



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Cristalografia

Aula 17

Cristalografia

Jiří Borecký
CCNH
2014



➤ Cristalografia:

- Originalmente, a ciência que estuda a geometria dos cristais
 - Medição de ângulos das fases de cristal relativas a eixos teóricos de referência (eixos cristalográficos) usando goniômetro
 - Determinação da simetria do cristal. A posição em espaço 3D de cada face do cristal é visualizada na rede estereográfica (rede de Wulff ou de Lambert), isto é que polo de cada face é incluído na rede. Cada ponto é indexado pelo índice de Miller. O gráfico final permite determinar a simetria do cristal.
- Hoje, a ciência experimental de determinação do arranjo de átomos em sólidos.
- A palavra "cristalografia" é derivada da palavra grega *crystallon* = gota fria ou congelada (sólido transparente) e *graphein* = escrever.



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Cristais

Cristalografia



Quartzo



Calcita



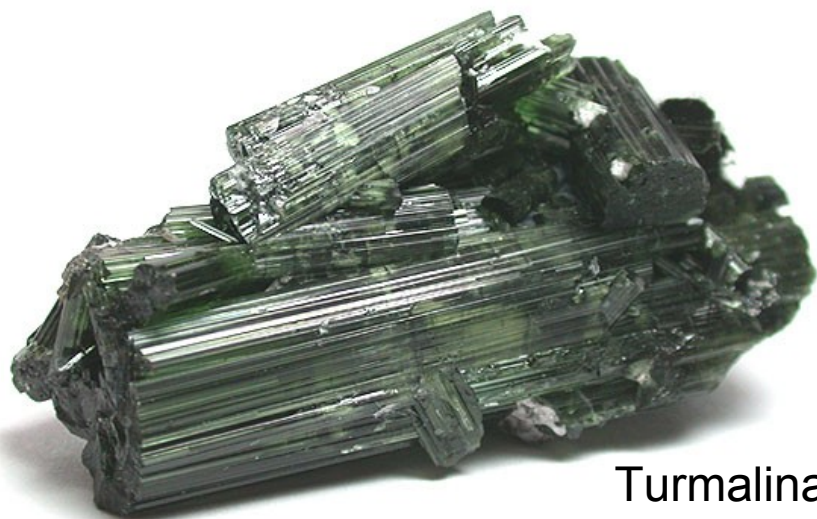
Pirita



CuSO_4



enxofre



Turmalina





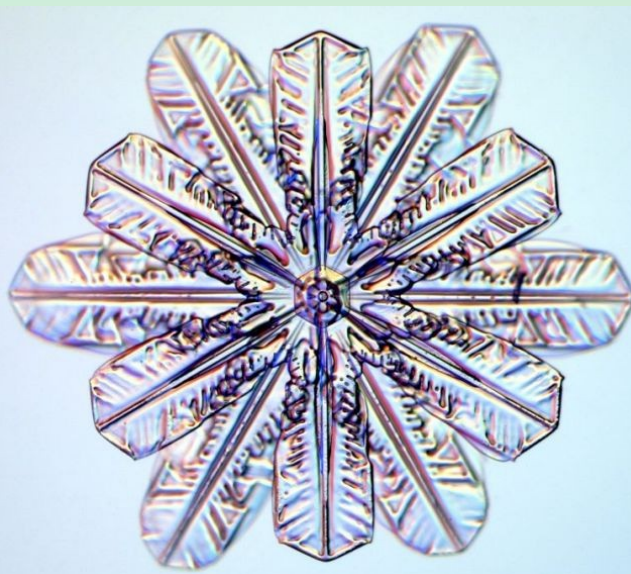
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Cristais

Cristalografia

➤ Cristais de gelo em forma de neve





Cristais

➤ Propriedades físicas de cristais

Cristal	Partículas	Forças atrativas	Ponto de fusão	Propriedades
iônico	Cátions e ânions	Eletrostáticas	Alto	Duro, brilhante Condutor de eletricidade bom
Moléculas polares	Moléculas polares	Interação dipolo-dipolo Forças de London	Baixo	Mole Condutor de eletricidade intermediário
Moléculas apolares	Moléculas apolares	Forças de London	Baixo	Mole Condutor de eletricidade ruim ou isolante

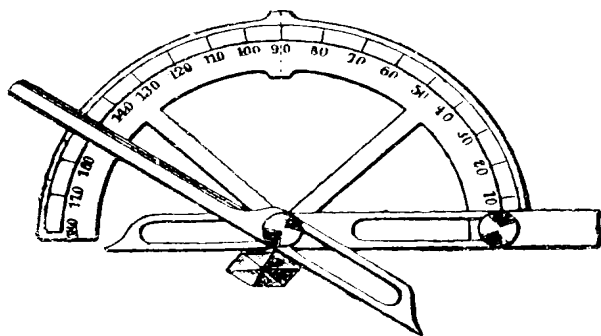


Universidade Federal do ABC

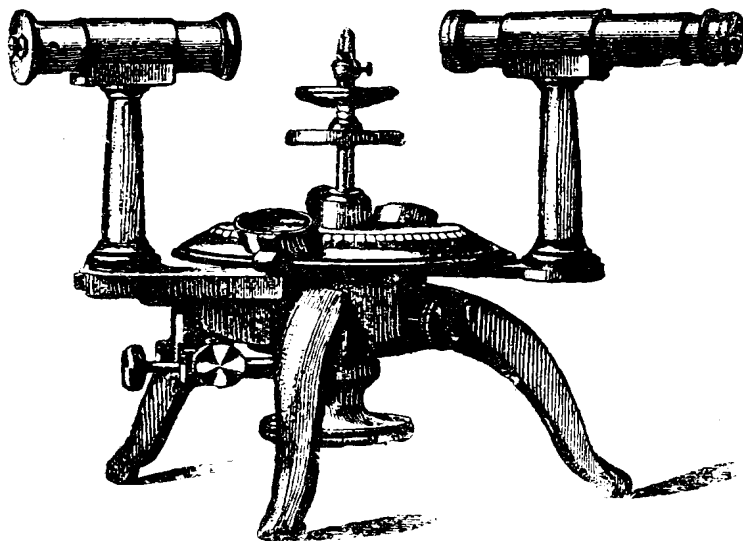
BC-1308 Biofísica

Goniômetro

Cristalografia



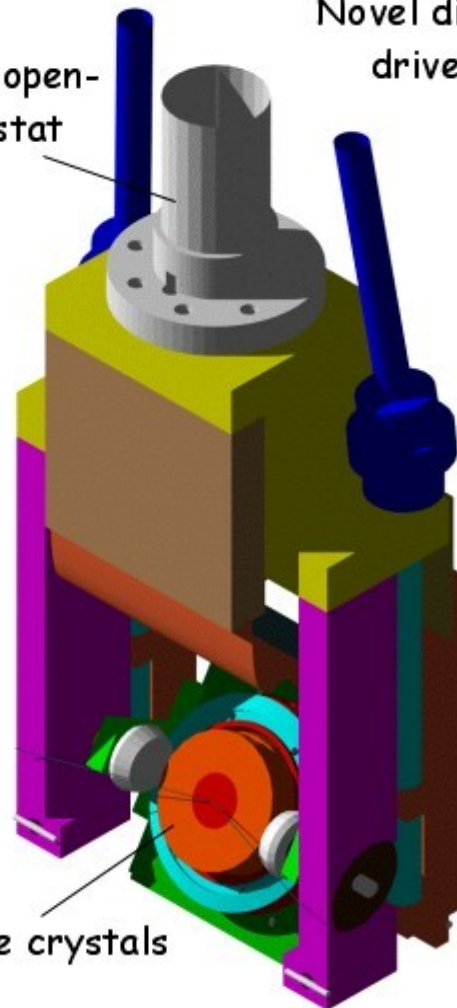
1. Goniometr ręczny.



2. Goniometr Mitscherlicha.

Commercial open-flow cryostat

Novel differential drive design



1" puck for large crystals

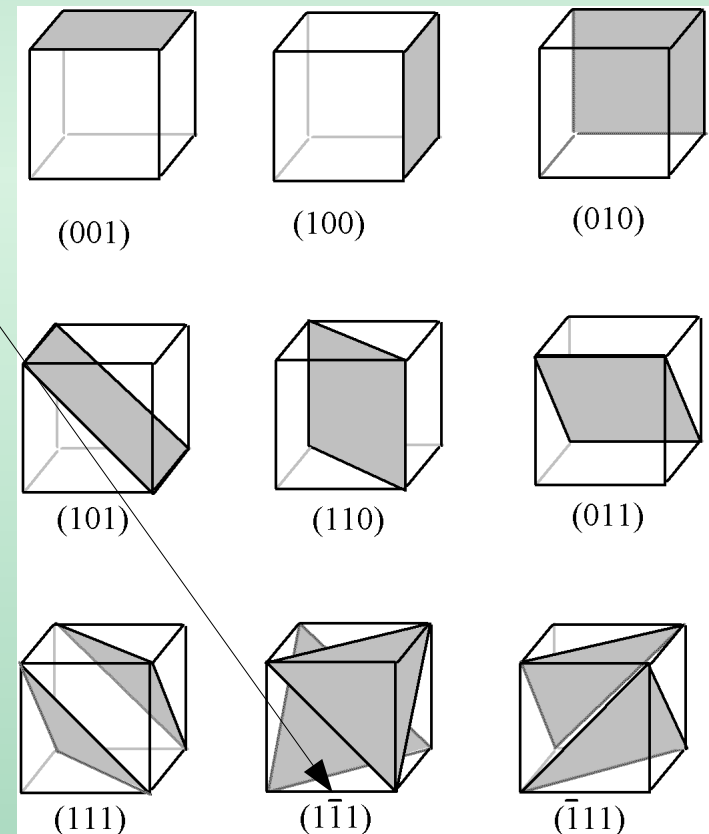
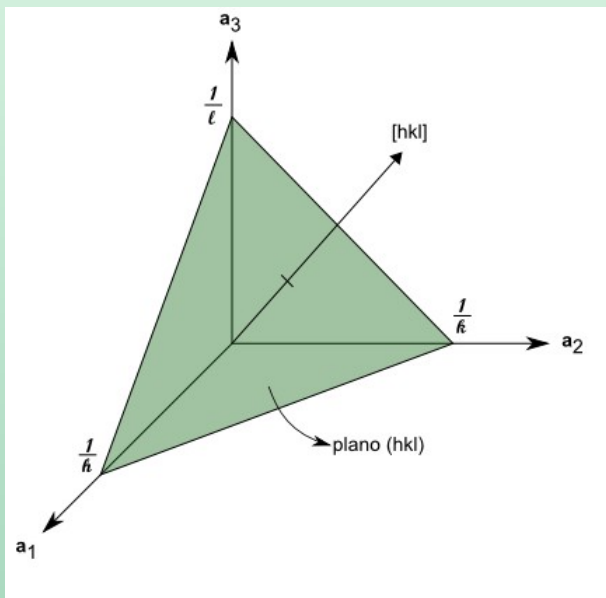


Índice do Miller

A orientação de um plano cristalino é unicamente determinada por três pontos não colineares do plano. Se cada ponto é a interseção do plano com cada um dos três eixos cristalinos (se o plano é paralelo ao eixo, toma-se a interseção como sendo no infinito), o plano pode ser determinado fornecendo-se a coordenada da interseção com cada eixo em função dos vetores da base, a_1 , a_2 e a_3

Exemplo: interseções têm valores 1, 3, 5
índices de Miller (hkl)

- * Valores recíprocos: $1/1$, $1/3$, $1/5$
- * Redução aos menores termos inteiros: (15 5 3)
- * Valores negativos têm linha em cima do número





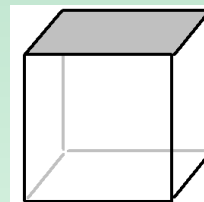
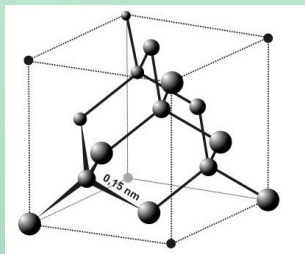
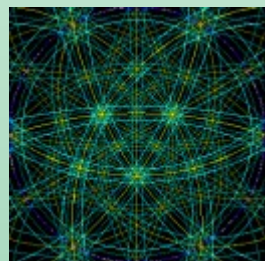
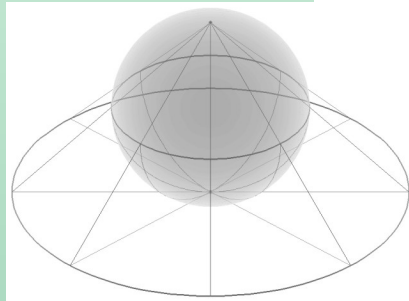
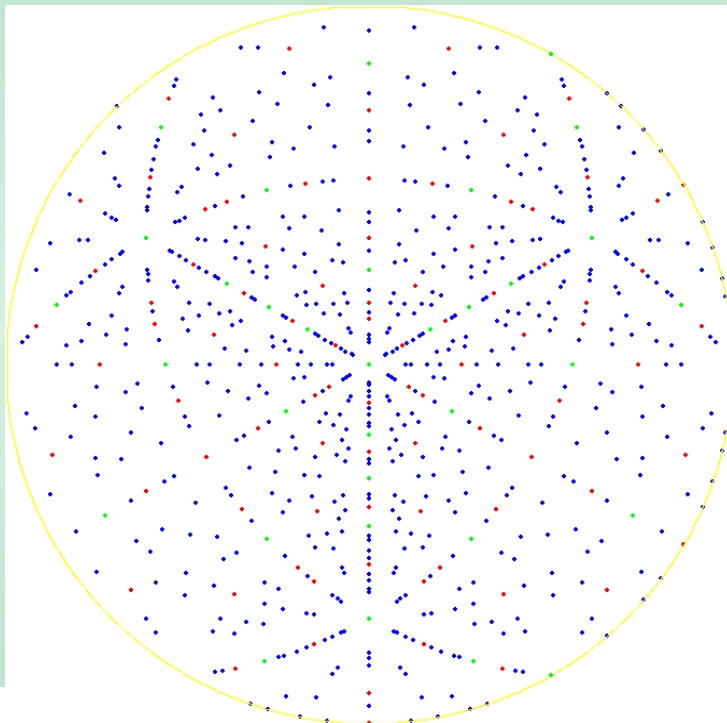
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

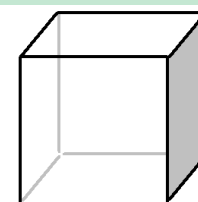
Projeção estereográfica

Cristalografia

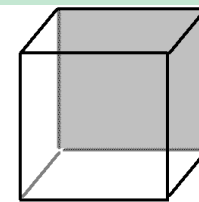
Figura polar do retículo de diamante cúbico em direção 111 (índice do Miller)



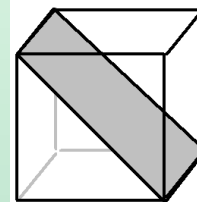
(001)



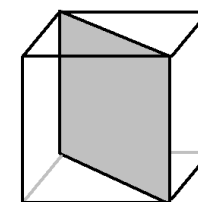
(100)



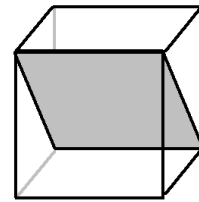
(010)



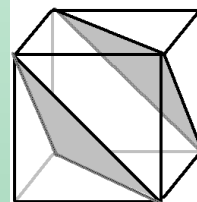
(101)



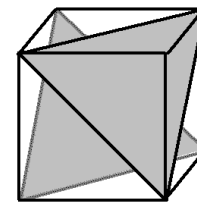
(110)



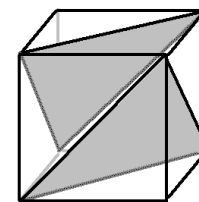
(011)



(111)



($\bar{1}\bar{1}1$)

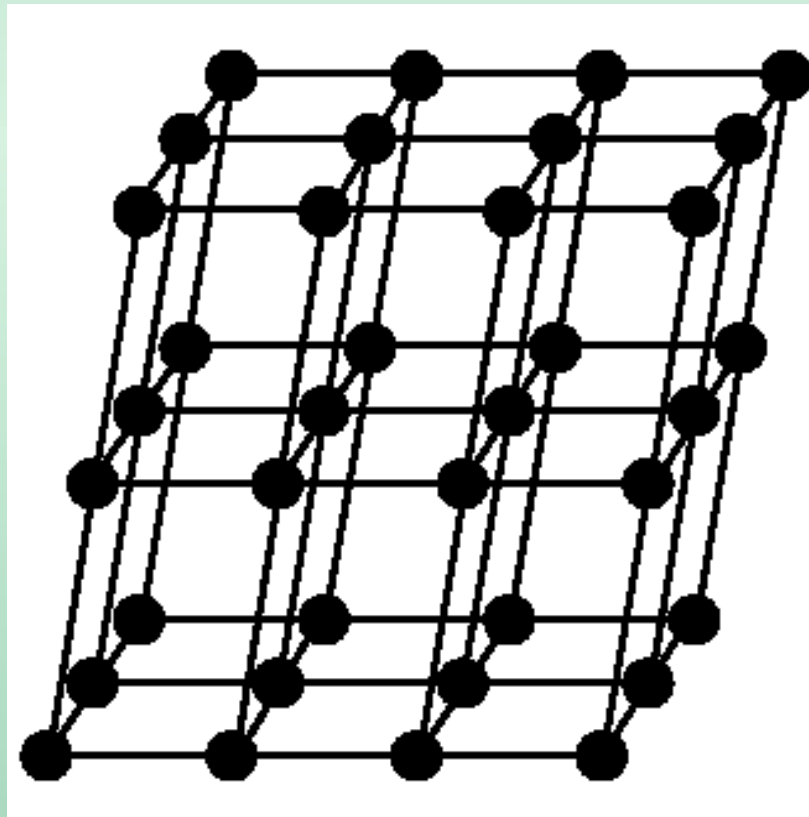


($\bar{1}\bar{1}1$)



Retículo cristalino

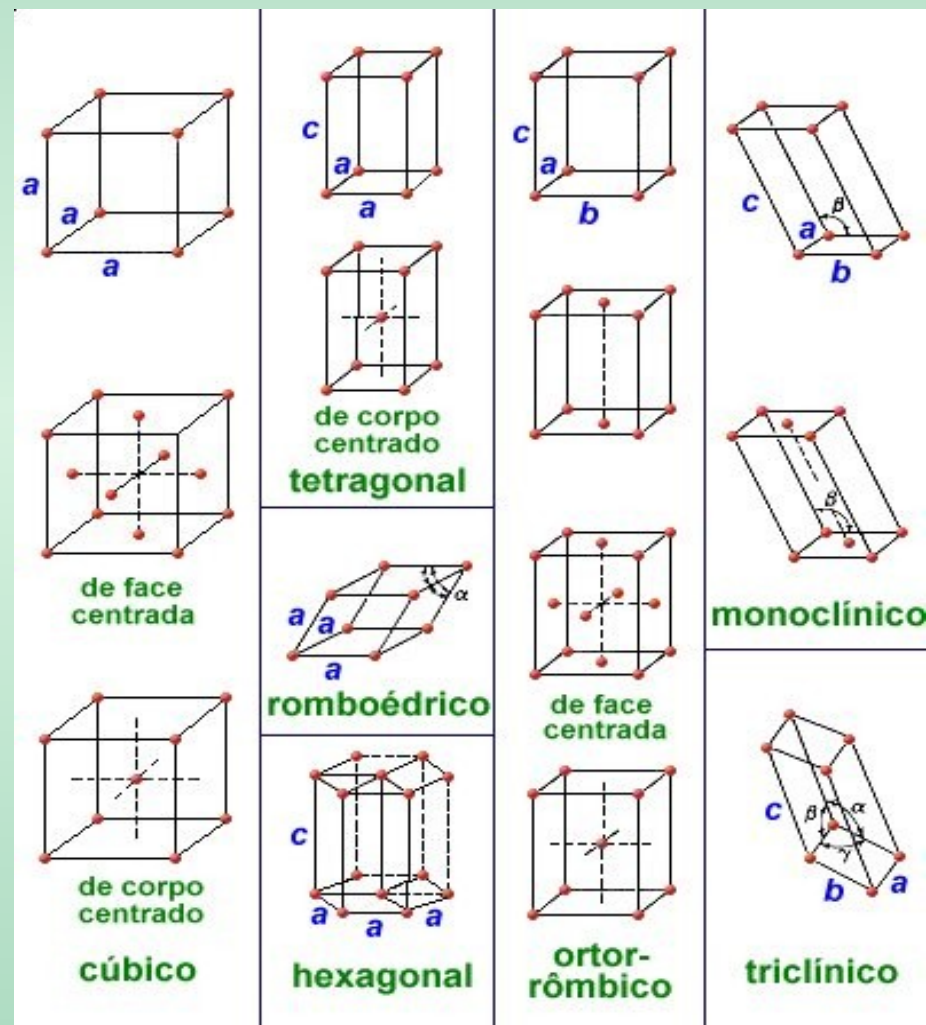
- **Retículo = construção matemática**
- **Base de átomos = entidade física**
- **Retículo+base de átomos = Retículo cristalino**





Redes de Bravais

➤ Dos 7 sistemas cristalinos podemos identificar 14 tipos diferentes de células unitárias, conhecidas com redes de Bravais. Cada uma destas células unitárias tem certas características que ajudam a diferenciá-las das outras células unitárias. Além do mais, estas características também auxiliam na definição das propriedades de um material particular.





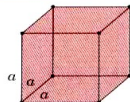
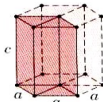
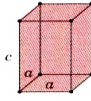
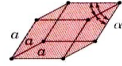
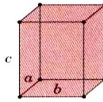
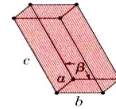
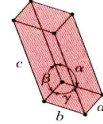
Universidade Federal do ABC

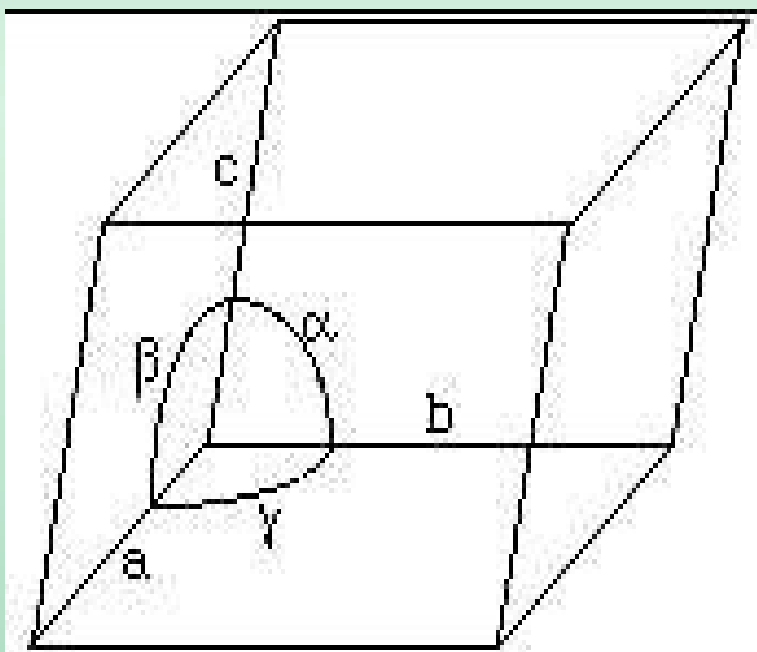
BC-1308 Biofísica

Redes de Bravais

Cristalografia

Table 3.2 Lattice Parameter Relationships and Figures Showing Unit Cell Geometries for the Seven Crystal Systems

Crystal System	Axial Relationships	Interaxial Angles	Unit Cell Geometry
Cubic	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$	
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Rhombohedral	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	
Orthorhombic	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Monoclinic	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$	
Triclinic	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

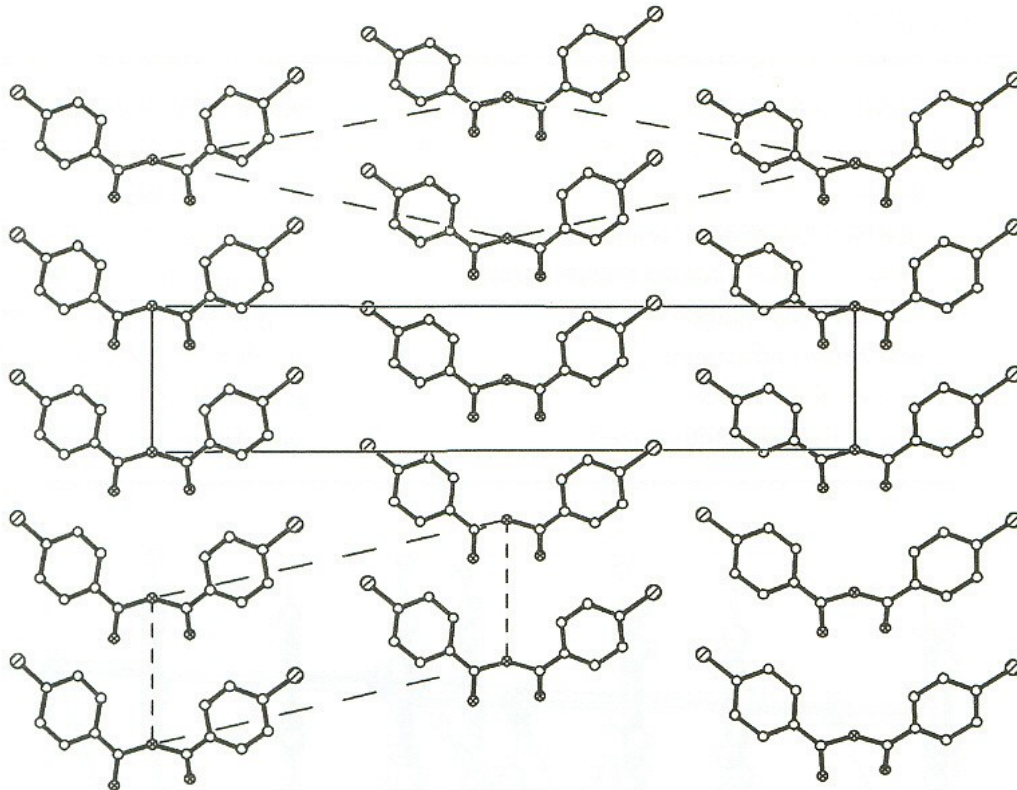
Empacotamento cristalino

Cristalografia

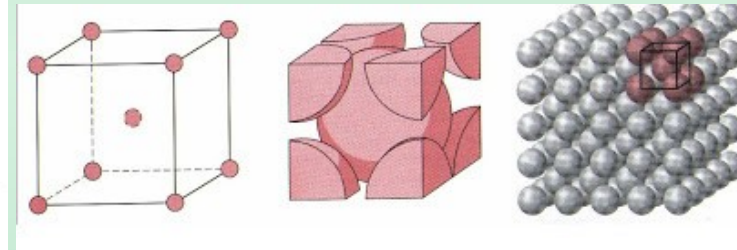
Fator de empacotamento atômico:

$FEA = N^{\circ} \text{ de átomos} \times \text{Volume(átomos)} / \text{Volume(célula)}$

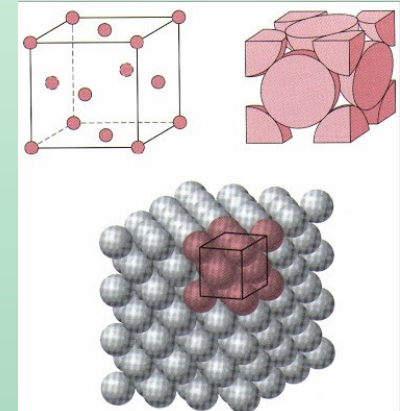
- * Cúbica simples: 0.52
- * Cúbica de corpo centrado: 0.68
- * Hexagonal centrada: 0.74
- * Cúbica de face centrada: 0.74
- * Cúbica de diamante: 0.34



Cúbica de corpo centrado



Cúbica de face centrada



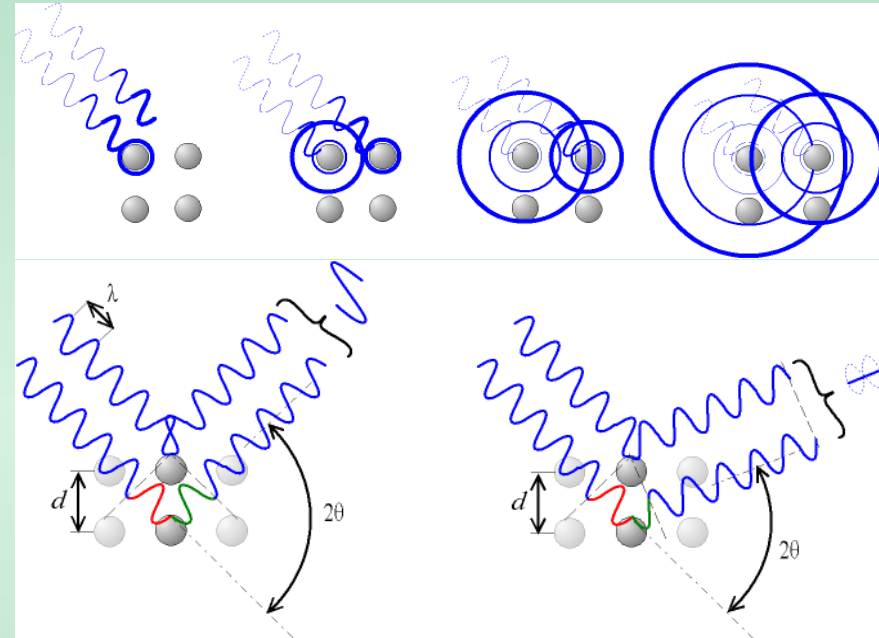


- **Métodos modernos de cristalografia dependem à análise dos padrões de difração obtidos da amostra que é exposta a um tipo de feixe**
- **O feixe pode ser:**
 - Radiação eletromagnética (método de difração de raios X)
 - Elétrons (método de difração de elétrons)
 - Nêutrons (método de difração de nêutrons)
- **O três tipos de radiação interagem com espécimen em maneiras diferentes:**
 - Raios X interagem com a distribuição espacial dos elétrons de valência
 - Elétrons são partículas com carga e assim são sensíveis à distribuição total de carga tanto de núcleos de átomos como de elétrons circundantes.
 - Nêutrons são espalhados pelos núcleos de átomos através das
 - Interações fortes nucleares
 - Campos magnéticos dos núcleos/elétrons por causa de momento magnético dos nêutrons não ser zero. Nêutrons espalhados por materiais contendo hidrogênio, os padrões da difração contêm muito ruído (pode ser prevenido em materiais deuterados)



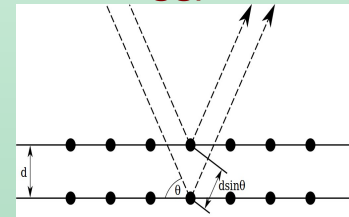
Difração – lei de Bragg

- Quando raios X interagem com um átomo, produzem um movimento de nuvens de elétrons (como qualquer onda eletromagnética)
- O movimento destas cargas rerradia ondas com a mesma frequência – espalhamento elástico ou de Rayleigh
- Processo similar ocorre em espalhamento de ondas de nêutrons pela interação com núcleos ou com spin coerente de um elétron desaparelhado
- As ondas re-emitidas interferem entre si ou construtivamente (somando-se vetorialmente) ou destrutivamente (subtraindo-se) produzindo um padrão da difração em um detector ou filme.
- O padrão da difração (interferência de ondas) resultante seve como base para análise difracional.
- Comprimento de ondas tanto de nêutrons como dos raios X são comparáveis com as distâncias entre átomos (~150 pm) => sondas excelentes para estas escalas.



- Interferência construtiva (Lei de Bragg):

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$



- n = ordem do raio difratado
- λ = comprimento de onda
- d = distância entre planos da rede cristalina
- θ = ângulo entre a onda incidente e planos de rede cristalina



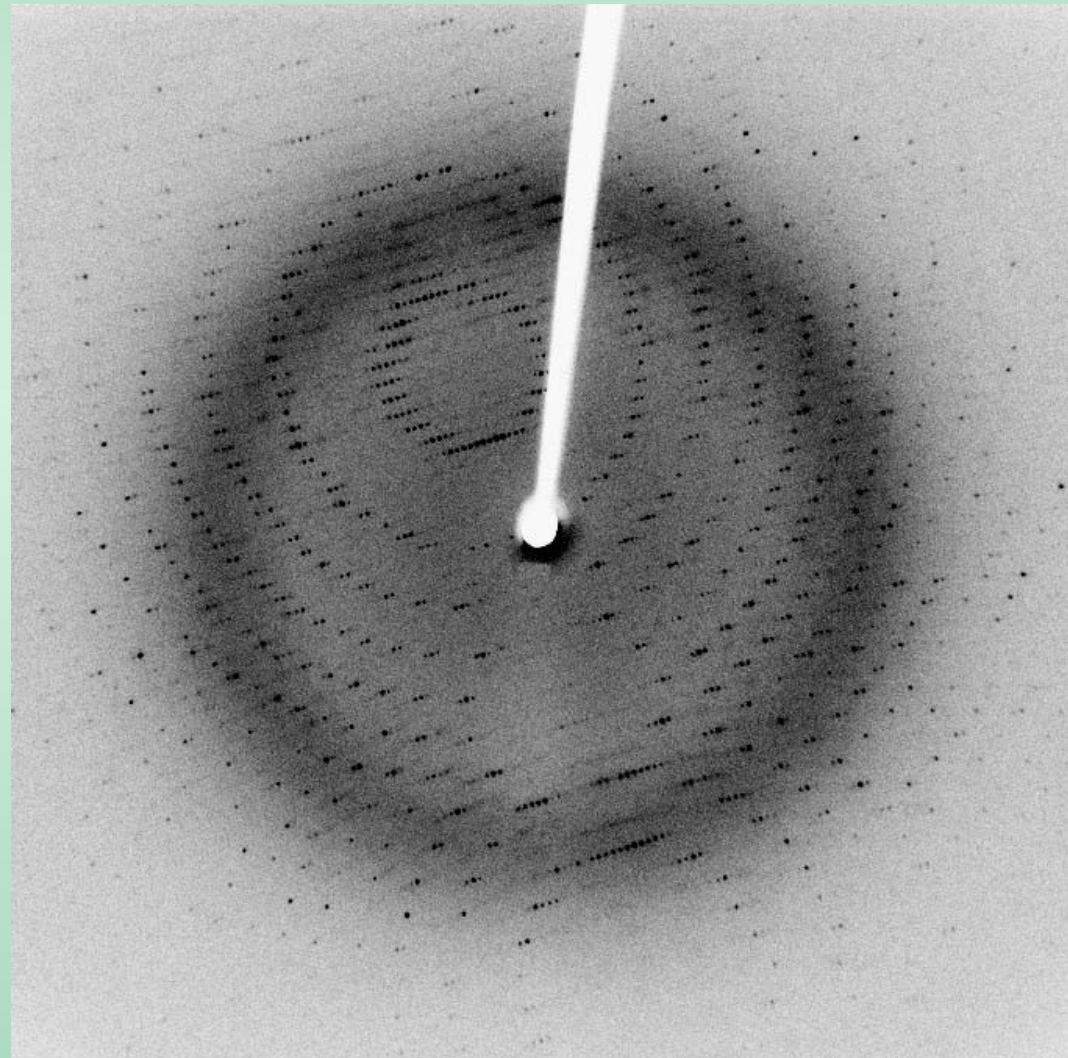
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Difração – lei de Bragg

Cristalografia

- Pela lei de Bragg, cada ponto (ou reflexão) nesse padrão da difração forma-se da interferência construtiva dos raios X que passaram pelo cristal. Os dados podem ser usados para determinar a estrutura atômica do cristal.





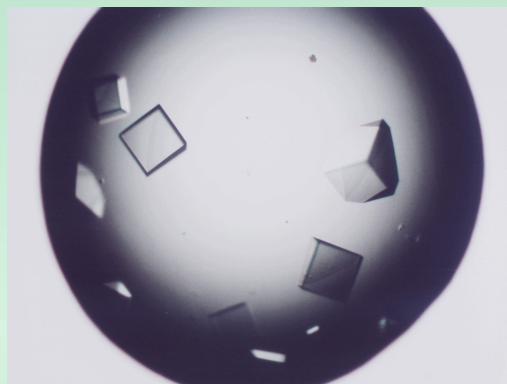
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Cristalografia de proteínas

Cristalografia

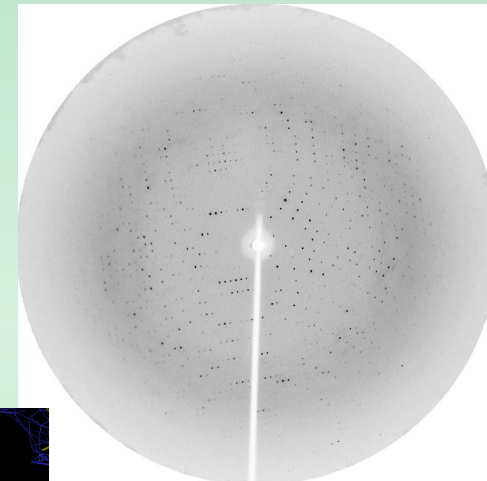
➤ Cristalização



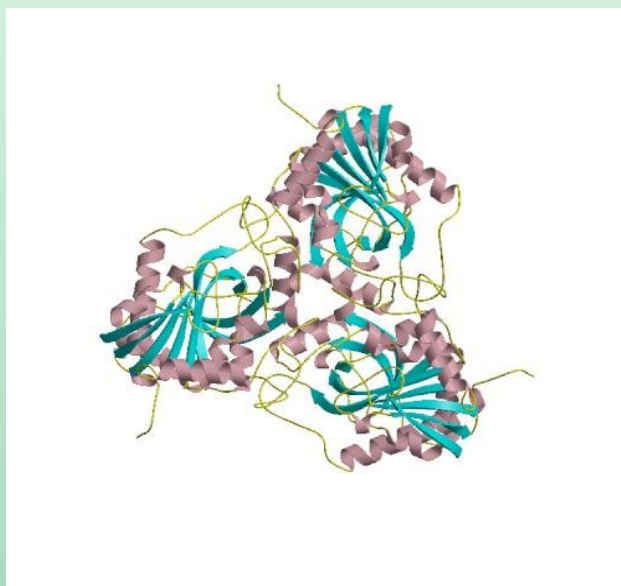
➤ Coleta de dados (LNLS)



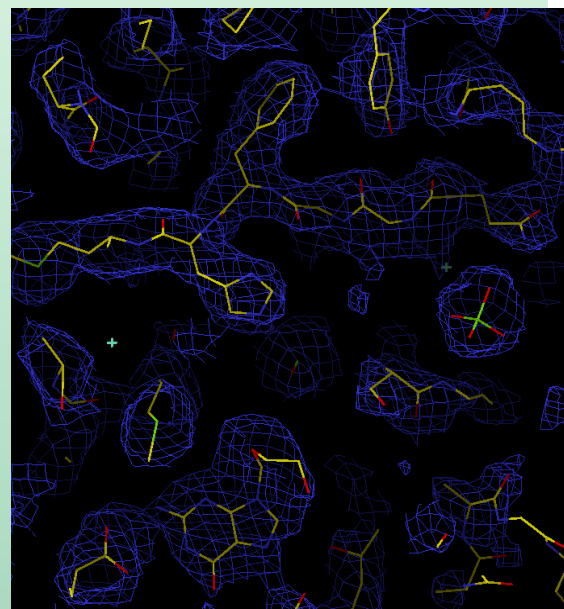
➤ Difração de raios X



➤ Resolução da estrutura cristalográfica



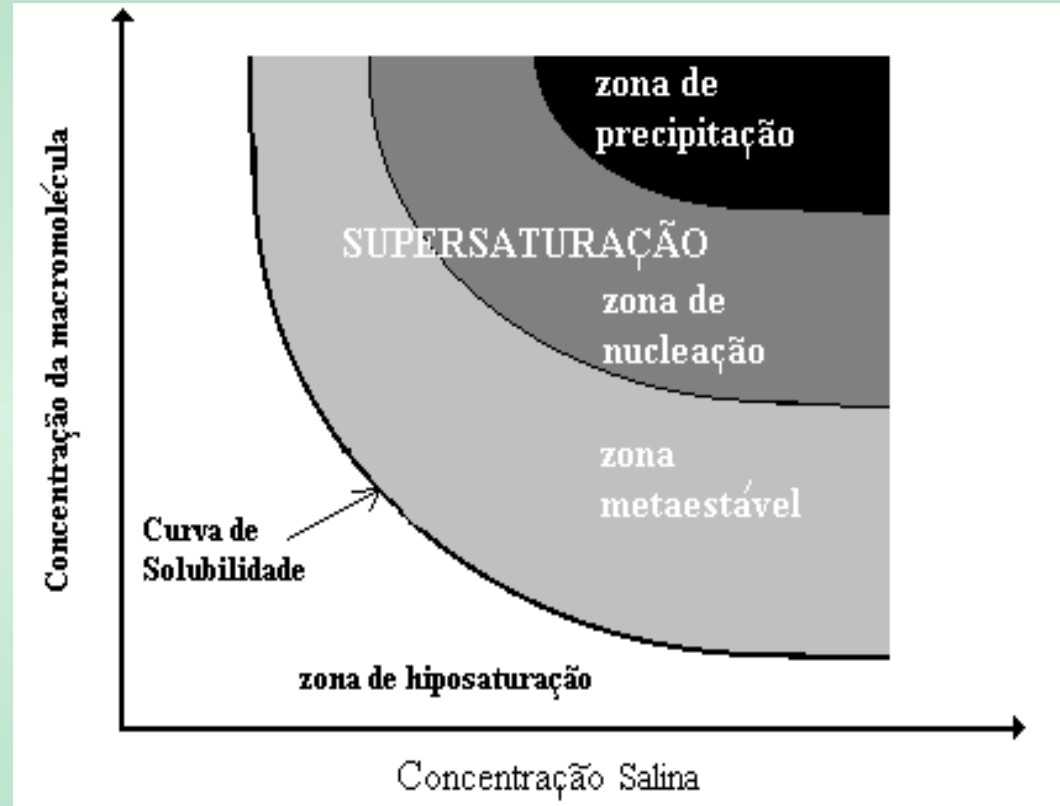
➤ Análise





Cristalização

- Para cristalização de uma proteína (ou DNA), é necessário trazê-la a um estado de supersaturação.
- Uma proteína dissolvida em um tampão será levada a formar cristais, quando as moléculas da proteína dissolvidas na solução estejam próximas umas das outras
- Inicialmente, a proteína se encontra na região de hipossaturação e aumentando a concentração salina ou da proteína vai trazê-la na região de supersaturação, de forma lenta
- Na região de supersaturação, inicia-se o aparecimento dos primeiros núcleos cristalinos.
- Esses microcristais servirão de base para o crescimento de cristais maiores, adequados para experimentos de difração de raios X.





Cristalização

- O processo de cristalização da proteína normalmente deve ser lento
- Considerando-se a proteína inicialmente numa região abaixo da curva de solubilidade (zona de hiposaturação).
- A proteína pode ser levada a região de supersaturação por:
 - Aumento da concentração salina
 - Aumento da concentração da proteína
- Na região de supersaturação, as moléculas da proteína ficam próximas umas das outras → em casos favoráveis, promoverá o aparecimento dos primeiros núcleos cristalinos.





Cristalização

- Para cristalização de proteínas é normalmente usado o método de difusão de vapor.
- Uma gota de proteína é colocada sobre uma lamínula. Nessa gota adiciona-se uma solução contendo agente precipitante
 - Sal
 - polietileno glicol (PEG).
- A lamínula é colocada sobre um poço, onde há também a solução do precipitante.
- Nesse sistema fechado ocorrerá difusão de moléculas de água da gota para o poço, levando a proteína, em casos favoráveis, a um estado de supersaturação, que pode levar à formação dos primeiros núcleos cristalinos.

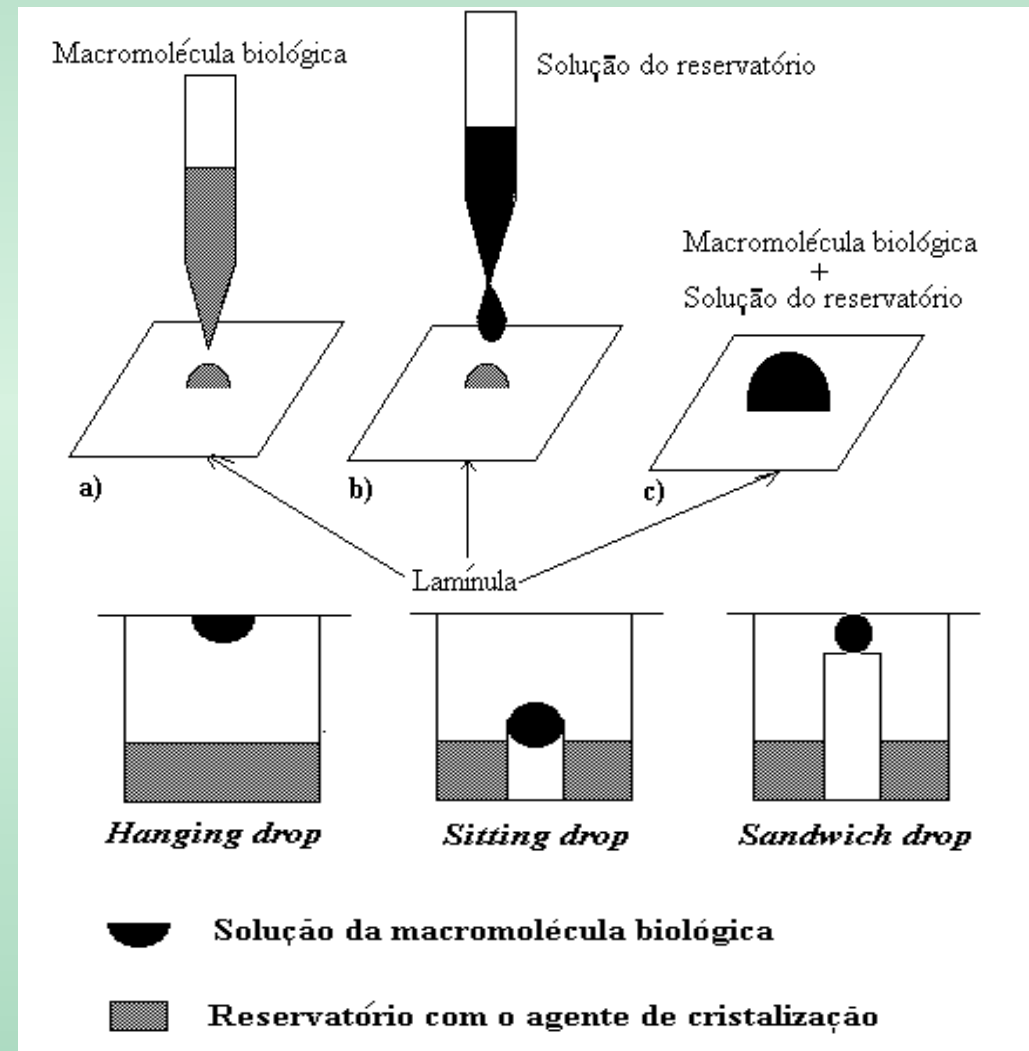




Cristalização

➤ montagem de uma gota de cristalização:

- 1-2 μ l da solução da macromolécula biológica sobre a lamínula de vidro
- Adiciona-se 1-2 μ l da solução do reservatório à gota com a solução da macromolécula biológica.
- Para modificar as condições de difusão do vapor de água da gota para o poço, a gota de mistura pode ser acomodada de várias maneiras:
 - Gota suspensa
 - Gota assentada
 - Gota em sanduíche
- Estas maneiras podem favorecer o aparecimento de cristais de proteína.





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Cristalização

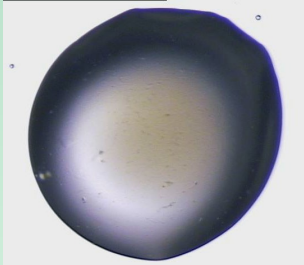
Cristalografia

- Um dos sistemas usados para cristalização de proteínas é a placa linbro com 24 poços que permite testar diversas condições de cristalização. As lamínulas são colocadas sobre cada um dos poços, e vedadas com graxa de vácuo.

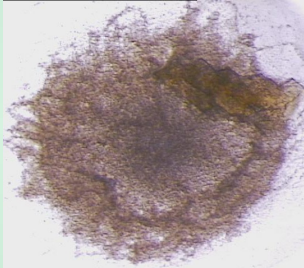




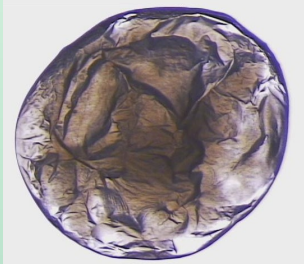
Cristalização – exemplos



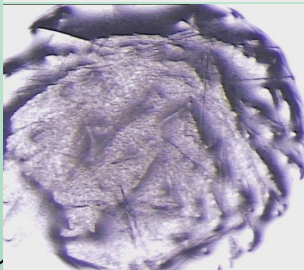
- Proteína ainda solúvel – ausência de qualquer sólido na gota. A proteína ainda pode cristalizar bem. As vezes a proteína desnatura antes de precipitar que resulta em perda do cor de algumas proteínas (mioglobina)



- Um exemplo de precipitação, onde a concentração de sais poderia ser muito alta, causando a separação de proteína do solvente no modo aleatório. Resultado mais observado que prova a escolha errada da solução do poço



- Precipitados gelatinosos observados em gotas suspensas. Nesse caso, a proteína não é muito solúvel em solução usada nem precipita completamente. A formação do gel não exclua a formação de cristais que podem crescer em cima do gel



- Precipitado cristalino – não tem cristais individuais mas precipitado é mais cristalino do que gel.



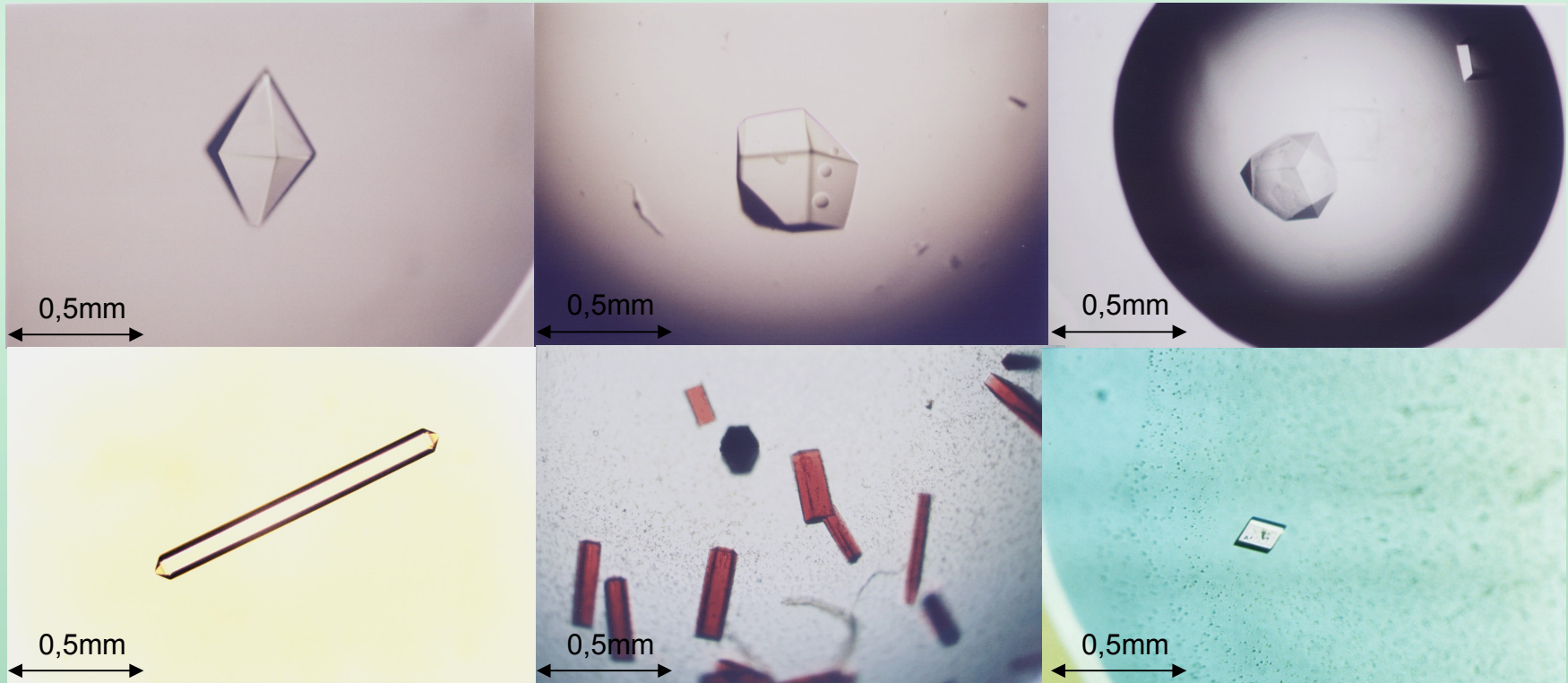
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Cristalização – exemplos

Cristalografia

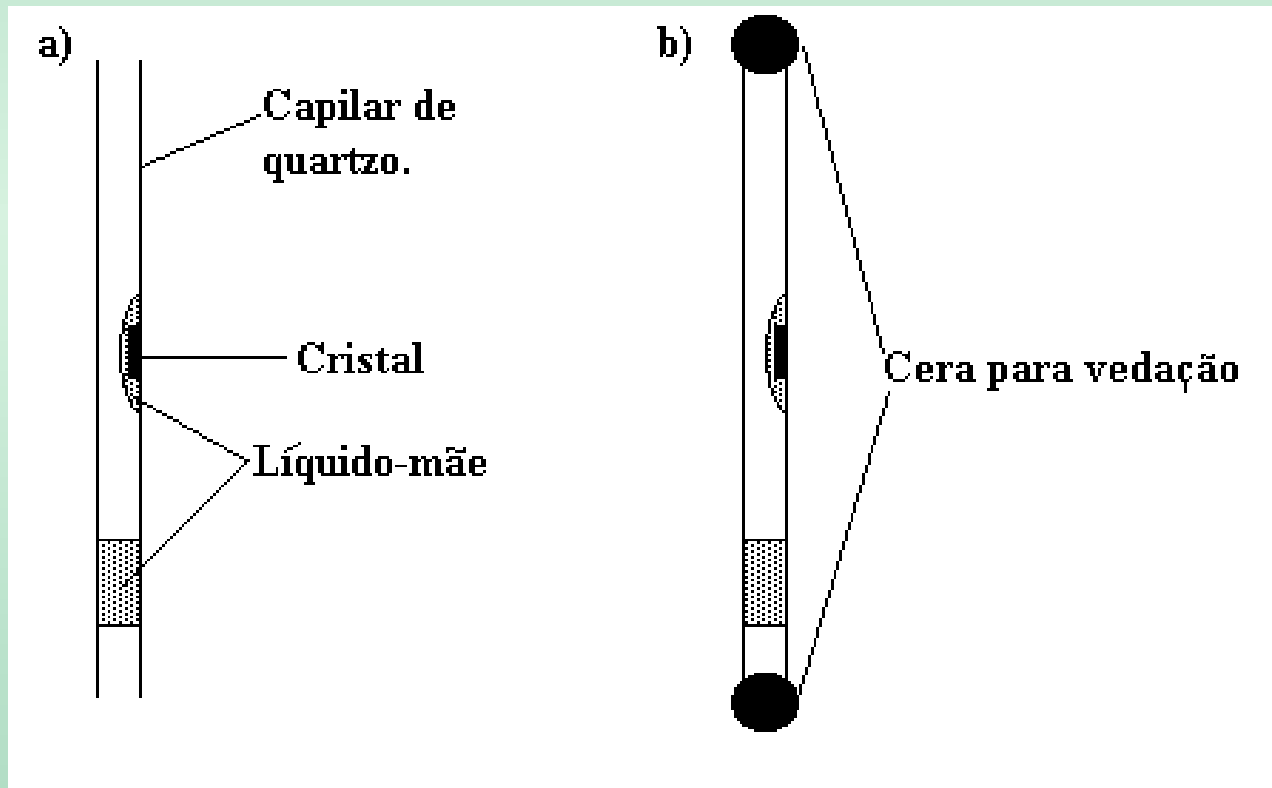
- Caso que as condições salinas, concentração da proteína, a velocidade de evaporação e temperatura sejam encontradas, cristais individuais de proteína aparecem na gota





Montagem do cristal

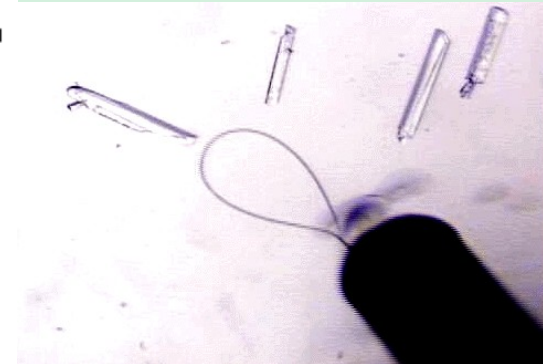
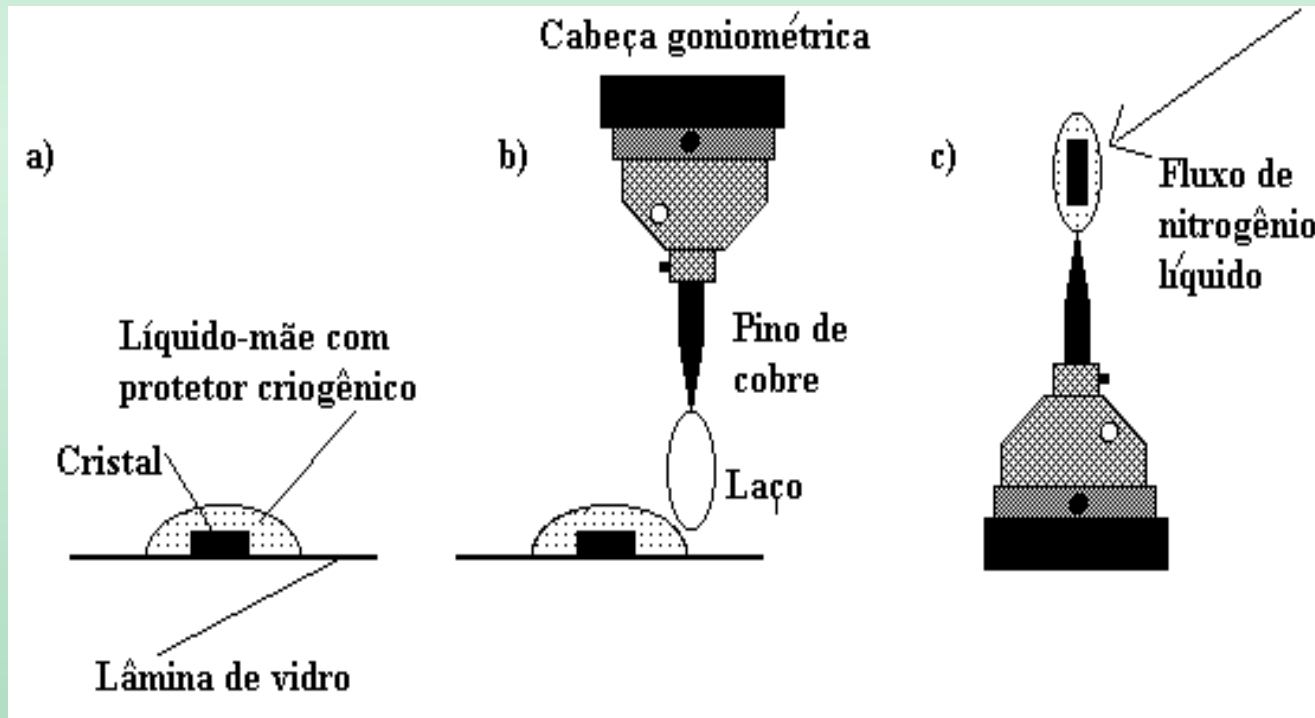
➤ Antes de análise por raios X, o cristal tem que ser montado num suporte





Criocristalografia

- Outra maneira de montar o cristal é capturar ele com um pouco de solução num laço de Nylon e congelar com fluxo de nitrogênio líquido





Obtenção de padrões

- Amostra congelada é colocada no raio X para coletar o padrão de difração. A imagem mostra a câmara experimental com linha de raio 9-2 (Stanford Synchrotron). No meio em baixo se encontra *charged-couple device* (CCD) detector, acoplado a TV câmera com tela fosforescente que captura e grava os padrões da difração. Captura de dados no filme de raios X é relativamente difícil e pouco se usa.
- Métodos computacionais fazem muita autoindexação e aproximação matemática antes de determinar a qualidade do resultado. Os resultados bons têm mapa de alta resolução ($<2 \text{ \AA}$) da estrutura
- Métodos diferentes da análise de difração tem que ser empregados para que a estrutura pode ser realmente resolvida, especialmente para cristais de macromoléculas.





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Síncrotron

Cristalografia





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Síncrotron

Cristalografia

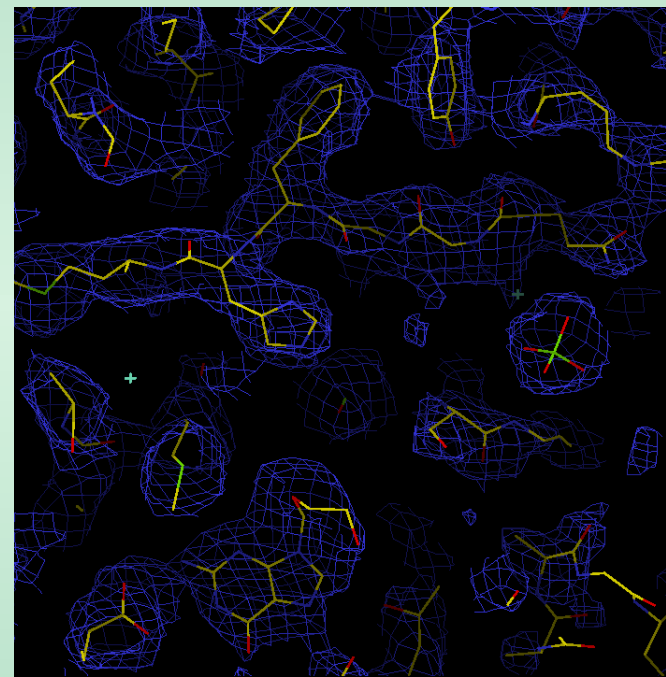
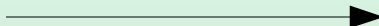
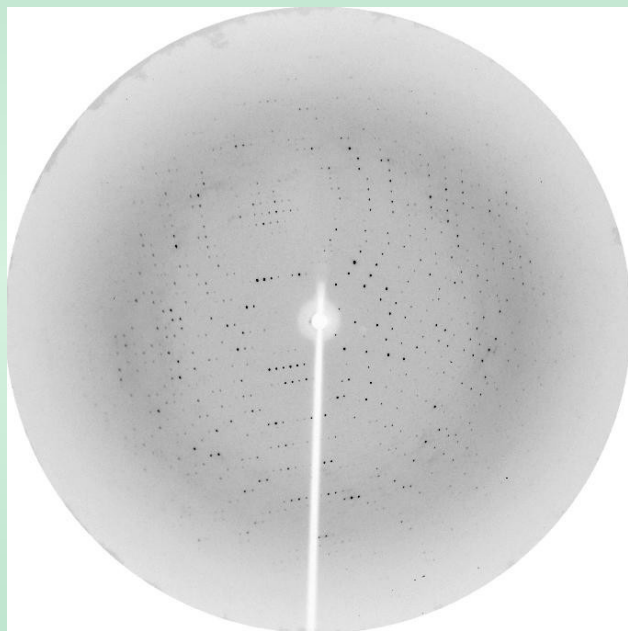
➤ Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas





Resolução do problema da fase

- O padrão da difração é usado para calcular a densidade eletrônica pela transformação de Fourier inversa



$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp(i\alpha) \exp(2\pi i(hx + ky + lz))$$

- ρ = densidade eletrônica; F = fator estrutural; hkl = triplete de índices de Miller, i = intensidade do sinal

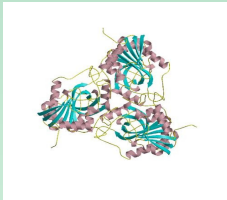


Resolução do problema da fase

- Em um experimento típico de difração de raios X:
 - temos o registro das intensidades para cada reflexão hkl ,
 - sabemos que a intensidade de cada reflexão $I(hkl)$ é proporcional ao módulo do fator de estrutura
- Contudo, nenhuma informação sobre a fase pode ser obtida diretamente do experimento de difração de raios X. Para o cálculo da função densidade eletrônica é necessário do termo de fase.
- A solução da fase é chamada solução do problema da fase. Existem vários métodos:
 - Substituição isomórfica múltipla (MIR)
 - Substituição molecular
 - Dispersão anômala múltipla
 - Métodos diretos



Refinamento cristalográfico



$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)$$

Fator de espalhamento

REMARK Written by O version 5.10.2

REMARK Sun Feb 25 14:05:51 1996

REMARK Walter F. de Azevedo Jr.

CRYST1	72.307	73.069	54.284	90.00	90.00	90.00				
ORIGX1	1.000000	0.000000	0.000000			0.000000				
ORIGX2	0.000000	1.000000	0.000000			0.000000				
ORIGX3	0.000000	0.000000	1.000000			0.000000				
SCALE1	0.013830	0.000000	0.000000			0.000000				
SCALE2	0.000000	0.013686	0.000000			0.000000				
SCALE3	0.000000	0.000000	0.018422			0.000000				
ATOM	1	CB	MET	1	103.933	112.272	94.782	1.00	50.37	6
ATOM	2	CG	MET	1	104.548	112.540	96.126	1.00	55.72	6
ATOM	3	SD	MET	1	106.336	112.671	95.934	1.00	62.79	16
ATOM	4	CE	MET	1	106.542	114.250	95.159	1.00	54.71	6
ATOM	5	C	MET	1	103.199	114.420	93.762	1.00	47.20	6
ATOM	6	O	MET	1	102.995	114.577	92.561	1.00	51.55	8
ATOM	7	HT1	MET	1	102.092	112.026	92.841	1.00	0.00	1
ATOM	8	HT2	MET	1	100.857	112.905	93.606	1.00	0.00	1
ATOM	9	N	MET	1	101.710	112.330	93.759	1.00	48.54	7
ATOM	10	HT3	MET	1	101.467	111.494	94.328	1.00	0.00	1
ATOM	11	CA	MET	1	102.732	113.140	94.479	1.00	47.79	6
ATOM	12	N	GLU	2	103.906	115.275	94.503	1.00	44.44	7
ATOM	13	H	GLU	2	104.333	114.933	95.316	1.00	0.00	1
ATOM	14	CA	GLU	2	104.085	116.695	94.178	1.00	40.49	6
ATOM	15	CB	GLU	2	104.531	117.459	95.428	1.00	43.49	6
ATOM	16	CG	GLU	2	103.464	117.597	96.515	1.00	52.62	6

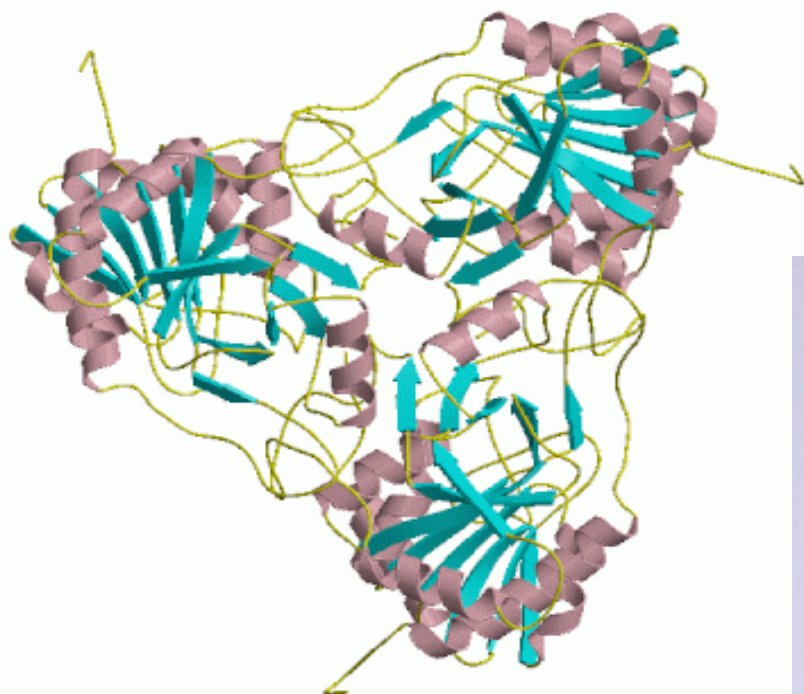


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Enzima resolvida

Cristalografia



Purina Nucleosídeo Fosforilase
(PNP, EC 2.4.2.1) com
resolução em 0,5 Å.

