodos de difracción de rayos X.....	23
Método de Laue.....	23
Transmisión.....	23
Reflexión.....	23
Método del cristal giratorio.....	24
Método de Weissenberg.....	24
Método de precesión.....	25
Método del polvo cristalino.....	27
Goniometría de cuatro círculos.....	29
Geometría Euleriana.....	29
Geometría kappa.....	29
Detectores.....	30
Fotomultiplicadores.....	30
Charge Coupled Device.....	30
Image plate Scanner.....	32
Determinación de las posiciones atómicas por DRX.....	32
Problema de las fases.....	33
Transformada de Fourier.....	33
Refinamiento.....	33
Base de datos estructurales de proteínas: PDB.....	34
Programas de visualización molecular.....	36
Referencias.....	39

## 1. Introducción

Las proteínas son moléculas que juegan un papel esencial en el funcionamiento de los seres vivos. Algunas de ellas tienen un papel estructural o bien están involucradas en el funcionamiento de los procesos vitales. La función que realizan las proteínas en el organismo es conocida en bastantes casos pero no se sabe cuál es el mecanismo que utilizan para funcionar de forma tan precisa y específica. A pesar de los avances en los factores que determinan la estabilidad de la estructura nativa de las proteínas, aún no es posible predecir la estructura tridimensional a partir de la secuencia primaria de aminoácidos de manera general y más aún su función de manera universal y sin ambigüedad. A partir del desarrollo de las técnicas de la biología molecular, que permiten obtener la secuencia de los genes, la posibilidad de obtener la secuencia primaria de proteínas de manera automatizada y el desarrollo de las técnicas biofísicas para obtener la estructura tridimensional de proteínas, actualmente se cuenta con un acervo de casi 31,000 coordenadas de diferentes estructuras de proteínas resueltas a nivel atómico (<http://www.rcsb.org/pdb/>), lo que ha intensificado y diversificado los estudios acerca de las relaciones entre la estructura y la función de las proteínas.

Para entender el funcionamiento, tenemos que conocer su estructura molecular. Desgraciadamente, llegar a conocer la estructura de una proteína no es trivial. Lo más fácil sería disponer de un potentísimo microscopio que nos permitiera ver la forma que tiene la molécula y la posición de todos y cada uno de los átomos que la forman. Pero desafortunadamente no disponemos de ese microscopio. La técnica actual más eficaz para descubrir la estructura molecular de cualquier compuesto es la difracción de rayos X sobre cristales, un método un tanto complicado, desarrollado durante el siglo XX a tal grado que en 1962 se otorgó el premio Nobel de Química a Max Perutz y John Kendrew por haber obtenido la primera estructura. Esta técnica consiste en hacer interferir un haz de rayos X con una agrupación ordenada de moléculas idénticas de proteína, es decir con lo que se denomina un cristal de proteína. Si se consigue cristalizar una proteína, conocer su estructura es cuestión de meses, de ahí la importancia de la cristalización de proteínas.

Cristalografía es la ciencia de cristales. Esto concierne forma externa, forma interna, crecimiento y propiedades físicas de cristales. La palabra “cristal” proviene del griego *krustallas* y significa “solidificado por enfriamiento”. Los griegos pensaban que el cuarzo era formado a través de la transformación del hielo por enfriamiento.

Originalmente, la cristalografía era puramente descriptiva y fue considerada como una rama de la mineralogía. Posteriormente se dieron cuenta que el estado cristalino no es limitado solo a las sales minerales y que es más bien un estado muy común de la materia. Hacia mediados del siglo XIX la cristalografía llegó a ser una ciencia por derechos propios.

Por un largo tiempo se ha pensado que la apariencia externa de un cristal refleja algún orden interno regular de materia. Las primeras referencias de esto se encuentran en el trabajo de Johannes Kepler (1619), Robert Hooke (1665) y Christian Huyghens (1690). Estudiando la birrefringencia de la calcita, Huyghens sugirió que sus propiedades ópticas podrían ser explicadas por las reglas que gobiernan el arreglo interno dentro del cristal.

La primera ley cuantitativa de cristalografía (ley de los ángulos constantes) fue prevista en 1669 por Nils Steensen de las mediciones realizadas de los ángulos entre las

caras de un cristal de cuarzo. La ley fue formalmente expresada en 1772 por Jean Baptiste Romé de l'Isle en su "*Essai de Cristallographie*".

La segunda ley (ley de índices racionales o simple truncación) fue establecida en 1774 por Abbé René-Just Haüy. Él se dio cuenta que cuando un cristal de calcita se rompía, las piezas obtenidas tenían formas idénticas a las del cristal original. Asumió que los cristales estaban hechos de paralelepípedos idénticos que él llamó "moléculas integrantes". Esta proposición lleva al hecho de que la posición en el espacio de cada cara de un cristal puede ser descrita por tres números enteros. Las ideas de Haüy fueron refinadas por W. H. Miller, quien introdujo los métodos de geometría analítica en la cristalografía y quien además propuso el sistema de notación que actualmente se usa.

La contribución de Auguste Bravais a la cristalografía es particularmente importante. En su trabajo de 1849 "*The Lattice Structure of Crystals*" estableció el postulado que ha sido la base de la cristalografía, el postulado de Bravais: "Dado un punto P en un cristal, existen un número infinito de puntos discretos, sin límite en las tres direcciones del espacio, alrededor de los cuales el arreglo de la materia es el mismo que alrededor del punto P".

De este postulado se desprende la noción de un cristal tridimensional entrelazado y todas las consideraciones simétricas involucradas. A la par del trabajo teórico los ingenieros desarrollaban los instrumentos de medición cristalográfica. El primer goniómetro fue elaborado en 1782 por Carangeot.

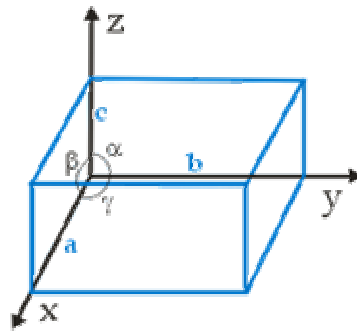
En los inicios del siglo XX, la cristalografía era puramente axiomática. Los primeros experimentos de difracción de rayos X fueron realizados en 1912 por W. Friederich y P. Knipping, siguiendo las ideas de M. von Laue. El trabajo de L. Bragg confirmaron la precisión del postulado de Bravais. Las medidas de difracción daban pruebas experimentales directas del arreglo regular dentro del cristal.

## **2. Cristales**

Se describen como materiales cristalinos aquellos materiales sólidos cuyos elementos constitutivos (átomos, iones o moléculas) se repiten de manera ordenada y paralela y cuya distribución en el espacio muestra ciertas relaciones de simetría. Así, la propiedad característica del medio cristalino es ser periódico, es decir, que a lo largo de cualquier dirección la materia que lo forma se halla a distancias específicas y paralelamente orientada. Por tanto, el cristal está formado por la repetición monótona de agrupaciones atómicas paralelas entre sí y a distancias repetitivas específicas formando una red cristalina. En esta red existe una porción del espacio cristalino, denominado celda unitaria.

### **2.1 Celda unitaria**

En una red cristalina existen siempre tres traslaciones no coplanarias que tienen las dimensiones mínimas entre todas las traslaciones posibles de la red: son las traslaciones fundamentales o constantes reticulares cuyas dimensiones son submicroscópicas. La porción del espacio cristalino limitado por estas traslaciones constituye la celda fundamental del cristal.

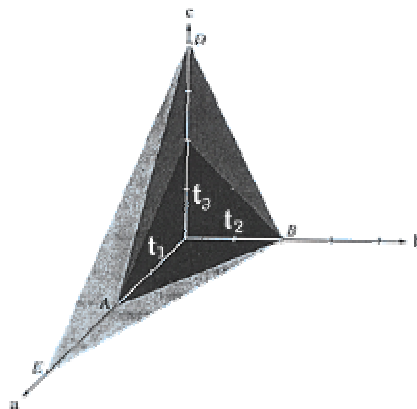


Representación de una celda unitaria de un cristal en la que se muestran las traslaciones (x, y, z) y ángulos

Aunque se utiliza habitualmente el término **“forma”** para designar el aspecto externo de un cristal, lo apropiado es designar la forma externa (generalmente mal formada y defectuosa) con la palabra **“hábito”** y utilizar **forma** como un grupo ideal de superficies externas planas y uniformes, **“caras”**, cristalinas todas las cuales tienen la misma relación con los elementos de simetría y exhiben las mismas posibilidades físicas y químicas. De esta manera, las caras se agrupan según conjuntos equivalentes por simetría; y estos conjuntos se denominan formas cristalinas y se simbolizan por  $\{hkl\}$ . La denominación de las caras cristalinas se realiza mediante los **Índices de Miller**.

## 2.2 Índices de Miller

Un plano reticular queda definido por dos filas reticulares conjugadas. Todo plano reticular puede definirse por sus intersecciones (Ha, Kb, Lc) con los tres ejes fundamentales del cristal. Las dimensiones de estas intersecciones (HKL), medidas desde un punto tomado como origen son los parámetros del plano reticular correspondiente. La denominación habitual de un plano reticular son los índices de Miller y se obtienen calculando las intersecciones (H, K, L), o número de traslaciones, con los tres ejes fundamentales del cristal. Posteriormente se invierten y se eliminan denominadores, o bien, se calculan los cocientes entre el producto de las tres intersecciones dividido entre cada una de las intersecciones: ( $H \cdot K \cdot L = N$ ,  $N/H = h$ ,  $N/K = k$ ,  $N/L = l$ ). Por ejemplo:



1.- Deducir las intersecciones de cada plano con los ejes cristalográficos a, b y c. Es decir, contar el número de traslaciones  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$  que ocupa el plano sobre los ejes a, b y c:

El plano ABD ocupa:  $2t_1$  en el eje a,  $2t_2$  en el eje b, y  $4t_3$  en el eje c

El plano EBD ocupa:  $4t_1$  en el eje a,  $2t_2$  en el eje b, y  $4t_3$  en el eje c

2.- Para calcular los índices de Miller de cada plano, a partir de estas intersecciones, se invierten los valores y, si es necesario, se reducen las fracciones

El plano ABD corta a los ejes en 2, 2 y 4.

Su inversión es:  $1/2$ ,  $1/2$ ,  $1/4$ .

Reducimos fracciones, quitando denominadores:  $2/4$ ,  $2/4$ ,  $1/4$ . Sin denominadores queda 221

**Índices de Miller: (221)**

El plano EBD corta a los ejes en 4, 2 y 4.

Su inversión es:  $1/4$ ,  $1/2$ ,  $1/4$ .

Reducimos fracciones, quitando denominadores:  $1/4$ ,  $2/4$ ,  $1/4$ . sin denominadores queda 121

**Índices de Miller: (121)**

\* Este símbolo entre paréntesis (hkl) nombra el plano dado, mientras que entre corchetes {hkl} indica todos los planos homólogos que resultan de aplicar los elementos de simetría del cristal al plano (hkl).

La simetría a la que pertenecen los cristales a veces puede ser identificada mediante la observación de su morfología externa, esto es un procedimiento muy simple ya que, cristales que crecen con forma de cubos pertenecen obviamente al sistema cúbico: la simetría externa del cristal y el orden interno (celda unitaria) son idénticos. Sin embargo, puede ser que un cristal perteneciente al sistema cúbico no crezca bajo la forma externa de un cubo. La experiencia ha demostrado que sólo muy ocasionalmente los cristales crecen con la misma forma que su celda unitaria. Las diferentes formas o hábitos que adoptan los cristales dependerán de determinados factores químicos y físicos. Pero, ¿cómo reconocer a qué sistema cristalino pertenece un cristal aunque su hábito sea diferente, y a veces incluso llegue a encubrir la forma de la celda unitaria?

Si el cristal, bajo circunstancias favorables de crecimiento, ha desarrollado caras de acuerdo a su orden interno, la solución está en situarlo en una de las clases cristalinas definidas. Los cristales de la misma **clase cristalina** no tienen la misma **forma cristalina** pero sí tienen una determinada simetría en común. Para conocer estas clases cristalinas es necesario comprender la simetría que afecta al orden interno de los cristales, y por ende, a la simetría de los cristales.

## 2.3 Simetría de cristales

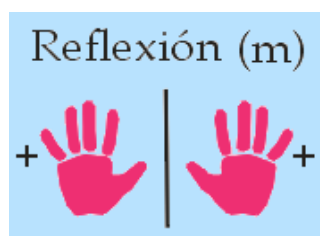
Entendiendo por simetría aquella transformación que al aplicarse a un objeto hace que éste conserve todas sus dimensiones, y lo deje en una posición indistinguible de su posición original, la operación de simetría más sencilla que existe, por definición, en el medio cristalino, es la simple traslación entre un motivo y otro.

Como sabemos, el lugar geométrico que ayuda a la visualización de la simetría de una distribución ordenada recibe el nombre de elemento de simetría. Las relaciones angulares entre las caras de un cristal no quedan afectadas por la simetría de traslación ya que originan desplazamientos tan pequeños que no pueden observarse morfológicamente. La porción mínima del espacio cristalino que contiene en sí misma toda la simetría de la red cristalina es la celda unitaria. El medio cristalino, por ser periódico, es un medio simétrico, y todas sus propiedades derivan de este hecho.

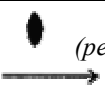



### 2.3.1 Elementos de simetría

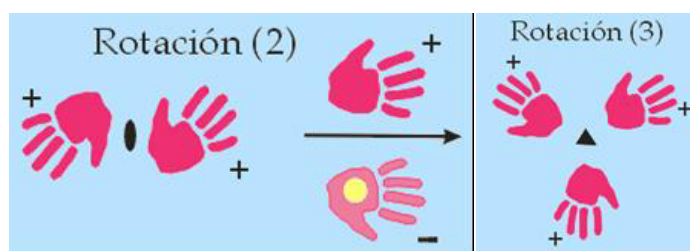
Los elementos de simetría puntual, sin traslación, son el **plano de simetría**, el **eje de rotación** y el **centro de simetría** o centro de inversión.

El **plano de simetría (m)** o de reflexión, refleja partes, o todos, idénticos del objeto a través de un plano, ambos lados del plano aparecen idénticas caras cristalinas.



El **eje de rotación** origina una rotación al objeto de  $360^\circ/n$  alrededor del eje (de derecha a izquierda), en el que la cara cristalina se repite un número determinado de veces según el orden del eje.

Eje de simetría	Símbolo	Giro al eje
eje monario		$n=1$ ( $360^\circ/1=360^\circ$ )
eje binario	 <i>(perpendicular al plano)</i> <i>(paralelo al plano)</i>	$n=2$ ( $360^\circ/2=180^\circ$ )
eje ternario		$n=3$ ( $360^\circ/3=120^\circ$ )
eje cuaternario		$n=4$ ( $360^\circ/4=90^\circ$ )
eje senario		$n=6$ ( $360^\circ/6=60^\circ$ )



Las combinaciones de ambos elementos de simetría originan los **ejes de rotación impropios**:

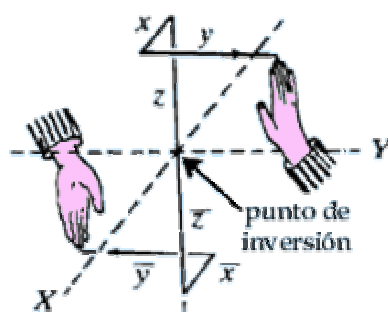
- **eje de rotorreflexión**, rotación de  $360^\circ/n$  seguida por reflexión en un plano perpendicular al eje.

- **eje de rotoinversión**, rotación de  $360^\circ/n$  seguida por inversión a través de un punto en el eje.

orden 1  orden 3  orden 4  orden 6 

\* **Nota:** Los ejes de rotoinversión se representan por el orden del eje (2, 3, 4 o 6) con el símbolo negativo encima de ellos.

Por su parte el **centro de simetría (i)** o centro de inversión, es un elemento de simetría puntual que **invierte** el objeto a través de una línea recta.



## 2.3.2 Clases y sistemas cristalinos

Los elementos de simetría sin traslación se combinan de treinta y dos maneras distintas y dan lugar a las 32 clases cristalinas o grupos puntuales existentes.

Símbolo	Combinación de simetría	Elementos de simetría
1	Clases con un sólo elemento de simetría	Eje monario (giro de $360^\circ$ )
2		Eje binario (giro de $180^\circ$ )
3		Eje ternario (giro de $120^\circ$ )
4		Eje cuaternario (giro de $90^\circ$ )
6		Eje senario (giro de $60^\circ$ )
$\bar{1}$		Eje monario de inversión (giro de $360^\circ$ +inversión) = centro de inversión ( $\bar{2}=i$ )
$\bar{2}$		Eje binario de inversión (giro de $180^\circ$ +inversión) = plano de simetría ( $\bar{2}=m$ )
$\bar{3}$		Eje ternario de inversión (giro de $120^\circ$ +inversión)
$\bar{4}$		Eje cuaternario de inversión (giro de $90^\circ$ +inversión)
$\bar{6}$		Eje senario de inversión (giro de $60^\circ$ +inversión) = eje ternario + plano de simetría perpendicular ( $\bar{6}=3/m$ )

222	Clases con combinación de ejes	Tres ejes binarios en planos perpendiculares entre sí
32		Un eje ternario + tres ejes binarios en planos perpendiculares
422		Un eje cuaternario + dos ejes binarios en planos perpendiculares
622		Un eje senario + dos series de tres ejes binarios a 120° (plano perpendicular al senario)
23		Cuatro ejes ternarios + Tres ejes binarios
432		Tres ejes cuaternarios + cuatro ejes ternarios + seis ejes binarios
2/m	Clases con un eje de orden par + un centro de simetría	Eje binario + plano de simetría perpendicular a él
4/m		Eje cuaternario + plano de simetría perpendicular a él
6/m	(Eje de orden par + centro de simetría=plano de simetría perpendicular al eje)	Eje senario + plano de simetría perpendicular a él
2mm	Clases con un eje + un plano de simetría que contenga al eje	Eje binario + dos planos de simetría que se cortan en él
3m		Eje ternario + tres planos de simetría que se cortan en él
4mm		Eje cuaternario + cuatro planos de simetría que se cortan en él
6mm		Eje senario + seis planos de simetría que se cortan en él
$\bar{4}2m$	Clases con un eje + dos ejes impropios	Eje cuaternario de inversión + dos ejes binarios + dos planos de simetría
$\bar{4}3m$		Tres ejes cuaternarios de inversión + cuatro ejes ternarios + seis planos de simetría
$\bar{6}2m$		Eje senario de inversión (=eje ternario + plano de simetría perpendicular) + tres ejes binarios + tres planos de simetría
2/m2/m2/m (mmm)	Clases con tres ejes + un centro de simetría	Tres ejes binarios + tres planos de simetría perpendiculares
$\bar{3}2/m$ ( $\bar{3}m$ )		Un eje ternario + tres ejes binarios + tres planos de simetría perpendiculares + un centro de simetría
4/m2/m2/m (4/mmm)		Un eje cuaternario + un plano de simetría perpendicular + cuatro ejes binarios + cuatro planos de simetría perpendiculares + centro de simetría
6/m2/m2/m (6/mmm)		Un eje senario + un plano de simetría perpendicular + seis ejes binarios + seis planos de simetría perpendiculares + un centro de simetría
2/m $\bar{3}$ (m3)		Cuatro ejes ternarios + tres ejes binarios + tres planos de simetría perpendiculares + un centro de simetría
4/m $\bar{3}2/m$ (m3m)		Tres ejes cuaternarios + tres planos de simetría perpendiculares + cuatro ejes ternarios + seis ejes binarios + seis planos de simetría perpendiculares + un centro de simetría

Estas treinta y dos clases cristalinas se agrupan en siete sistemas cristalinos. Las constantes reticulares y la mínima simetría que caracteriza a cada grupo de redes o sistema cristalino es la siguiente:



**Sistema triclinico:** No posee ninguna simetría mínima. ( $a \neq b \neq c$      $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$ )

**Sistema monoclinico:** Presenta como simetría mínima un eje de rotación binario o un eje de inversión binario. ( $a \neq b \neq c$      $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta > 90^\circ$ )

**Sistema ortorrómbico:** Como mínimo posee tres ejes binarios perpendiculares entre sí. ( $a \neq b \neq c$      $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ )

**Sistema tetragonal:** Posee como característica fundamental un eje de rotación cuaternario o un eje de inversión cuaternario. ( $a = b \neq c$      $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ )

**Sistema hexagonal:** Su característica fundamental es la presencia de un eje de rotación senario o un eje de inversión senario (eje ternario + plano de simetría perpendicular). ( $a = b \neq c$      $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$ )

Para mayor precisión, generalmente se introduce un cuarto eje **i**, coplanario con **a** y **b**, que forma un ángulo de  $120^\circ$  con cada uno de ellos, así la cruz axial será. ( $a = b = i \neq c$      $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$ )

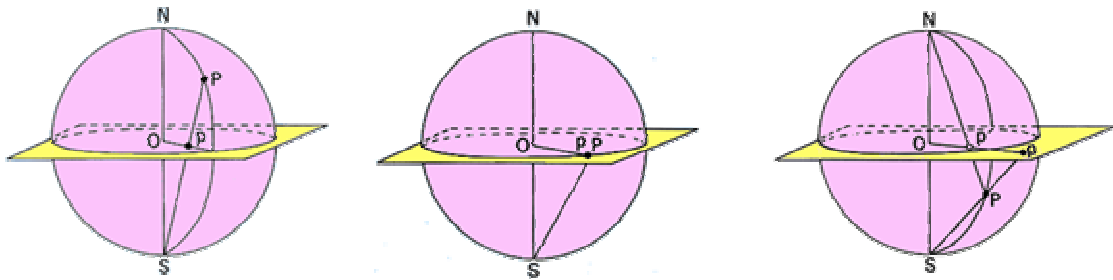
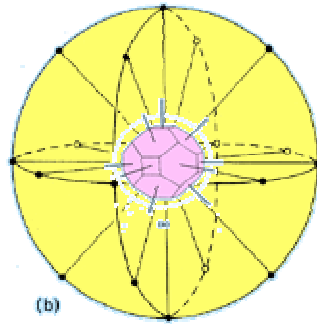
**\*Índices de Miller hexagonales:** Como se trabaja con un cuarto índice los planos hexagonales se van a representar por cuatro índices (hkil). El valor de i se determina como  $h+k$ .

**Sistema romboédrico o trigonal:** Su característica común es la presencia de un eje de rotación ternario o un eje de inversión ternario (eje ternario + centro de simetría) ( $a = b = c$      $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$ )

**Sistema cúbico:** Posee como característica fundamental cuatro ejes de rotación ternarios inclinados a  $109,47^\circ$ . ( $a = b = c$      $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ )

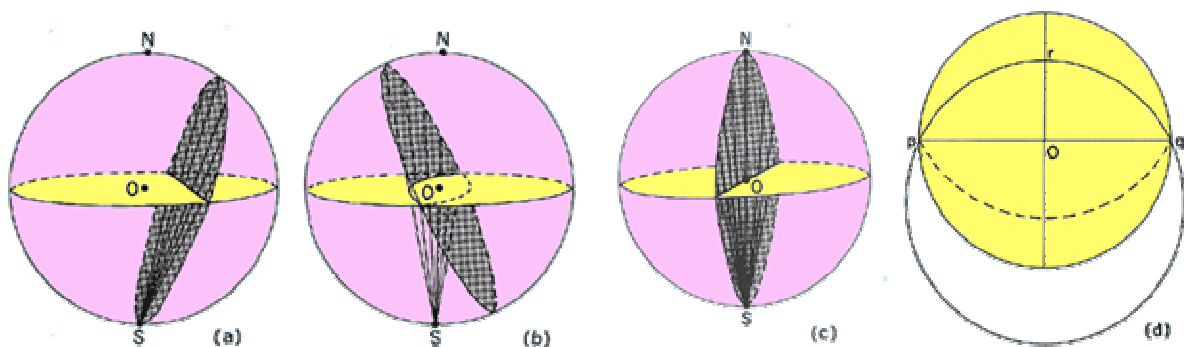
## 2.4 Proyección estereográfica

La aplicación más común de la proyección estereográfica en cristalografía es que permite representar los ángulos entre las caras del cristal y las relaciones de simetría entre ellas. En ésta, cada punto (polo) es el resultado de la proyección esférica de cada una de las caras cristalinas a través de los radios de la esfera, suponiendo el cristal incluido en el centro de una esfera, y de la unión de estos puntos de proyección esférica con el polo N, si se encuentran en el hemisferio sur, y en el polo S si se encuentran en el hemisferio norte, obteniéndose de ello un punto de corte con el plano ecuatorial que es el polo proyección de la cara.

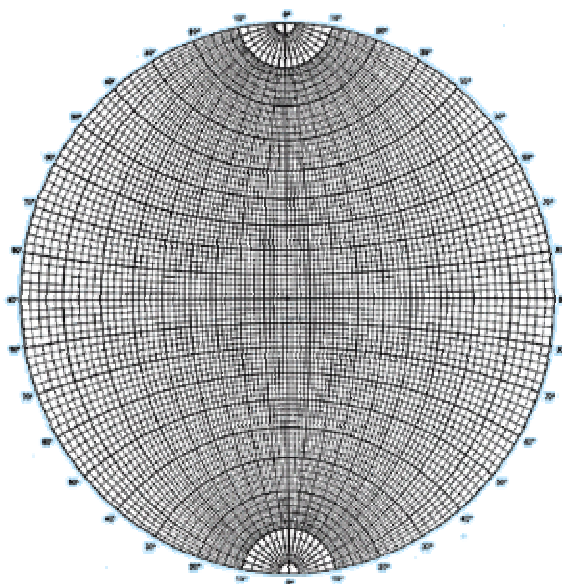


Si el cristal se imagina dentro de una esfera centrada sobre un punto arbitrario dentro del cristal, y cada cara se representa como un punto de corte con el plano ecuatorial, originado por la proyección a un polo desde la normal a la cara que corta a la esfera, los puntos de intersección son enteramente independientes del tamaño relativo, y la simetría que relaciona dichos puntos revela la verdadera simetría del cristal. En una proyección se pueden hacer los siguientes trazos:

- (a) Cualquier círculo que pase a través del polo sur se proyecta como una línea recta ya que las líneas que unen cada punto del círculo con el polo de proyección son coplanares.
- (b) Todos los círculos que son coplanares con el centro de la esfera de proyección se proyectan como **círculos mayores** e intersectan el círculo primitivo en los bordes finales del diámetro.
- (c) Si el círculo pasa a través del polo sur, se proyectará como un diámetro de la superficie ecuatorial ya que el círculo es coplanar con su proyección.
- (d) Se llama **círculo menor** a la proyección de todos los planos que no pasen por el centro de la esfera. Su proyección estereográfica produce un número de pequeños arcos circulares que gradúan los círculos mayores o máximos al cruzarlos.



Con los diámetros y los círculos mayores y menores queda construida la red estereográfica o *plantilla de Wulf* en honor al cristalógrafo ruso que la publicó en 1902. En ella existen proyecciones estereográficas de un conjunto de círculos mayores inclinados a intervalos de  $2^\circ$  y un conjunto de círculos menores, dibujados con el mismo diámetro del círculo primitivo y espaciados a intervalos de  $2^\circ$ . Los planos de los círculos menores son normales al plano ecuatorial y a los planos de los círculos mayores.



El ángulo entre dos caras de un cristal es el ángulo entre sus normales y es equivalente a la distancia angular (medida a través de un círculo mayor de la plantilla de Wulf) entre sus polos. Una proyección estereográfica completa, de un conjunto de puntos, se denomina *estereograma*.

### 3. Métodos de cristalización de proteínas

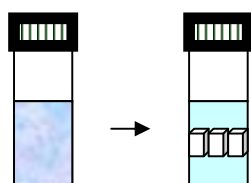
Las proteínas son capaces de formar cristales bajo condiciones fisicoquímicas favorables pero su empaquetamiento deja muchos huecos que se rellenan con agua no ordenada y de ahí su extrema inestabilidad. La cristalización de una proteína se lleva a cabo en dos etapas, en la primera aparece un agregado de proteínas prenuclear que eventualmente alcanza un tamaño crítico nuclear estable y posteriormente sucede el crecimiento del cristal por adición de moléculas al núcleo. Ambos, la nucleación del cristal y el crecimiento ocurre en soluciones supersaturadas donde la concentración de proteínas excede su valor de solubilidad en equilibrio, por tanto los parámetros de solubilidad de una proteína (fuerza iónica, pH, temperatura y presencia de otras moléculas en solución) se vuelven críticos para el proceso de cristalización.

No siempre es fácil (o incluso posible) obtener un cristal del tamaño y calidad suficientes. Los problemas frecuentemente no son debidos a una limitación irresoluble de la técnica, sino al desconocimiento o la complejidad de la fisicoquímica de las interacciones a escala molecular o al uso de técnicas de cristalización no adecuadas en cada caso concreto.

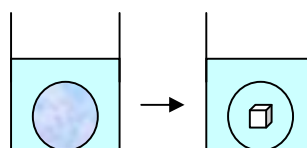
Cuando se cristaliza una sustancia, lo que hacemos es favorecer que las moléculas se ordenen en un entramado periódico tridimensional. En esa ordenación juegan fundamentalmente dos procesos consecutivos en el tiempo. El primero de ellos es el transporte de las moléculas hacia las caras del cristal por difusión o convección, mientras que el segundo es la incorporación de esas moléculas a aquellas posiciones sobre la superficie del cristal que mejor se adaptan al orden periódico tridimensional. El éxito de la cristalización está pues ligado íntimamente a la velocidad relativa de los procesos de transporte de moléculas hacia el cristal y del reordenamiento de las mismas en la superficie del cristal. Existen diferentes métodos para lograr cristalizar una proteína, algunos son mas eficaces que otros pero el principal problema del crecimiento de cristales y las técnicas hoy en día utilizadas para resolverlo consisten en el mejor de los casos en un *screening* de las condiciones experimentales o simplemente en el ensayo y error, lo que en ambos casos significa cientos o miles de experimentos hasta dar con el juego de condiciones óptimas.

### 3.1 Método de cristalización en “batch”

Es el método mas simple consiste en combinar todos los componentes en una solución la cual se mantiene sin agitación durante el proceso. Existe una variante llamada “microbatch” en el que una pequeña gota que contiene la solución es sumergida en aceite inerte para prevenir la evaporación.



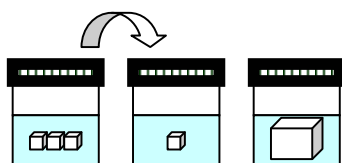
Cristalización en “batch”



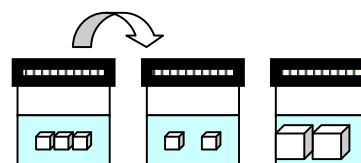
Cristalización en “microbatch”

### 3.2 Métodos de Siembra

Dado que las condiciones de nucleación y crecimiento son diferentes esta estrategia involucra la optimización por separado de ambos procesos, en el que los cristales son transferidos de condiciones de nucleación a condiciones de crecimientos. Existen dos variantes: macrosiembra en el que un cristal se transfiere del líquido madre donde la nucleación y el crecimiento inicial han sucedido a una solución supersaturada para continuar el crecimiento; y microsiembra en el que varios núcleos son transferidos al medio de crecimiento.



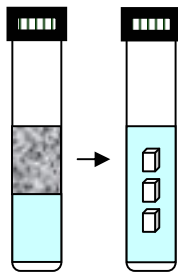
Macrosiembra



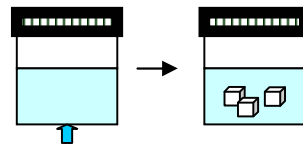
Microsiembra

### 3.3 Métodos de nucleación trascendente y local

Este método separa las condiciones de nucleación y el crecimiento dentro de un solo recipiente. Esta estrategia se utiliza para cristalizar proteínas cuya solubilidad depende de la temperatura, consiste en ajustar la temperatura inicial para inducir la nucleación y entonces se modifica para permitir el crecimiento del cristal favorecido por una libre difusión de la solución supersaturada con la solución precipitante (Libre difusión en interfase), alternatively la solución es calentada o enfriada localmente para inducir la nucleación (Inducción de nucleación local).



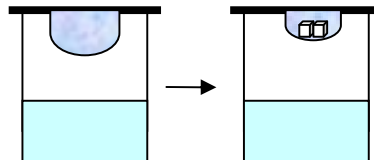
Libre difusión en interfase



Inducción de nucleación local

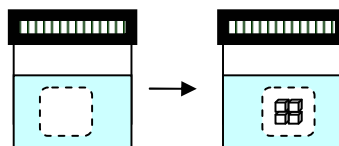
### 3.4 Métodos por difusión de calor

Las condiciones de la solución que contiene la proteína es manipulada por difusión a través del aire, la nucleación ocurre cuando la concentración de proteína incrementa por la reducción del volumen causado por el equilibrio de vapor de agua de la gota que contiene la proteína a una solución higroscópica.



### 3.5 Métodos de diálisis

La composición de la solución es alterada por difusión de componentes de bajo peso molecular a través de una membrana semipermeable por lo que permite que en un tiempo la solución alcance la cantidad de componentes exacta y adecuada para el proceso de cristalización.



## 4. Difracción de rayos X

La Cristalografía en sus inicios se limitaba a tratar sobre el aspecto externo de los cristales. La naturaleza del estado cristalino u orden interno no es un hecho tan evidente como la visión de las perfectas caras o formas cristalinas. La primera conexión entre forma externa o caras de un cristal y su orden interno no se realizó hasta el siglo XVII. Más adelante se vio que el orden interno podría existir aunque no hubiera evidencia externa de ello. Como se menciono antes, las relaciones angulares entre las caras de un cristal no quedan afectadas por la simetría de traslación ya que originan desplazamientos tan pequeños que no pueden observarse morfológicamente. Sólo las técnicas de rayos X y difracción electrónica permiten su detección.

La cristalografía de rayos X nos proporciona la imagen más adecuada que podemos tener de las estructuras cristalinas. Los métodos de difracción de rayos X constituyen la herramienta más poderosa de que se dispone para el estudio de la estructura íntima de la materia cristalina, dotando de una extensa base de resultados estructurales a la química, mineralogía y biología. La mayor parte de la información que poseemos de las estructuras internas cristalinas es mediante la técnica de difracción de rayos X.

De Broglie y Thompson cada uno por su cuenta demostraron que era posible difractar la luz. Esta puede ser desdoblada en haces mediante una *rejilla de difracción* que consiste en una serie de líneas muy cercanas y regularmente espaciadas trazadas en una superficie plana. La difracción de la luz se produce si su longitud de onda es prácticamente la misma que la distancia que hay entre las líneas trazadas. La difracción de las ondas electromagnéticas se produce porque los elementos de una rejilla, por llamarlo así, absorben la radiación y actúan a su vez como fuentes secundarias reemitiendo la radiación en todas direcciones. Los rayos X fueron descubiertos accidentalmente por Wilhelm Conrad Röntgen en 1895 cuando experimentaba con la producción de rayos catódicos en tubos de descarga cubiertos con papel negro. Descubrió que el haz de electrones producido en el cátodo incidía en el vidrio del tubo y producía una radiación X de pequeña intensidad. No obstante, Röntgen no llegó a determinar la longitud de onda de ese nuevo tipo de radiación electromagnética. En 1912, el físico alemán Max Von Laue y su equipo, sugirieron que los átomos de un cristal están espaciados a una distancia tan pequeña que les permite servir como elementos de una rejilla de difracción tridimensional para los rayos X.

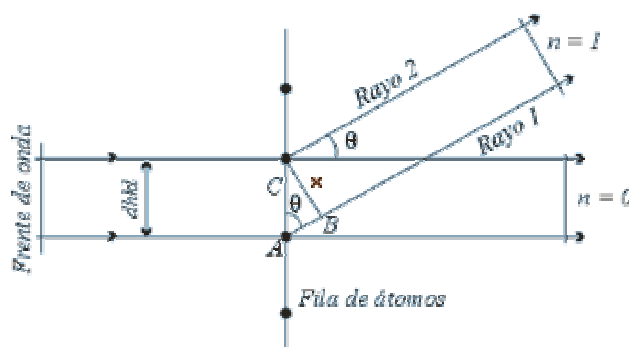
Los rayos X interactúan con la materia a través de los electrones que la forman y que se están moviendo a velocidades mucho menores que la de la luz. Cuando la radiación electromagnética X alcanza un electrón cargado éste se convierte en fuente de radiación electromagnética secundaria dispersada, por lo que si se incide un haz de rayos X sobre un cristal, éste choca con los átomos haciendo que los electrones que se encuentren en su trayectoria vibren con una frecuencia idéntica a la de la radiación incidente y actúan como fuentes secundarias de nuevos frentes de onda de rayos X con la misma longitud de onda y frecuencia.

Uno de los primeros ensayos de difracción se realizó con un cristal de  $\text{CuSO}_4$  al que se le sometió a la acción de los rayos X haciendo que el haz incidiera en una placa fotográfica. El resultado fue la impresión de la placa por una serie de manchas distribuidas geométricamente alrededor de una mancha central grande producida por el haz directo de rayos X demostrándose así que se producía difracción. Este era el comienzo de la cristalografía de rayos X. La disposición de los puntos resultantes depende de las disposiciones relativas de los átomos del cristal (modelo de Laue).

Tras el descubrimiento de los rayos X en 1895 por Röntgen, en 1912 von Laue, basándose en tres hipótesis (que el medio cristalino es periódico, que los rayos X son ondas, y que la longitud de onda de los rayos X es del mismo orden de magnitud que la distancia que se repite en los cristales) confirmó la difracción de rayos X (DRX) y dio la pauta para el comienzo de la ciencia de la Cristalografía de rayos X. Poco después, Bragg descubrió que la geometría del proceso de DRX es análoga a la reflexión de la luz por un espejo plano. Así, en una estructura cristalina tridimensional, debido a su periodicidad, es posible construir conjuntos de muchos planos que son paralelos entre sí, igualmente espaciados y conteniendo idénticas disposiciones atómicas. El proceso consiste en la dispersión de los rayos X por las nubes electrónicas que rodean a los átomos del cristal originando un patrón de difracción regular (al igual que la estructura atómica del cristal), resultado de la interferencia constructiva y destructiva de la radiación dispersada por todos los átomos. Las circunstancias en las que el resultado de esta interferencia es constructivo vienen reguladas por la ecuación de Bragg, que no suministra más información que la dada por las ecuaciones de von Laue, pero sí facilita enormemente la interpretación del resultado.

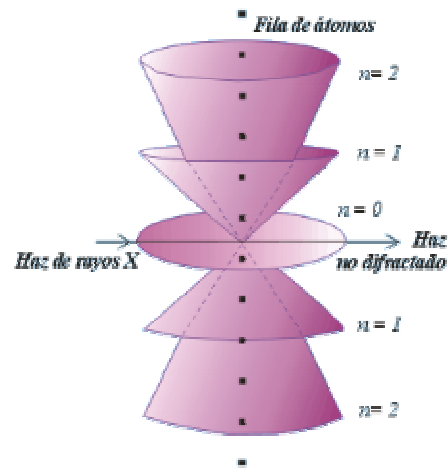
#### 4.1 Ecuaciones de Laue

Cuando un cristal difracta rayos X, las ondas dispersadas electromagnéticas reemitidas interfieren entre sí constructivamente sólo en algunas direcciones, es decir se refuerzan, anulándose en el resto. En la figura de abajo los rayos 1 y 2 estarán en fase y por tanto se producirá difracción cuando la distancia AB represente un número entero de longitud de onda, esto es cuando  $AB = n\lambda$ , siendo n un número entero (0, 1, 2, 3...n).



Para cada  $n\lambda$  el ángulo  $\theta$  es constante y el conjunto de los rayos difractados forma un cono cuyo eje central está formado por una fila de átomos. Ese cono tiene otro simétrico

al otro lado del haz incidente. En la figura se representa cada cono formado por un conjunto de haces difractados correspondientes a cada  $n$ .



Para que la difracción tenga lugar en las tres dimensiones de un cristal es necesario que se satisfagan las siguientes tres ecuaciones conocidas como **ecuaciones de Laue**:

$$a(\cos \alpha_1 - \cos \alpha_2) = h\lambda \text{ (eje X)}$$

$$b(\cos \beta_1 - \cos \beta_2) = k\lambda \text{ (eje Y)}$$

$$c(\cos \gamma_1 - \cos \gamma_2) = l\lambda \text{ (eje Z)}$$

donde:

$a$ ,  $b$  y  $c$  son las distancias reticulares en las tres dimensiones

$h$ ,  $k$ ,  $l$  son números enteros

$(\alpha, \beta, \gamma)_1$  representa el ángulo entre el haz incidente y la fila de átomos

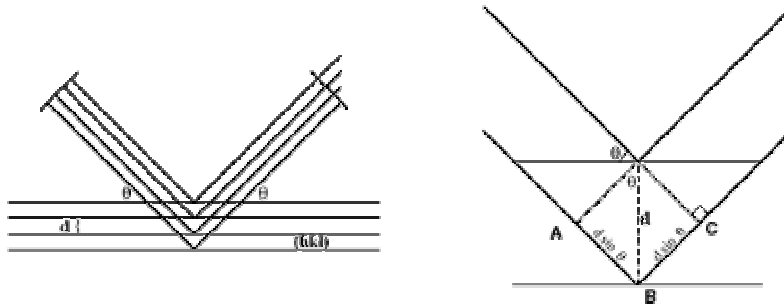
$(\alpha, \beta, \gamma)_2$  entre ésta y el haz difractado en cada una de las dimensiones

Así para que se produzca un haz difractado es necesario que tres conjuntos de conos representantes de tres posibles soluciones de las ecuaciones deban intersectarse a lo largo de tal dirección. Esto sucede en raras ocasiones por lo que en la práctica se utiliza la ecuación propuesta por Bragg.

## 4.2 Ecuación de Bragg

Bragg se dio cuenta que los rayos X dispersados por todos los puntos de la red en un plano ( $hkl$ ) debían estar en fase para que las ecuaciones de Laue se vieran satisfechas y aún más, la dispersión a partir de sucesivos planos ( $hkl$ ) debían estar así mismo en fase. Para una diferencia de fase igual a cero las leyes de la simple reflexión deben mantenerse para un plano sencillo y la diferencia de camino para reflexiones de planos sucesivos debe ser un número entero de longitudes de onda.





En la figura presentada arriba se ve como un haz incidente es difractado por dos planos sucesivos hkl con espaciado interplanar  $d_{hkl}$ . La diferencia de camino recorrido por los dos haces de planos sucesivos viene dada por la ecuación

$$AB + BC = 2d_{hkl} \sin \theta,$$

y de ahí la condición para que la difracción sea máxima:

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$$

donde:

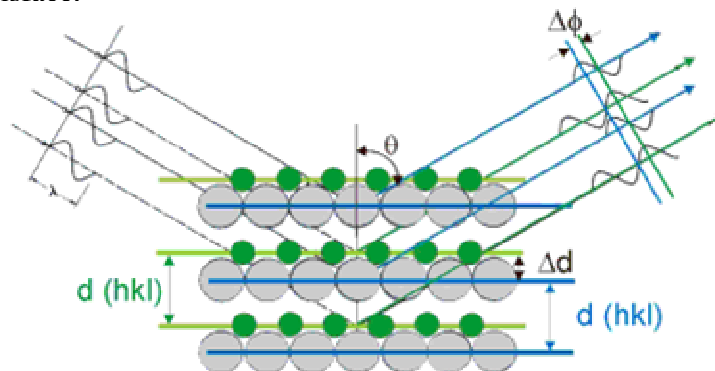
$n$  = un numero entero

$\lambda$  = longitud de onda en ángstroms

$d$  = espacio interatómico en ángstroms

$\theta$  = ángulo de difracción en grados

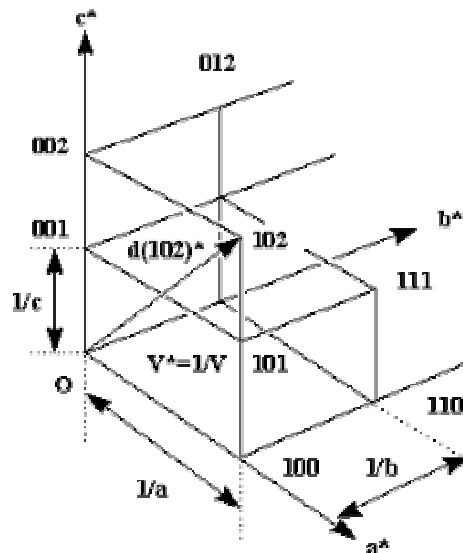
Bragg encontró que las trayectorias de difracción en los cristales podían explicarse como si hubieran producido por reflexión de rayos X por planos hkl, pero sólo cuando la ecuación se satisface.



En la figura de arriba se da una descripción del modelo de Bragg cuando se trata de secuencias de planos del mismo espaciado, pero formados a su vez por átomos de distinto tipo, separados por  $d$ . Esta separación geométrica origina diferencias de fase dentro de un mismo haz difractado que provocan interferencias y que dan lugar a variaciones de intensidad (según la dirección), lo que permite obtener información de la estructura de los átomos que forman el cristal.

### 4.3 La red recíproca y la esfera de Ewald

Un cristal consiste en una repetición periódica de la celda unitaria en una red. Igualmente, podemos definir la red recíproca como aquella red cuyas dimensiones son recíprocas a la celda original y corresponden a las posiciones de reflexión, y cuyo tamaño la intensidad de la reflexión.

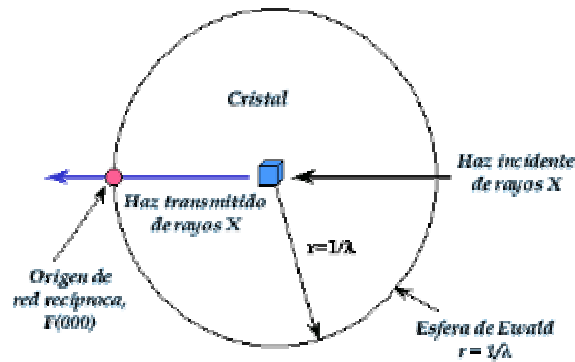


Cada uno de los puntos de la red correspondientes a la difracción de un grupo específico de planos de la red cristalina se define por el índice  $hkl$ . Las dimensiones de la red recíproca están recíprocamente relacionadas con la red real. La longitud del vector  $d(hkl)^*$  de la red recíproca (desde el origen al punto  $hkl$  de la red recíproca) es la distancia recíproca  $d(hkl)$  de los planos de la red cristalina con este índice. Así,  $d(001)^* = 1/c$ ;  $d(002)^* = 1/2c$ .

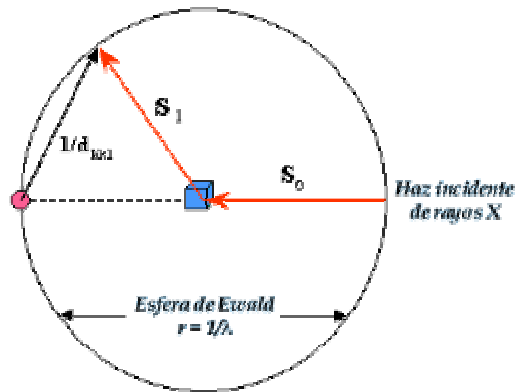
La intensidad observada ( $I$ ) de los puntos de difracción puede extraerse del tamaño correspondiente del punto de la red recíproca. Claramente cada uno depende de los contenidos de la celda unitaria y a su vez el grupo espacial de simetría tendrá implicaciones sobre la simetría del patrón de difracción.

Una herramienta muy útil para conocer la aparición de los puntos de difracción es la esfera de Ewald:

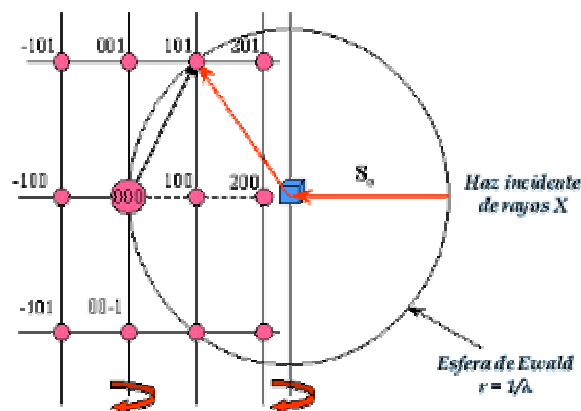
- 1- Se dibuja una esfera de radio  $1/\lambda$  en el centro de la cual imaginamos al cristal real.
- 2- El origen de la red recíproca se marca en el haz transmitido, en el borde de la esfera de Ewald.



La máxima difracción (reflexiones, puntos de difracción) ocurre solamente cuando las tres ecuaciones de Laue, o la equivalente ecuación de Bragg son satisfechas. Estas condiciones se cumplen cuando un punto de la red recíproca cae exactamente sobre la **esfera de Ewald**.



Es necesario rotar el cristal para mover los puntos de la red recíproca a través de la esfera de Ewald. Dibujando la red recíproca en el origen en un principio sólo (101) y (10-1) dan lugar a una reflexión. Rotando la red, el cristal, a través del eje vertical, el punto de la red recíproca (201) entrará en la esfera y creará un punto de difracción.



## 5. Generadores de Rayos X

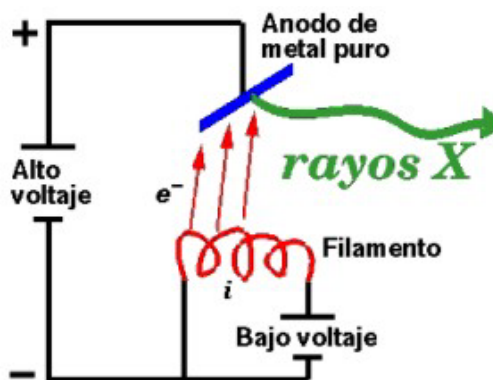
Los rayos X que más interesan en el campo de la Cristalografía de rayos X son aquellos que disponen de una longitud de onda próxima a 1 ángstrom (los denominados rayos X "duros") y corresponden a una frecuencia de aproximadamente 3 millones de THz (tera-hertzios) y a una energía de 12.4 keV (kilo-electrón-voltios), que a su vez equivaldría a una temperatura de unos 144 millones de grados. Estos rayos X se producen en los laboratorios de Cristalografía o en las llamadas grandes instalaciones de *sincrotrón*.

### 5.1 Generadores en tubo

Los equipos que se utilizan en los laboratorios de Cristalografía para producir estos rayos X son relativamente sencillos. Disponen de un *generador* de alta tensión (unos 50.000 voltios), que se suministra al llamado *tubo de rayos X*, que es realmente donde se produce la radiación.



Tubos convencionales de rayos X que se utilizan en los laboratorios de Cristalografía



Esquema de un tubo convencional de rayos X

Esos 50 kV se suministran como diferencia de potencial (alto voltaje) entre un filamento incandescente (por el que se hace pasar una corriente  $i$  de bajo voltaje, unos 5 A a unos 12 V) y un metal puro (normalmente cobre o molibdeno), estableciéndose entre ambos una corriente de unos 30 mA de electrones libres. Desde el filamento incandescente (cargado negativamente) saltan electrones hacia el ánodo (cargado positivamente) provocando, en los átomos de este último, una reorganización electrónica en sus niveles de energía. Este es un proceso en el que se genera mucho calor, por lo que los tubos de rayos X deben estar muy refrigerados.

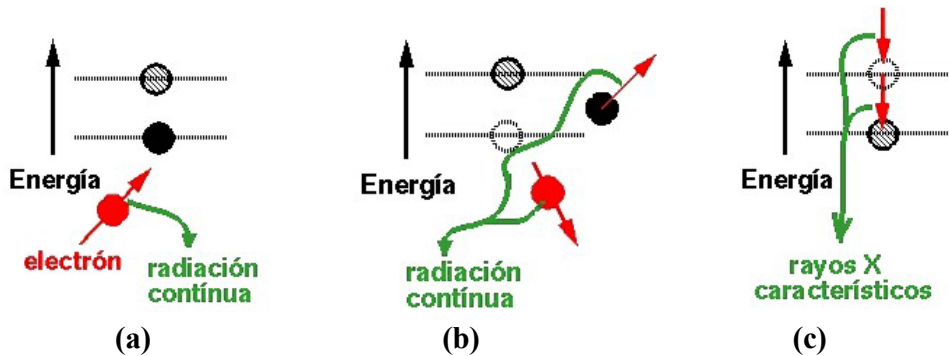
### 5.2 Generadores de ánodo rotatorio

Una alternativa a los tubos convencionales son los llamados *generadores de ánodo rotatorio*, en los cuales el ánodo, en forma de cilindro, se mantiene con un giro continuo, consiguiendo con ello que la incidencia de los electrones se reparta por la superficie del cilindro y así se puedan obtener potencias mayores de rayos X.



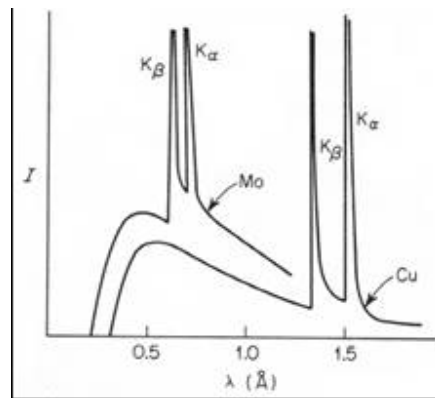
Generador de rayos X con ánodo rotatorio

Ánodo rotatorio de cobre pulido



Esquema del funcionamiento de un ánodo rotatorio. (a) Estado energético de los electrones en un átomo del ánodo que va a ser alcanzado por un electrón del filamento. (b) Estado energético de los electrones en un átomo del ánodo después del impacto con un electrón del filamento. (c) Electrones que vuelven a su estado inicial, emitiendo esta energía en forma de rayos X llamados característicos.

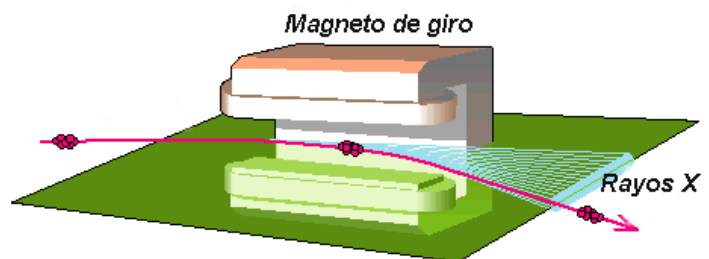
El restablecimiento energético del electrón anódico que se excitó, se lleva a cabo con emisión de rayos X con una frecuencia que corresponde exactamente al salto de energía concreto que necesita ese electrón para volver a su estado inicial. Estos rayos X tienen por tanto una longitud de onda concreta y se conocen con el nombre de *radiación característica*. Las radiaciones características más importantes en Cristalografía de rayos X son las llamadas *líneas K-alpha (Ka)*, donde los electrones caen a la capa más interior del átomo (mayor energía de ligadura). Sin embargo, además de estas longitudes de onda concretas, se produce también todo un espectro de longitudes de onda, muy próximas entre sí, y que se denomina *radiación continua*, debido al frenado por el material de los electrones incidentes y es característica del material anódico.



Distribución de longitudes de onda de los rayos X que se producen en tubos convencionales de rayos X en donde el material anódico es cobre y molibdeno. Sobre el llamado espectro continuo aparecen las llamadas líneas características K-alpha ( $K_{\alpha}$ ) y K-beta ( $K_{\beta}$ ).

### 5.3 Sincrotron

En las grandes instalaciones de *sincrotrón*, la generación de los rayos X es distinta. Una instalación sincrotrónica contiene un anillo muy grande (del orden de kilómetros) por el que se hacen circular electrones a altísima velocidad en el interior de canales rectilíneos que de vez en cuando se quiebran para adaptarse a la curvatura del anillo. A estos electrones se les hace cambiar de dirección para pasar de un canal a otro usando campos magnéticos de gran energía. Y es en ese momento, en el cambio de dirección, cuando los electrones emiten una radiación muy energética denominada *radiación sincrotrónica*. Esa radiación está compuesta por un continuo de longitudes de onda que abarcan desde las *microondas* hasta los llamados *rayos X duros*. Los rayos X que se obtienen en las instalaciones de sincrotrón tienen la gran ventaja de modular la longitud de onda.



Detalle de cómo en las curvaturas de la trayectoria de los electrones se produce la radiación sincrotrón.

## 6. Métodos de difracción de rayos X

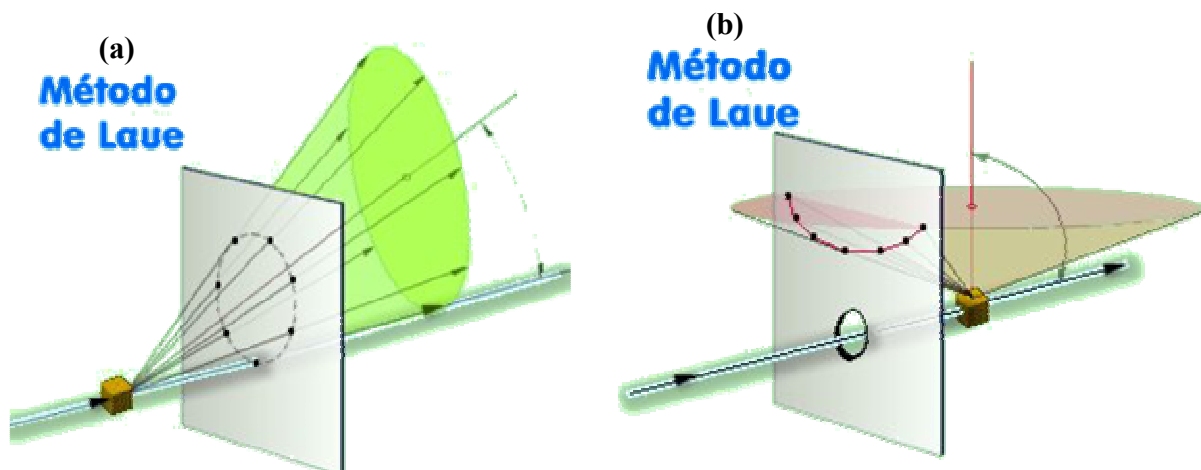
A partir de las medidas de las posiciones de las manchas de difracción en una película fotográfica se pueden determinar las dimensiones de una celda unitaria. Para la deducción del sistema cristalino debe determinarse la simetría del patrón de difracción. Ausencias sistemáticas de ciertos tipos de reflexiones evidencian la presencia de celdas unitarias no primitivas, de planos de deslizamiento, de ejes helicoidales que ayudará a deducir los grupos espaciales. Los métodos experimentales de difracción de rayos X más utilizados son los siguientes:

### 6.1 El método de Laue

Históricamente éste fue el primer método de difracción. Utiliza un haz policromático de rayos X que incide sobre un cristal fijo; por ello, el ángulo de Bragg es invariable para cada grupo de planos  $hkl$ . De este modo, el cristal genera un conjunto de haces que representan la simetría interna del cristal. En estas condiciones, y teniendo en cuenta la ley de Bragg, las constantes del experimento son los espaciados  $d$  y la posición del cristal respecto al haz incidente, y las variables son la longitud de onda  $\lambda$  y el entero  $n$ , así que cada haz difractado corresponderá al primer orden de difracción ( $n=1$ ) de una cierta longitud de onda, al segundo orden ( $n=2$ ) de la longitud de onda mitad ( $\lambda/2$ ), al tercer orden  $n=3$  de la longitud de onda  $\lambda/3$ , etc. Por lo tanto, el diagrama de Laue es simplemente una proyección estereográfica de los planos del cristal. Cada uno de éstos conjuntos de planos de espaciado  $d_{hkl}$  satisface la ecuación de Bragg para un determinado valor de longitud de onda. Así, cada haz difractado tiene distinta longitud de onda.

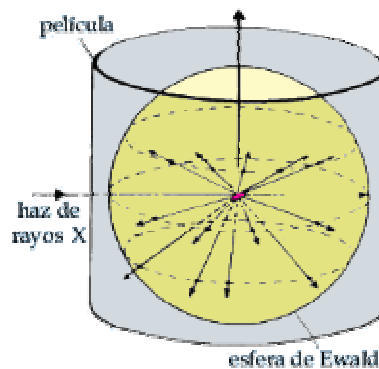
Existen dos variantes del método de Laue:

- (a) por **transmisión**, en la que el haz de rayos X incide sobre el cristal y los haces transmitidos y difractados por él se recogen sobre una película.
- (b) por **reflexión** hacia atrás: en este montaje, la película se sitúa entre la fuente de rayos X y el cristal. Por un orificio practicado en la película pasa un colimador que selecciona un pincel de rayos X que incide sobre el cristal; y la película recoge los haces difractados hacia atrás.



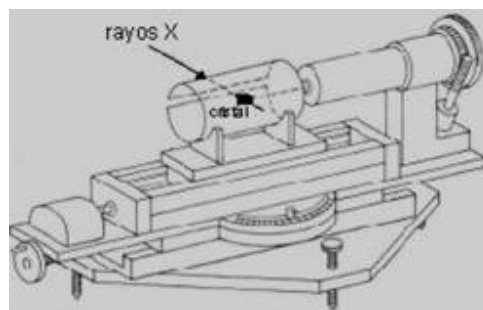
## 6.2 Métodos del cristal giratorio

La limitación más grande del método de Laüe es el desconocimiento de la longitud de onda de los rayos X que se difractan para dar un determinado punto en el diagrama. Según la Ley de Bragg al fijar el valor de la longitud de onda, no hay otra posibilidad para un determinado espaciado de un cristal que modificar el ángulo. Esto se consigue haciendo un montaje del cristal que permita su giro, en torno a un eje coaxial, a una película cilíndrica que se sitúa en su alrededor. Así, para un valor discreto de ángulo que satisface la ecuación, se produce un haz de rayos X que marcará un punto en la película.



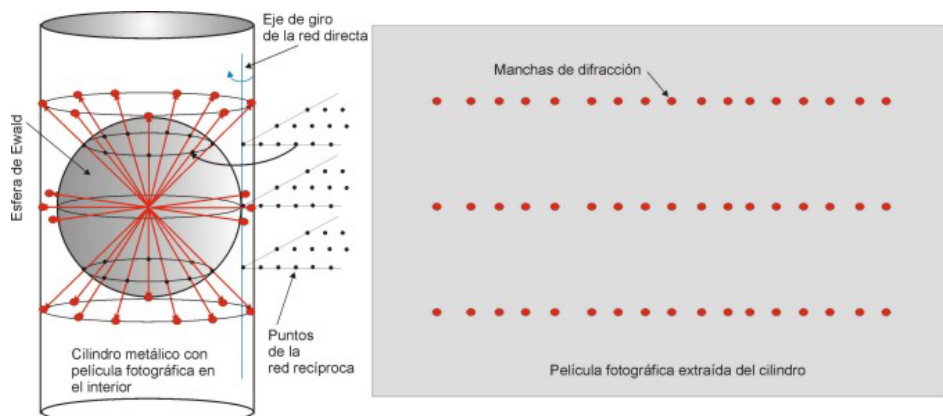
## 6.3 Método de Weissenberg

El método de Weissenberg está basado en la cámara del mismo nombre, desarrollada por K. Weissenberg (1924). Consta de un cilindro metálico que contiene en su interior una película fotográfica sensible a los rayos X. El cristal se monta sobre un eje coaxial con dicho cilindro y se hace girar según el modelo de Ewald, de tal modo que los puntos recíprocos que intersectan la superficie de la esfera de Ewald son los responsables de los haces de difracción. Estos haces generan un ennegrecimiento (mancha) sobre la película fotográfica. El tipo de diagramas Weissenberg que se obtienen del modo descrito se denominan de *rotación* o de *oscilación*, dependiendo de que el giro del cristal sea de  $360^\circ$  o parcial (aprox.  $20^\circ$ ), respectivamente. El montaje del cristal debe ser tal que su eje de giro coincida con un eje directo de la celda elemental. De ese modo, por definición de la red recíproca, existirán planos recíprocos perpendiculares a dicho eje.



Cámara tipo Weissenberg, usada en los laboratorios de Cristalografía hasta aproximadamente 1970.



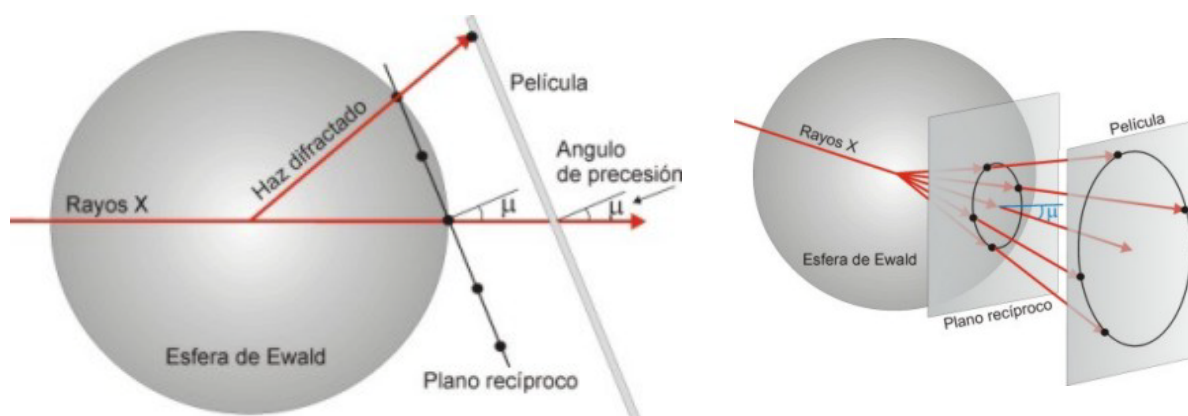


Esquema que explica la producción de un diagrama de Weissberg del tipo rotación-oscilación

Es indudable que mediante este tipo de diagramas se consigue información sobre los períodos de repetición de la red directa, ya que la separación entre las líneas que contienen las manchas de difracción es proporcional a la distancia entre planos recíprocos. Sin embargo, cada plano recíproco (dos dimensiones) queda sobre una línea (una dimensión) de manchas de la película, dando lugar a solapamiento entre manchas. Este problema quedó resuelto cuando a las cámaras se les añadió la libertad de traslación del cilindro, en la dirección paralela a su eje, acoplada al giro del cristal y seleccionando mediante dos cilindros internos el cono de difracción que origina uno solo de los planos recíprocos. De este modo, un plano recíproco (dos dimensiones) quedaría impresionado en toda la superficie de la placa fotográfica (dos dimensiones), evitando con ello el posible solapamiento entre manchas. El hecho de que todos los puntos de una misma capa de la red recíproca se condensan en un mismo nivel del diagrama, dificulta la correcta asignación de los índices  $hkl$  a cada punto, máxime si de antemano no se conoce con exactitud la red recíproca del cristal en estudio.

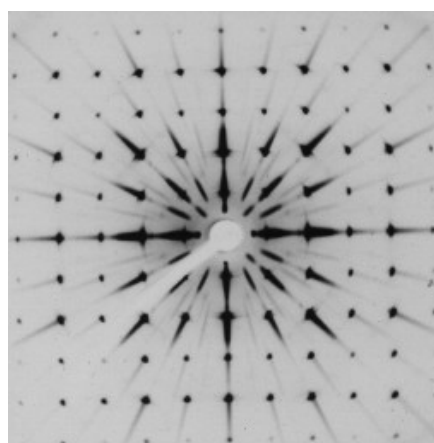
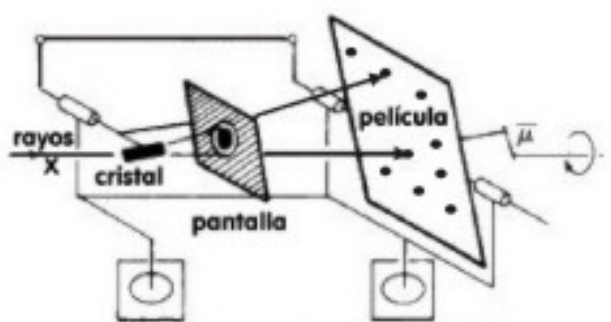
## 6.4 Método de precesión

El método de precesión fue desarrollado por Martin J. Buerger, a principios de la década de 1940, como alternativa muy ingeniosa para poder impresionar placas fotográficas de planos recíprocos sin distorsionar. Al igual que el método de Weissberg, se trata de un método en el que el cristal se mueve, pero el movimiento del cristal (y como consecuencia el de los planos recíprocos solidarios) es como el de precesión de los planetas, de ahí su nombre. La película fotográfica se coloca sobre un soporte plano y se mueve solidariamente con el cristal. El cristal debe orientarse de tal modo que el plano recíproco que se desee recoger sea perpendicular al haz directo de los rayos X, es decir, que un eje directo coincida con la dirección de los rayos X incidentes.



Dos visiones esquemáticas del principio en el que se basa la cámara de precesión. El ángulo  $\mu$  es el ángulo de precesión del plano recíproco seleccionado del cristal y de la película fotográfica, que se mantiene paralela al plano recíproco y solidaria en movimientos al cristal.

La cámara diseñada para tal efecto y el aspecto de un diagrama de difracción de una muestra inorgánica se muestran en las figuras de abajo.



Esquema y aspecto de una cámara de precesión

Diagrama de precesión de un cristal con simetría cúbica

Este tipo de diagramas son mucho más simples de interpretar que los de Weissenberg, ya que muestran el aspecto de un plano recíproco sin distorsión. La separación de un plano recíproco determinado se consigue mediante el uso de pantallas (figura de arriba) que seleccionan los haces difractados de dicho plano. Del mismo modo a como ocurre en el caso de Weissenberg, se pueden medir las distancias recíprocas y las intensidades de difracción. Sin embargo, aquí es mucho más fácil observar los elementos de simetría del espacio recíproco. La desventaja del método de precesión es consecuencia de que la película es plana en lugar de cilíndrica, y el ángulo sólido explorado es menor. Este método se ha usado con éxito durante muchos años, incluso para el caso de las proteínas. Hoy en día, con generadores de ánodo rotatorio o sincrotrones, y detectores de área (*image plate* o *CCD*, ver más abajo), que aumentan la intensidad de los máximos de difracción y reducen los tiempos de recogida con gran fiabilidad, se ha impuesto este método para los estudios de macromoléculas, en particular de proteínas.

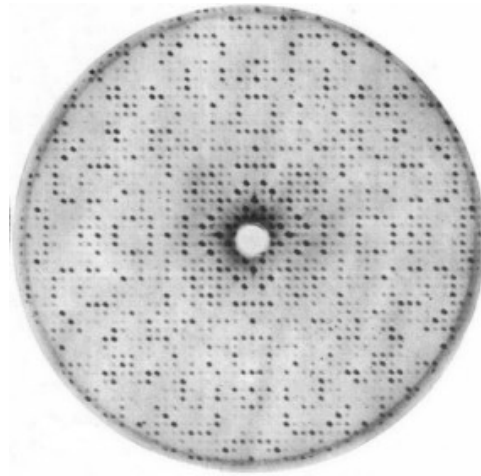
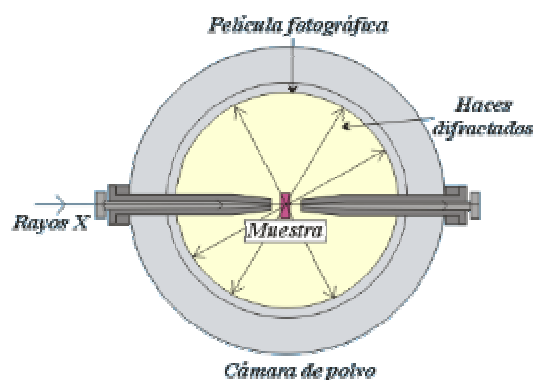


Diagrama de precesión de un cristal de lisozima en el que fácilmente se distingue un eje de simetría cuaternario perpendicular al diagrama. Debido a que los ejes de la celdilla elemental son grandes, la separación entre los puntos recíprocos es pequeña

## 6.5 El método del polvo cristalino

El método del polvo cristalino presenta características muy interesantes para su utilización; es el único procedimiento de DRX que permite abordar el estudio cristalográfico de las especies que no se presentan, o no es posible obtener, en forma de monocristales. La desorientación relativa existente entre los numerosos cristalitos que componen la muestra hace que en los diagramas de difracción quede reflejada, tanto cualitativa como cuantitativamente, la identificación de las fases cristalinas de la muestra. Este método es utilizado en mineralogía.

En este método la muestra se pulveriza lo más finamente posible de forma que esté constituida idealmente por partículas cristalinas en cualquier orientación. Para asegurar la orientación totalmente al azar de estas pequeñas partículas con respecto al haz incidente la muestra localizada en la cámara de polvo generalmente se hace girar en el haz de rayos X durante la exposición.

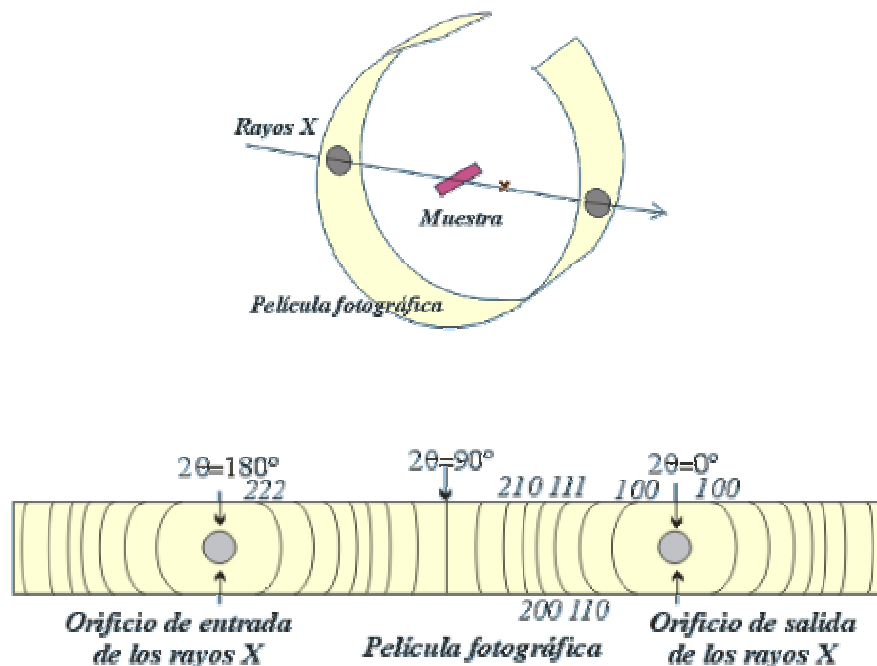


En la cámara de polvo un haz monocromático de rayos X pasa a través de un colimador dentro de un cilindro de metal en el centro del cual se encuentra la muestra de polvo. Los haces difractados al incidir sobre la muestra se registran en una delgada película fotográfica localizada en el interior de la pared del cilindro. Cuando el haz monocromático

incide sobre la muestra se producen al mismo tiempo todas las difracciones posibles. Para cada conjunto de planos atómicos ( $hkl$ ) con su característico espaciado  $d_{hkl}$  existen numerosas partículas con una orientación tal que forman el ángulo apropiado con respecto al rayo incidente capaz de satisfacer la ley de Bragg.

Los máximos de difracción de un conjunto de planos determinados forman 2 conos simétricos cuyo eje coincide con el haz incidente. El ángulo entre el haz no difractado y los haces difractados que constituyen los conos es de valores enteros  $n$ . La intersección de cada cono de haces difractados con la película fotográfica produce dos arcos simétricos con respecto a dos centros que representan el lugar de entrada y salida del haz de rayos X de la cámara.

Cuando la película se despliega se observa una serie de arcos concéntricos y simétricos con respecto a los dos orificios. Con la cámara de polvo es posible registrar reflexiones de ángulos de hasta  $180^\circ$ . Los conos de ángulos pequeños coinciden con el centro del orificio de salida y representan los índices  $hkl$  más sencillos y los mayores espaciados. Los arcos aumentan de radio conforme el ángulo del cono es mayor, hasta que es  $90^\circ$  momento en el que el arco se convierte en una línea recta. Ángulos mayores de  $90^\circ$  quedan representados como arcos concéntricos en el orificio de entrada de los rayos X.



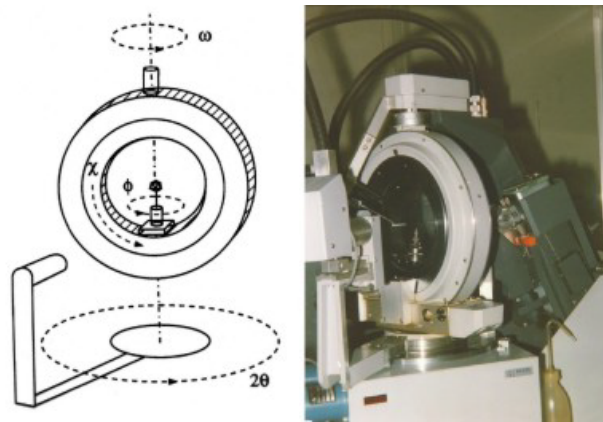
Aunque la mayoría de los cristales de la muestra no producen difracción normalmente hay los suficientes cristales orientados correctamente como para que la intensidad de la difracción sea lo bastante importante como para quedar registrada en la película. De esta forma habrá siempre una línea representante de cada familia de planos de la red cristalina.

## 6.6 Goniometría de cuatro círculos

La introducción de los computadores digitales a finales de la década de 1970, permitió el diseño de los llamados *difractómetros automáticos de cuatro círculos*. Estos equipos, disponen de un sistema goniométrico, con una mecánica muy precisa, que mediante tres giros permite colocar el cristal en cualquier orientación del espacio, provocando así que se cumplan los requerimientos de la construcción de Ewald para que se produzca la difracción. En estas condiciones, un cuarto eje de giro, que sustenta el detector electrónico se coloca en condiciones de recoger el haz difractado. Todos estos movimientos se pueden programar para que se realicen de un modo automático, con una mínima intervención del operador. Entre este tipo de goniómetros se pueden distinguir dos geometrías goniométricas que se han usado con excelente éxito durante muchos años.

### 6.6.1 Geometría Euleriana

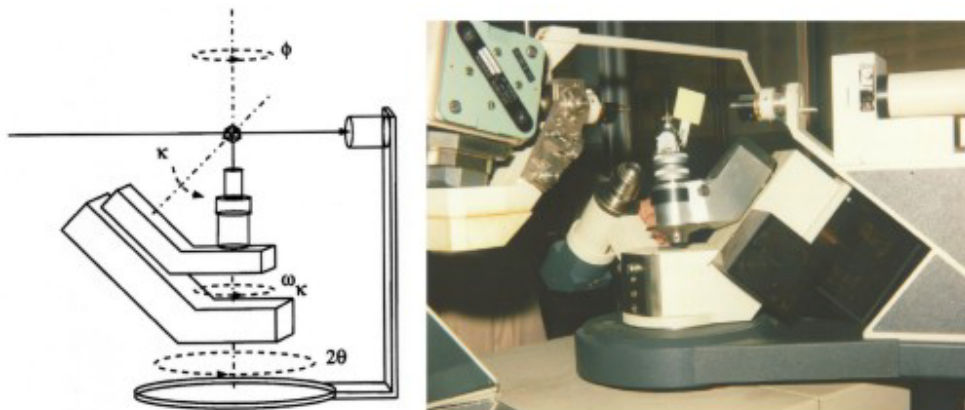
En el goniómetro de *geometría Euleriana* (ver figura de abajo) el cristal se orienta mediante los tres ángulos de Euler,  $\phi$  que representa el giro sobre el eje de la cabeza goniométrica,  $\chi$  que le permite el balanceo sobre el círculo cerrado, y  $\psi$  que permite el giro total del goniómetro. El cuarto círculo lo representa el giro del detector,  $2\theta$ . Esta geometría, presenta la ventaja de la estabilidad mecánica, pero por contra restringe la accesibilidad al cristal para equipos externos de baja o alta temperatura.



Esquema y aspecto de un goniómetro de cuatro círculos con geometría Euleriana.

### 6.6.2 Geometría Kappa

La geometría alternativa a la Euleriana es la denominada *geometría Kappa* que no dispone de un círculo cerrado equivalente al  $\chi$ . En su lugar, su función la cumplen los llamados ejes  $\kappa$  y  $-\kappa$ , de tal modo que con una combinación de ambos se pueden obtener  $\kappa$  eulerianos en el intervalo de  $-90$  a  $+90^\circ$ . La ventaja principal de esta geometría es la amplia accesibilidad al cristal. Los ángulos  $\phi$  y  $2\theta$  son idénticos a los de la geometría euleriana:



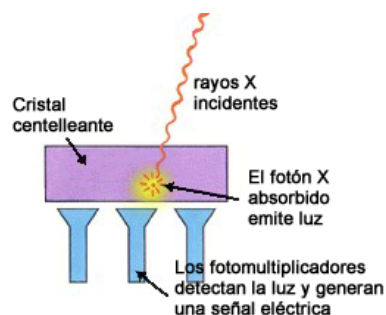
Esquema y aspecto de un goniómetro de cuatro círculos con geometría Kappa

Tanto en la geometría *Euleriana* como *Kappa*, el sistema de detección ampliamente usado durante muchos años es el denominado "puntual", en el sentido de que la detección de cada haz difractado (reflexión) se realiza de modo individual, necesitando cambiar, de modo automático y programado, los cuatro valores angulares del goniómetro para cada haz difractado. Los tiempos de medida en estos equipos suele ser del orden de 1 minuto por reflexión.

## 7. Detectores

### 7.1 Fotomultiplicadores

Uno de los detectores más ampliamente usados ha sido el denominado detector de centelleo cuyo funcionamiento esta basado en la utilización de fotomultiplicadores:



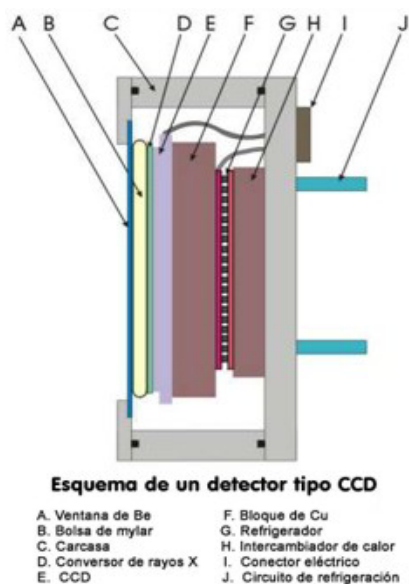
### 7.2 Charge Coupled Device

Como alternativa a los detectores "puntuales", el desarrollo de la tecnología electrónica ha dado lugar a la aparición de los denominados *detectores de área*, que permiten la detección de muchos haces de difracción simultáneamente, ahorrando con ello tiempo en el experimento. Esta tecnología es de especial utilidad para el caso de las proteínas y en general de cualquier material que pueda deteriorarse durante su exposición a



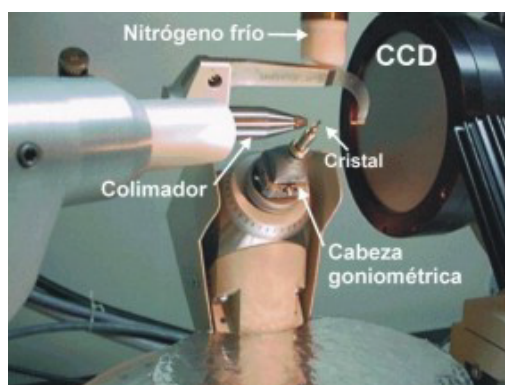
los rayos X, ya que la detección de cada una de las imágenes que se recogen (con varios cientos o miles de reflexiones) se hace en un tiempo mínimo, del orden de los segundos.

Uno de los detectores de área más comúnmente usado se basa en los denominados *CCD's* (*Charge Coupled Device*) cuyo esquema se muestra a continuación:



Esquema de un CCD con indicación de sus componentes principales. El conversor de rayos X (D en la figura) es un material sensible, que es capaz de convertir los rayos en pulsos eléctricos. Los CCD's operan a una gran velocidad de conversión, aunque su desventaja es la de operar a muy bajas temperaturas.

Los detectores del tipo *CCD* se instalan normalmente sobre equipos goniométricos con geometría *Kappa* y por su rapidez su uso está ampliamente extendido en el ámbito de la Cristalografía de proteínas, asociados a generadores de ánodo rotatorio o en las grandes instalaciones de sincrotrón (ver mas abajo).



Detalle del montaje de un goniómetro con geometría Kappa (aunque con ángulo  $\kappa$  fijo)

### 7.3 Image Plate Scanner

Otro tipo de detectores de amplio uso hoy en día, especialmente en la Cristalografía de proteínas es el llamado Image Plate Scanner que generalmente se montan sobre un goniómetro relativamente rudimentario, cuya única libertad de giro corresponde a la del cristal sobre su eje de montaje. El detector propiamente dicho es una placa circular de material sensible a los rayos X que se interpreta, después de la exposición, mediante un láser capaz de digitalizar las intensidades.



Image Plate Scanner

Detalle de un detector del tipo Image Plate Scanner

La recogida de un espectro completo consiste en la obtención de multitud de imágenes y que posteriormente son analizadas para obtener la métrica, simetría e intensidades del espacio recíproco. Todos estos métodos permiten obtener una colección de datos, formados por tres índices de Miller y una intensidad para cada uno de los máximos de difracción medidos. Con ello se consigue recoger la mayor parte posible de la red recíproca, ponderada con intensidades, es decir, el espectro de difracción de un monocristal de la muestra a estudiar. Estos datos nos permitirán reconstruir la arquitectura interior del cristal

## 8. Determinación de las posiciones atómicas por DRX

La determinación de las posiciones de los átomos dentro de la celdilla unidad, relacionadas con la intensidad de Bragg, requiere de amplios estudios de la interacción de los rayos X con electrones no apareados, de los fenómenos de interferencia que ocurren cuando los rayos X son dispersados por los electrones en los átomos, y de la interferencia entre los rayos dispersados por átomos diferentes. Sin embargo, aunque las intensidades de las reflexiones de Bragg están relacionadas con las posiciones atómicas el problema de las fases nos impide proceder automáticamente a partir de las intensidades medidas para deducir la estructura.



## 8.1 Problema de las fases

Los detectores de rayos X miden intensidades acumulativas en el tiempo, no pueden detectarse las diferentes fases; todo lo que se puede hallar directamente es el módulo del factor de estructura que sería la suma de varias variables extendida a todos los átomos de la celda elemental.

$$F_{(hkl)} = \sum_j f_j e^{i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

### 8.1.1 Transformada de Fourier

La transformada de Fourier permite describir la ecuación como:

$$\rho(xyz) = 1/V \sum_{(h)} \sum_{(k)} \sum_{(l)} F(hkl) \cos 2\pi [hx + ky + lz - \phi(hkl)]$$

que da el mapa de densidad electrónica es decir, la representación tridimensional de la densidad electrónica de la molécula. Este mapa es la herramienta fundamental que permite deducir la estructura de la molécula. Para calcularlo hay un problema: el patrón de difracción permite medir la intensidad de cada haz pero no su fase.

El conjunto completo de intensidades suministra suficiente información para que puedan resolverse las estructuras cristalinas junto con métodos para resolver el problema de las fases. Existen una serie de métodos tradicionales (Método de estimación de errores, Mapas de Patterson, Métodos directos, Sustitución isomorfa, Métodos de superposición y Remplazamiento molecular) que proporcionan una solución parcial de la estructura.

**Soluciones al problema de la fase:** *Para moléculas pequeñas:* Se inventan fases y se calcula el mapa que se compara con la molécula. Si no es razonable se rechazan las fases y se intenta con otras. *Para proteínas:* (a) *remplazamiento isomorfo* Se derivatizan los cristales con átomos pesados, es decir se requiere que los iones de metal sean incorporados en un cristal sin afectar la estructura. Se comparan los patrones de difracción del cristal original con los cristales derivatizados distintos. De la comparación de los cristales se calculan las fases. (b) *remplazamiento molecular.* Se utilizan las fases de una proteína de estructura parecida y conocida. Una vez conocidas las amplitudes y las fases, la transformada de Fourier calcula el mapa de densidad electrónica. Una solución más reciente para resolver el problema de la fase involucra utilizar la radiación de sincrotrón a varias longitudes de onda y ha acelerado la velocidad para resolver estructuras cristalinas

## 8.2 Refinamiento

Al modelo realizado se le calcula el patrón de difracción a que daría lugar y se compara con el observado mediante el parámetro R. El modelo es aceptable a partir de  $R < 0.2$ . Con proteínas se puede llegar hasta  $R = 0.1$  y con moléculas pequeñas hasta  $R = 0.01$ . Para refinar el modelo: se incluyen moléculas de agua, se varía el factor de

temperatura de cada átomo (es una medida de su movilidad), se varían ligeramente las fases, se varían las coordenadas ('manualmente' o por dinámica molecular). En cristalografía de proteínas se denomina resolución a la distancia menor entre planos refractantes para la que se ha podido recoger reflexiones (cuanto menor es la resolución, mayor es el número de reflexiones utilizadas). Son resoluciones aceptables entre 1.5 y 2.0 Å, lo que equivale a una impresión en las coordenadas de 0.15 Å.

Muchos de los datos tridimensionales de estructuras macromoleculares depositados en el PDB se han obtenido por alguno de los siguientes métodos: cristalografía de rayos X (más del 80 % del total de las estructuras), resonancia magnética nuclear (RMN) en solución (alrededor del 16 % del total) o modelaje molecular (2 % del total). Los cristales de proteína que se utilizan en los estudios de difracción están altamente hidratados, por lo que las estructuras determinadas a partir de estos cristales no son muy diferentes de las estructuras de proteínas solubles en solución acuosa. Algunas moléculas se han estudiado tanto por cristalografía como por RMN en solución, en estos casos la correlación es excelente, como en la tioredoxina de *Escherichia coli*.

La difracción de rayos X de cristal, usualmente no puede resolver las posiciones de los átomos de hidrógeno o realmente diferenciar entre un nitrógeno de un oxígeno o de un carbono. Esto significa que la identidad química de los átomos de la cadena lateral de aspártico, glutamina y treonina, es usualmente inferida a partir del medio en que se encuentra la cadena lateral, por ejemplo, se selecciona la orientación de la cadena lateral que forma más puentes de hidrógeno o hace las mejores interacciones electrostáticas como la mas plausible.

## 9. Base de datos estructurales de proteínas: DB

La base de datos de la estructura de las proteínas también llamado PDB por sus siglas en inglés (protein data bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>), contiene los archivos de la posición de cada átomo en un eje de coordenadas tridimensional (plano con tres ejes Cartesianos X, Y, Z) que conforman una proteína. Este archivo de coordenadas no solo considera el esqueleto de la proteína sino todas aquellas moléculas con las que se haya resuelto en conjunto la estructura de la proteína, por ejemplo los grupos prostético de hemo-proteínas, inclusive las moléculas del solvente que están unidos a las proteínas también aparecen y es con esta información con la que se alimentan los programas de cómputo para la visualización molecular. La información contenida en este tipo de archivo proviene de la estructura tridimensional de proteínas obtenidas a la fecha por cristalografía de rayos X o la RMN. Esta base de datos fue originalmente desarrollada y mantenida por Walter Hamilton en Brookhaven National Laboratories, en USA en 1971 y hoy en día es almacenada y mantenida en el centro de bioinformática estructural conocido como: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (USA), desde 1998, la cual es un asociación de diferentes universidades y centros que mantienen esta base de datos. Esta base de datos contiene archivos con extensión pdb (archivos de coordenadas de las estructuras) o mmCIF (archivos de información macromolecular de cristales).

Hoy en día "PDB" no solamente contiene la colección de la estructura tridimensional de proteínas, sino además, información estructural de ácidos nucleicos,

carbohidratos y una variedad de complejos de macromoléculas o modelos estructurales creadas por otras técnicas biofísicas. Estos archivos presentan un formato determinado que no solo describe las coordenadas de cada uno de los átomos, ya que debe incluir características químicas y bioquímicas de las moléculas, tales como: los detalles experimentales de la determinación de las estructuras, la información de la estructura secundaria de la proteína, los puentes de hidrógeno, las moléculas de agua que están unidas a la molécula, la información de los posibles sitios activos o sitios de unión de ligandos a las proteínas, así como la posible estructura biológica, ya que muchas de las proteínas que forman parte del metabolismo pueden estar formadas por más de una cadena polipeptídica, para formar una proteína funcional oligomérica. Es importante conocer algunas características básicas de este tipo de archivo, porque en ocasiones es necesario editar los archivos a través de cualquier programa editor de textos o recurrir a la información contenida en el archivo, previo a realizar el análisis de la estructura. Por ejemplo, cuando se inicia el análisis de la estructura de una proteína es fundamental conocer si la estructura que resulta está en ausencia o presencia de ligandos, algún solvente o crioprotector ya que estas moléculas pueden interactuar con las proteínas y modificar algunos detalles de la estructura.

Las primeras líneas de este tipo de archivo contienen información básica que se indica a continuación con una palabra clave en inglés seguido de la explicación, a continuación se describen algunas de las líneas de información que debe llevar este archivo:

- Encabezado (HEADER), que se refiere al número de identificación de cada estructura, este número está compuesto de cuatro dígitos, el primero es un número y los siguientes tres suelen ser letras por ejemplo 2LAO. También contiene la fecha de depósito de la estructura en el banco de datos.
- Título (TITLE), contiene información única de la biomolécula o condiciones de la experimentación.
- Nombre (CMPND), incluye el nombre común de la molécula.
- Fuente de obtención de la molécula (SOURCE), se refiere al origen ya sea químico o biológico de la molécula, por ejemplo si proviene de un organismo recombinante.
- Referencia de publicación (JRNL), contiene la cita original donde se describe la estructura depositada en la base de datos.
- Cometarios libres de los autores del trabajo (REMARK).
- Secuencia primaria de la proteína (SEQRES), la secuencia se indica en el código de tres letras
- Heteroátomos (HET), nombre de los residuos de átomos no comunes en las proteínas, por ejemplo los grupos prostéticos, o los ligandos que se unen a las proteínas.
- Fórmula química de los heteroátomos (FORMUL).
- Localización de los residuos con estructura secundaria tipo hélice-<sub>2</sub> (HELIX).
- Localización de los residuos con estructura secundaria tipo hebras beta (SHEET).
- Localización y existencia de enlaces disulfuro (SSBOND).
- Coordenadas atómicas que corresponden a la proteína (ATOM).

- Coordenadas atómicas de los residuos que no corresponden a la proteína se denominan heteroátomos (HETEROATOM).

## 10. Programas de visualización molecular

En el análisis de la estructura de las proteínas se requiere de programas de cómputo que nos permita la visualización a nivel atómico de las proteínas y por consiguiente, identificar las interacciones a nivel molecular entre dos o más proteínas o entre las proteínas con sus ligandos. En muchos casos simplificar la representación de la proteína a través de una caricatura que nos indique su forma y volumen o bien, represente la estructura secundaria de las proteínas con cilindros y flechas, ofrece gran ayuda para contar rápidamente con una idea general de la estructura tridimensional de la molécula de proteína, y de posibles regiones de interacción con otra proteína o un ligando. Sin embargo, la información contenida a nivel molecular contiene mucha más información que la simple caricatura y para extraer toda esta información los programas de cómputo requieren una serie de herramientas que nos permiten identificar y manipular las representaciones de las coordenadas de los átomos de una molécula, por ejemplo: cambiar la perspectiva de visualización a través de comandos de rotación, translación o cambio de tamaño de la molécula en la pantalla; colorear y etiquetar los residuos de interés de manera específica. Existen colores estándar para cada uno de los tipos de átomos: verde para el carbono, rojo para el oxígeno, azul para el nitrógeno, blanco para el hidrógeno, amarillo para el azufre, sin embargo el usuario puede cambiar el código de colores. Otras de las funciones que se pueden utilizar son las determinaciones geométricas entre residuos (distancias y ángulos), la representación del volumen de los átomos, así como realizar indicaciones sobre la superficie de la molécula, ya sea en forma de malla o bien sólida o transparente. Es importante recordar que dependiendo del programa de visualización y el análisis que se quiera implementar, todas estas herramientas se combinan de múltiples maneras, con la idea de resaltar ciertos sitios de interés.

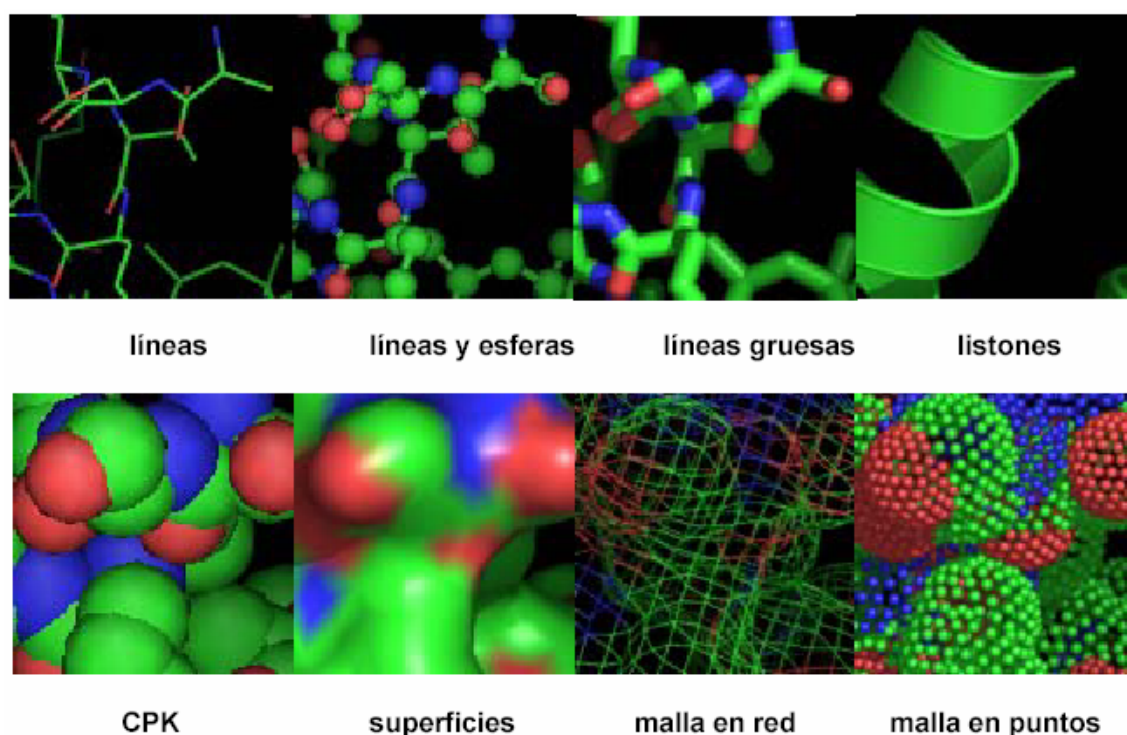
Las representaciones más comunes de los átomos son:

- Líneas que unen a los átomos, las líneas representan los enlaces covalentes y los extremos representan los átomos (sticks).
- Esferas pequeñas que representan los átomos que son unidas por líneas que representan los enlaces covalentes entre los átomos (balls and sticks).
- La representación del radio de Van der Waals de los átomos (CPK o space filling) que nos da una idea del volumen de átomos.
- El esqueleto peptídico de la proteína (backbone), ya sea con la representación o no de los átomos de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman la proteína.
- Esquemática o también llamada caricatura, representa la estructura secundaria de una proteína: cilindros ó listones en forma de serpentina (estructura hélice- ), flechas (hebras- ), listones que comprende todas las estructuras no repetitivas, por ejemplo asas. Esta representación fue utilizada por primera vez por Jane Richardson en 1985. Esta forma abstracta de representar a las proteínas, en donde se eliminan las coordenadas de los átomos y solo se representa la estructura secundaria es una de las formas más empleadas para

representar en su conjunto la estructura terciaria de una proteína. Describir la topología de una proteína sigue siendo la forma más utilizada para representarla en libros de texto muy generales, hasta en publicaciones muy especializadas como artículos de investigación.

Existen una gran variedad de programas para la visualización de proteínas y van desde aquellos que son de dominio público (obtención libre de costos), hasta algunos que requieren licencias académicas, para educación o investigación. En la tabla 1 se presenta una lista de algunos de estos programas así como algunas de sus características.

Existen programas comerciales (SYBYL, Insight, Hyperchem), los cuales son muy prácticos, ya que a través de menús de ventanas se accionan todos los comandos, sin embargo se pagan licencias costosas.



En la actualidad, gracias a: 1.- el desarrollo de los sistemas de programación, 2.- la reducción de los costos de computadoras personales de gran capacidad y 3.- las necesidades en la investigación para el estudio de las proteínas, se cuenta con una gran variedad de programas de cómputo para visualización de proteínas que son de dominio público o de fácil obtención con licencias académicas.

Programas de visualización molecular de dominio público con licencias académicas.

Nombre	Capacidades	Comentarios	Ventajas	Desventajas	Plataforma
<b>Chime</b>	Se trabaja en línea a través del internet	Versión comercial del programa RasMol.	Mismas capacidades del RasMol. En línea se trabaja fácilmente	Comercial, no se puede modificar el programa según las necesidades. No esta disponible para ambientes tipo unix.	NT4.0 W2000 Mac
<b>Chimera</b>	Capacidades básicas para construir un modelo estructural	Paquetería modular, desde casos simples hasta modelos complejos.	Flexible y permite trabajar con una gran calidad de formatos de archivos.	No están disponibles los archivos fuente para modificar el programa, aún en fase de desarrollo.	NT4.0 W2000 Linux SGI Unix
<b>RasMol</b>	Visualización de estructuras	Muy interactivo, fácil de usar	Interactivo, con representaciones moleculares en estilos muy variados, distribución gratuita	Muestra una estructura a la vez, el ambiente gráfico es pobre	NT4.0 W2000 Mac Linux SGI Unix
<b>PyMOL</b>	Visualización molecular	Basado en una interfase grafica del programa Python, se introducen los datos desde el programa PyMOL o desde los comandos de Python	Amplia capacidad para representar a las moléculas. Comandos de lenguaje flexibles Códigos fuente del programa disponible	Si se opta por el uso de comandos es más laborioso de aprender. Requiere de computadoras con buena memoria y capacidades del CPU	NT4.0 W2000 Mac Linux SGI Unix
<b>VMD</b>	Visualización y análisis estructural, con énfasis a problemas dinámicos	Incluye un gran número de herramientas, para representar problemas dinámicos	Puede ser utilizado a través de comandos en ventanas o a través de scripts	Relativamente lento, a pesar de contar con buenos ambientes gráficos	Linux SGI Unix

## 11. Referencias

- ❖ Charles W. Carter and Robert M. Sweet. (1997). Methods in Enzymology. Vol 276. Molecular Crystallography, Part A.
- ❖ Dauter, Zbigniew. 1999. Data-collection strategies. *Acta Crystallographica*. D55, 1703-1717.
- ❖ Dauter, Zbigniew. 2006. Current state and prospects of macromolecular cristallography. *Acta Crystallographica*. D62, 1-11.
- ❖ Giacovazzo, C., H.L. Monaco, G. Artioli, D. Viterbo, G. Ferraris, G. Gilli, G. Zannotti, M. Catti. Fundamentals of Crystallography. 2002. Second edition. Oxford University Press Inc, New York, USA. 825 p.
- ❖ Rousseau, J.J. Basic Crystallography. 1998. John Wiley and Sons, Inc. Chichester, England. 414 p.
- ❖ <http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>.
- ❖ <http://lec.ugr.es/> Laboratorio de Estudios Cristalográficos.