

## O Problema da Fase em Cristalografia

*Yvonne Primerano Mascarenhas*

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.  
e-mail: [yvonne@ifsc.usp.br](mailto:yvonne@ifsc.usp.br)

DOI: <https://doi.org/10.30609/jeti.v4i3.12613>

††

**Abstract.** This article presents some fundamental aspects of the discovery of X-rays and their use in crystallography in order to deduce the molecular and crystalline structure of solids despite the difficulty inherent in the lack of knowledge of the diffracted beam phases. The trial-and-error methods, the use of the Patterson function and the direct methods are presented.

*Keywords:* X-ray diffraction, X-ray scattering by atoms, molecular structure, crystalline structure, trial and error, Patterson, and direct methods.

†

**Resumo.** Este artigo apresenta alguns aspectos fundamentais da descoberta dos raios-X e da sua utilização em cristalografia visando a dedução da estrutura molecular e cristalina de sólidos apesar da dificuldade inerente ao desconhecimento das fases dos feixes difratados. São apresentados os métodos de tentativa e erro, de uso da função de Patterson e os métodos diretos.

*Palavras-chave:* difração de raios X, espalhamento de raios X por átomos, estrutura molecular, estrutura cristalina, tentativa e erro, Patterson, métodos diretos.

### 1. Introdução histórica

A descoberta acidental do raio X por Roentgen em 1896 foi uma das mais intrigantes da história da Física. A hipótese ondulatória foi logo aventada pelo próprio Roentgen, mas várias tentativas para verificá-la foram infrutíferas. Roentgen para verificar a veracidade dessa hipótese tentou realizar experimentos usando as redes de difração de que dispunha e,

mesmo com as de menor espaçamento entre os sulcos, não conseguiu verificar a difração da radiação emitida através do tubo de Crooks de seu experimento. Por essa razão denominou-a raio X. Não obstante, o fato de ser uma radiação penetrante capaz de atravessar o interior do corpo humano levou imediatamente ao seu uso em Radiologia.

*Foi principalmente por essa descoberta que Roentgen recebeu o primeiro Prêmio Nobel em Física, outorgado em 1901.*

### **1a - Acontecimentos em Munique, Alemanha**

Estava ainda o problema sem solução quando em Munique, Alemanha, trabalhavam vários cientistas como professores e pesquisadores, entre os quais:

- P.H.R.von Groth, cristalógrafo e mineralogista que em 1883 se torna Diretor do Instituto de Mineralogia da recém fundada Universidade de Munique. Ele era uma das maiores autoridades em Mineralogia e Cristalografia de sua época.
- W.C. Roentgen, aceita em 1900 o convite para ocupar o cargo de Professor Titular de Física da Faculdade de Filosofia da Universidade de Munique e diretor do seu Instituto de Física Experimental.
- A.J.W. Sommerfeld, em 1906 torna-se diretor do recém estabelecido Instituto de Física Teórica da Universidade de Munique. Sommerfeld realizou sua tese em 1895 sob orientação de F. Klein sob o tema Física da Difração.
- M. von Laue, em 1909 vai para Munich como Livre Docente do Instituto de Física Teórica dirigido por Sommerfeld.
- P. Ewald, estudante de Sommerfeld, inicia seu trabalho de tese no estudo da propagação de ondas eletromagnéticas em um meio constituído por uma distribuição periódica de dipolos elétricos.
- W. Friedrich, obteve seu PhD em 1911 no Instituto de Roentgen e foi nomeado assistente de Sommerfeld entre 1911 e 1914.
- P. Knipping, estudante de doutoramento no Instituto dirigido por Roentgen na Univ. de Munique.

A inspiração de Laue para a realização de sua famosa experiência de difração de raios X por um cristal está muito bem analisada por Andre Authier em vários capítulos de seu livro "Early Days of X-ray Crystallography [1] , como tendo ocorrido a partir de uma entrevista pedida por Ewald a Laue em janeiro de 1912 com o intuito de discutir seu trabalho de tese. O tema proposto por Sommerfeld a Ewald para sua tese era ao estudo de como uma onda eletromagnética interage com um sistema tridimensional de dipolos elétricos dispostos

periodicamente no espaço. O interesse de Laue na discussão aumenta quando Evald menciona que o espaçamento que ele estava atribuindo entre os dipolos era muito pequeno, bem menor que o do comprimento de onda da região do espectro da luz visível. Foi essa informação que inspirou a Laue a brilhante hipótese de que um cristal poderia difratar raio X, cujo comprimento de onda ele já havia concluído experimentalmente que deveria ser bem menor que o da região visível.

Laue, depois de convencer Sommerfeld a permitir o experimento, encarrega o estudante W. Friedrich de realizá-lo. Devido a seu próprio interesse e à sua competência como físico experimental, P. Knipping se junta W. Friedrich e, de acordo com conselho de von Groth, selecionam uma amostra monocristalina de sulfato de cobre para alvo do feixe de raios X.

O feliz resultado do experimento mostrou claramente que o raio X era uma onda eletromagnética que deveria seguir as mesmas equações de difração que qualquer outra onda. Levando em conta que a periodicidade no cristal deveria ser tridimensional, Laue escreve as três equações que fornecem as condições de difração segundo três direções mutuamente perpendiculares e que passaram a ser conhecidas como Equações de Laue que apresentamos abaixo:

$$\begin{aligned} a(\cos\psi_1 - \cos\Phi_1) &= h\lambda \\ b(\cos\psi_2 - \cos\Phi_2) &= k\lambda \\ c(\cos\psi_3 - \cos\Phi_3) &= l\lambda \end{aligned}$$

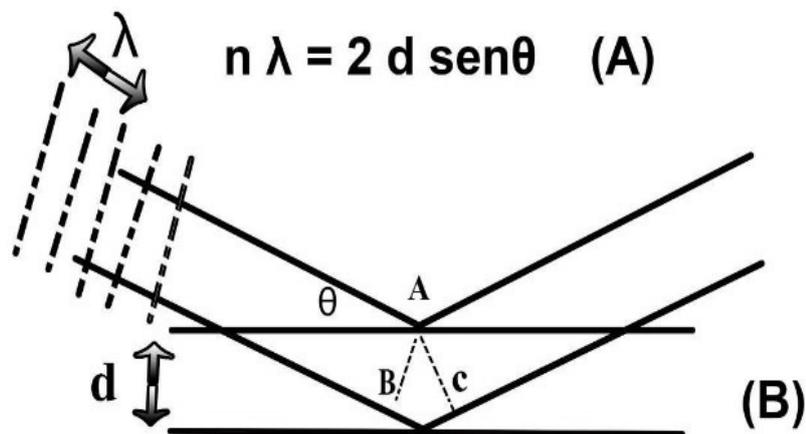
onde  $a$ ,  $b$ , e  $c$  são os valores hipotéticos da periodicidade do retículo tridimensional e  $h$ ,  $k$ , e  $l$  são números inteiros que correspondem às ordens de difração em cada direção.

*Devido à descoberta da natureza ondulatória dos raios X von Laue recebeu o prêmio Nobel em Física em 1912.*

### **1b – Acontecimentos em Leeds, UK**

W.H. Bragg e seu filho W.L. Bragg voltaram para a Inglaterra depois de viverem por muito tempo na Austrália e se fixaram em Leeds onde W.H. Bragg fora nomeado professor. A notícia da difração de raios por cristais logo chega a eles através de uma carta de Lars Vegard, que estivera em Leeds por alguns meses, mas que se transferira para Universidade de Wurzburg onde teve a oportunidade de assistir uma conferência proferida por Laue. Nessa carta Vegard descreve detalhadamente os resultados apresentados por Laue. Tanto Bragg pai como filho tentam interpretar os resultados de Laue e realizam experiências para melhor entenderem o fenômeno e acabam chegando a conclusões definitivas sobre a natureza

ondulatória dos raios X e a estrutura dos cristais baseada no conceito de retículo cristalino, proposto pelo Abé Hauy em *Traité de minéralogie* (1801). W.L. Bragg fez então a proposta de que os átomos ou moléculas de um cristal deveriam se localizar na cela unitária e repetidos tridimensionalmente em todo o retículo. Bragg então dá a sua versão da origem dos feixes difratados como devidos à difração por cada família de planos reticulares periódicos com espaçamento  $d$ , sendo a intensidade de cada feixe difratado dependente do número de átomos contidos em cada plano. De acordo com essa concepção ele deduziu a equação mostrada na Fig. 1, que leva o seu nome, onde  $n$  é a ordem de difração,  $\lambda$  é o comprimento de onda do raio X,  $d$  é a distância interplanar da família de planos reticulares paralelos que estão causando essa particular difração e  $\theta$  o ângulo de difração.



**Figura 1** Lei de Bragg e representação da difração por uma família de planos reticulares paralelos.

### Espectroscopia e Difração de raio X

As aplicações da difração de raios X são assim iniciadas na Inglaterra respectivamente por W.H. Bragg criando a espectroscopia de raios X, que permite caracterizar quais são os elementos constituintes de uma amostra, e por W.L. Bragg criando a cristalografia por difração de raios X que, em princípio deveria permitir a determinação das estruturas cristalinas e moleculares dos materiais.

### 1c. Conceitos e metodologias para a determinação das primeiras estruturas

#### 1c.1 Determinação da dimensão da cela unitária a partir da densidade e dados do difratograma.

A densidade é dada por:

$$\rho = \frac{nM}{V}$$

Permitindo calcular o volume  $V$  e  $\text{cm}^3$

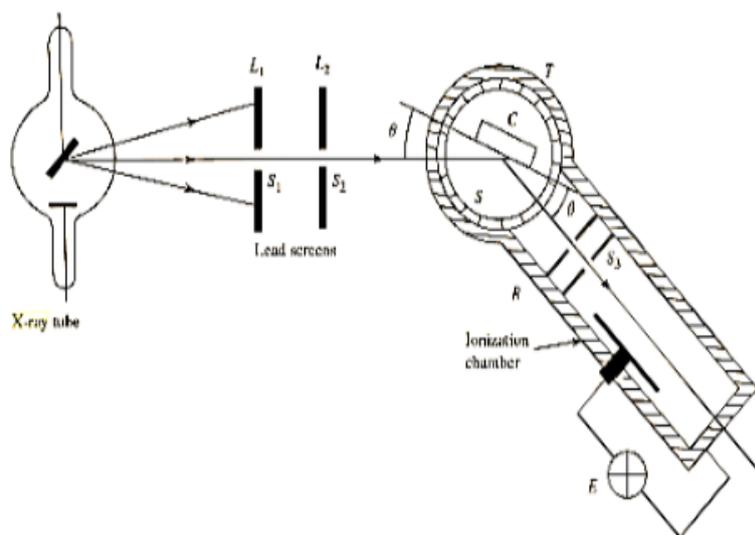
$$V = \frac{nM}{\rho N}$$

ou  $v$  em  $\text{\AA}^3$

$$v = \frac{10nm}{6,023} \quad \text{Eq. 1}$$

onde  $n$  é o número de moléculas na cela unitária,  $M$  é a massa molecular em gramas,  $m$  é a massa molecular em unidades atômicas de massa,  $N$  é o número de Avogadro,  $V$  o volume do cristal em  $\text{cm}^3$  e  $v$  é o volume da cela unitária em  $\text{\AA}^3$ .

Aplicando-se a equação ao caso do NaCl, que cristaliza no sistema cúbico, temos massa molecular igual a 58,44 g/mol, densidade igual a 2,16g/cm<sup>3</sup> e, considerando-se apenas uma molécula por cela unitária, resulta o valor  $v = 209,58 \text{\AA}^3$  e  $a = 6,0 \text{\AA}$ . Esse resultado revela que a distância entre os átomos no retículo cristalino deveria ser de cerca de 3,0  $\text{\AA}$ . Logo esse valor dá a ordem de grandeza do comprimento de onda do raio X. Aplicando-se esse raciocínio a outros cristais obtém-se resultados sempre da mesma ordem de grandeza. Com essas informações W. H. Bragg criou o espectrômetro de raios X usando um cristal como uma rede de difração para registrar o espectro produzidos pelo anodo metálico de um tubo de Crooks e uma câmara de ionização para medir as suas intensidades de forma análoga à de um goniômetro ótico. Ele criou assim a espectroscopia de raios X.



**Figura 2.** O espectrômetro de Bragg. Obtida de <https://www.ques10.com/p/14345/explain-analysis-of-crystal-structure-using-braggs/>

Os dados espectroscópicos relativos à produção de raios X por diferentes metais anódicos levou à constatação da existência de uma radiação contínua até uma certa voltagem

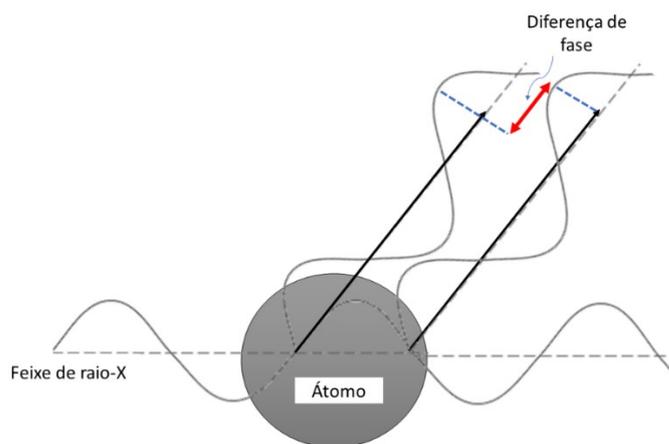
crítica de aceleração dos elétrons quando surgem raios características cujos comprimentos de onda são fixos variando apenas sua intensidade quando se aumenta a voltagem de aceleração dos elétrons. Estas observações levaram ao entendimento da estrutura eletrônica dos átomos de acordo com a teoria dos níveis quânticos de energia dos elétrons no átomo.

Por outro lado, seu filho W.L. Bragg cria a Cristalografia por Difração de Raios X usando o método de Laue onde um feixe colimado proveniente do tubo de Crooks incide sobre o cristal estacionário em estudo e a difração é registrada fotograficamente por um filme colocado perpendicular ao feixe. A fim de obter mais informações vários difratogramas foram obtidos alinhando o cristal ao longo de suas direções principais. Estas medidas revelaram não apenas os planos cristalográficos paralelos às faces do cristal mas também a difração pelas famílias de planos do retículo cristalino. Os primeiros cristais estudados foram halogenetos alcalinos cúbicos e seu parâmetro reticular estimado usando suas densidades como já mostrado em 1.c.1. A simetria cristalográfica, já conhecida pelas medidas por goniometria ótica, foi confirmada nos difratogramas. A estrutura cristalina foi determinada por W. L. Bragg posicionando os átomos admitindo que eles deveriam se situar nas interseções dos planos reticulares correspondentes às reflexões mais intensas.

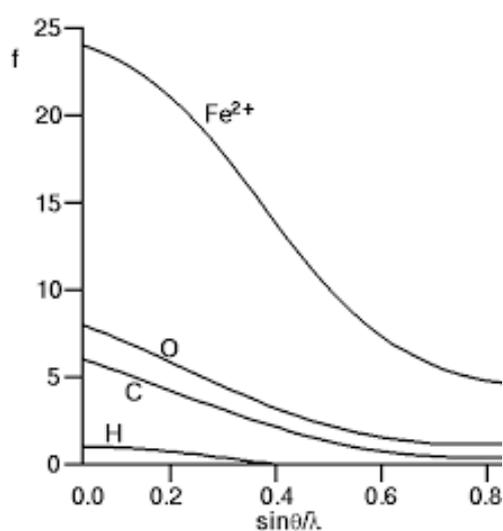
### **1.c.2 Espalhamento de raios x por um átomo**

Levando-se em conta que os raios X são espalhados principalmente pelos elétrons constituintes de cada átomo chega-se à conclusão, conforme se vê na Fig. 2, de que a amplitude da onda espalhada por um átomo é função das diferenças de caminho ótico percorridas pelas ondas espalhadas por cada elétron e deve decair com o ângulo de espalhamento. Define-se assim o fator de espalhamento atômico  $f$  como:

$$f = \frac{\textit{amplitude da onda espalhada pelo átomo}}{\textit{amplitude da onda espalhada por um elétron}}$$



(a)



(b)

**Figure 3.** Espalhamento de raios X pelos elétrons dos átomos

Como se vê na Figura 3a a intensidade espalhada por um átomo depende do espalhamento produzido por cada um dos seus elétrons, é evidente que haverá uma diferença de fase entre as ondas o que implica que apenas na direção do feixe incidente todas as ondas se somam em fase. De acordo com a definição dada na equação 2 temos, como se vê na Fig. 3b, que  $f$  tem seu valor máximo quando  $\theta$  é igual a zero pois todos os elétrons espalham em fase e seu valor é igual ao número de elétrons do átomo.

### 1.c.3 Difração pelos átomos e moléculas num cristal

Os cristais são caracterizados por sua simetria e pela sua cela unitária onde todos os átomos ocupam posições fixas dadas pelas respectivas coordenadas medidas em relação ao

referencial fornecido pelas direções e tamanhos de suas arestas. Entretanto todos os átomos executam vibrações térmicas em torno de seu centro de gravidade com amplitudes que dependem da temperatura em que se faz a experiência de difração. Este fenômeno implica em aumentar o raio do átomo e assim aumentar as diferenças de fase e conseqüentemente diminuir a amplitude espalhada. Assim podemos escrever a amplitude espalhada por todos os átomos da cela unitária como

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j (hx_j + ky_j + lz_j) \quad \text{Eq. 2}$$

Onde  $(hkl)$  se refere aos índices de Miller da família de plano paralelos que está difratando,  $f$  é o fator de espalhamento do átomo  $j$  e  $xyz$  suas coordenadas relativas aos parâmetros  $a, b, c$  da cela unitária.

Se, em vez de considerarmos a distribuição discreta de átomos, considerarmos a função de distribuição da densidade eletrônica na cela unitária  $\rho_{xyz}$  podemos expressar a amplitude da onda espalhada, em cristalografia denominada Fator de Estrutura, pela família de planos paralelos  $(hkl)$  como

$$F_{hkl} = \iiint_{0,0,0}^{a,b,c} \rho_{xyz} e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)} dx dy dz \quad \text{Eq. 3}$$

Em ambos os casos o resultado representa uma onda dada por:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} \quad \text{Eq. 4}$$

Com suas componentes amplitude  $|F_{hkl}|$  e fase  $\phi_{hkl}$  e que pode ser expressa nas componentes reais e imaginárias como:

$$F = A + iB$$

Dadas respectivamente por:

$$A_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j \left( \cos 2\pi (hx_j + ky_j + lz_j) \right) \quad \text{Eq. 5}$$

$$B_{hkl} = \sum_{j=1}^N i f_j \left( \sin 2\pi (hx_j + ky_j + lz_j) \right) \quad \text{Eq. 6}$$

Um resultado interessante é que no caso de estruturas centro simétricas temos que tudo que estiver em  $x, y, z$  terá que existir obrigatoriamente em  $-x, -y, -z$  e conseqüentemente  $B_{hkl}$  será nulo e as fases serão zero ou  $\pi$ .

Assim, à primeira vista, pareceria que a obtenção da estrutura descrita pela densidade eletrônica seria facilmente obtida através do cálculo da densidade eletrônica.

$$\rho_{xyz} = \sum_{hkl} F_{hkl} e^{-i\phi_{hkl}}$$

Entretanto, as medidas experimentais são as intensidades dos feixes difratados que são dadas pelo quadrado do fator de estrutura  $F_{hkl}$

$$I_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} |F_{hkl}| e^{-i\phi_{hkl}} \quad \text{Eq. 7}$$

E o resultado é

$$I_{hkl} = |F_{hkl}|^2 \quad \text{Eq. 8}$$

Que mostra que ao medirmos a intensidade apenas temos conhecimento do módulo da amplitude e perdendo-se o conhecimento da fase de cada feixe difratado. *Esse é o Problema da Fase*. Este fato já havia sido antecipado por Laue em uma palestra que ele proferiu em 1913 durante a 85ª Reunião de Cientistas Alemães em Viena, Áustria.[2]

## 2. Avanços experimentais e teóricos

Nos primórdios da cristalografia por difração de raios X várias estratégias foram usadas para contornar a dificuldade imposta pelo problema da fase. Para tanto recorria-se aos conhecimentos já existentes sobre a simetria de monocristais obtida por meios de goniometria ótica, tais como classe e grupo pontual além do provável conteúdo da cela unitária (Eq. 1). A confirmação destes dados nas imagens obtidas pelo método de Laue mostravam a validade do uso da difração de raios X no estudo de cristais e reforçavam a hipótese proposta por W.L. Bragg de que os átomos deveriam se situar nos planos reticulares correspondentes às reflexões com maiores intensidades e assim deveriam permitir a sua localização na cela unitária.

### 2.1 Uso de radiação monocromática

Os conhecimentos espectroscópicos originados por W. H. Bragg levaram à possibilidade de selecionar um feixe de raios X monocromático para a obtenção de difratogramas permitindo a medida das intensidades de forma muito mais precisa.

Os resultados iniciais foram obtidos usando valores aproximados do comprimento de onda e foram utilizados até 1925 quando A. H. Compton e R. L. Doan utilizando uma rede de difração metálica especular com uma série de ranhuras paralelas com 20  $\mu\text{m}$  de espaçamento [1] e um feixe de raio X incidente rasante conseguem obter com precisão os comprimentos

de onda do espectro de raios X de vários tipos de anodos. Dessa forma as medidas dos parâmetros reticulares dos cristais em estudo puderam ser calculadas de forma muito mais precisa.

## **2.2 Registro dos difratogramas**

A criação de câmaras cilíndricas com o cristal situado no eixo do cilindro e com possibilidade de girar ou oscilar ao redor desse mesmo eixo e com o feixe de raios X incidente perpendicular ao eixo de rotação levou à possibilidade de registrar um grande número de reflexões a serem utilizadas na determinação da estrutura. A evolução desse método para a câmara de Weissenberg, que permitia deslocamento do filme, melhora a possibilidade de indexação das reflexões e a medida das intensidades.

## **2.3 O conceito de espaço recíproco**

A introdução do conceito de retículo recíproco por P. Evald contribuiu enormemente para a indexação das reflexões e o conhecimento do número máximo de reflexões passíveis de observação experimental com o comprimento de onda selecionado para a medida das intensidades.

## **2.4 Distribuição dos elétrons nos átomos fator de e espalhamento atômico**

Avanços na interpretação teórica de muitos efeitos experimentalmente encontrados levou à concepção de átomos com distribuição eletrônica ao redor do núcleo em substituição aos primeiros tratamentos como átomos pontuais.

### **2.4.1 Fatores de estrutura normalizados**

Uma consequência do decaimento do fator de espalhamento atômico com  $\theta$  é que o valor fator de estrutura é também decrescente em função do ângulo de espalhamento. Além disso a função de espalhamento do átomo decai ainda mais por efeito da vibração térmica dos átomos em torno de sua posição de equilíbrio na cela unitária de acordo com o seu fator de temperatura dado por;

$$T = \exp\left(-\frac{B \operatorname{sen}^2\theta}{\lambda^2}\right) \quad \text{Eq. 9}$$

Onde B é o fator de temperatura do átomo j em questão,  $\theta$  é o ângulo de difração e  $\lambda$  é o comprimento de onda.

Todos esses fatores devem ser levados em conta ao calcular as amplitudes ou intensidades dos feixes difratados. Em certos métodos de determinação de estrutura lança-se mão desses conhecimentos para calcular novas formas de fatores de estrutura corrigindo-se as intensidades observadas em termos do decaimento do fator de espalhamento dos átomos obtendo-se assim os chamados *fatores de estrutura normalizados*

$$|E_H|^2 = \frac{|F_H|^2}{\sum_{j=1}^N f_j^2} \quad \text{Eq. 10}$$

onde  $H = hkl$  e  $N$  é o número de átomos.

$$E_H = \frac{1}{\left(\sum_{j=1}^N f_j^2\right)^{\frac{1}{2}}} \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) \quad \text{Eq. 11}$$

Para uma estrutura com átomos iguais teremos:

$$\begin{aligned} E_H &= \frac{1}{(NZ^2)^{\frac{1}{2}}} Z \sum_{j=1}^N \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) \\ &= \frac{1}{N^{\frac{1}{2}}} \sum_{j=1}^N \exp (hx_j + ky_j + lz_j) \end{aligned} \quad \text{Eq. 12}$$

Alguns autores definem, com a mesma finalidade, o *fator de estrutura unitário*  $U$  como

$$|U_H| = \frac{|F_H|}{\sum_j f_j} \quad \text{Eq. 13}$$

para eliminar o decaimento das intensidades das reflexões devido ao fator de espalhamento atômico.

#### 2.4.2 Tratamento inicial dos dados

Existem alguns fenômenos que influenciam a intensidade dos feixes difratados entre os quais absorção, polarização e o fator de Lorentz. Como os dois últimos são função apenas do ângulo de reflexão de Bragg, correções são aplicadas inicialmente a todas as intensidades medidas para a obtenção dos chamados dados reduzidos. A correção por absorção poderia ser feita se o monocristal apresentasse uma forma regular. Essa correção é em geral muito pequena quando a molécula contém apenas átomos leves, como é o caso das moléculas orgânicas, e o cristal é pequeno e aproximadamente equidimensional. Por essas razões a correção de absorção não é em geral feita, podendo, entretanto, ser realizada empiricamente na fase final de refinamento da estrutura.

### 2.4.3 Fatores de escala e de temperatura médios

Para avaliar os fatores de escala e de temperatura aproximados A. J. C. Wilson [7], adotando algumas hipóteses simplificadoras tais como admitir, no cálculo dos fatores de estrutura todos os átomos iguais e com o mesmo fator de vibração térmico isotrópico B, e um mesmo fator de escala K para todo o intervalo de medida da intensidade, chegou à seguinte expressão

$$\frac{I}{\sum_j f_j^2} = \frac{\exp -2B \sin^2 \theta / \lambda^2}{K}$$
$$\ln \frac{I}{\sum_j f_j^2} = -\ln K - 2B \sin^2 \theta / \lambda^2$$

Assim lançando-se em gráfico  $\ln \frac{I}{\sum_j f_j^2}$  tomados em subsequentes pequenos intervalos de  $\theta$  contra  $\sin^2 \theta / \lambda^2$  deve-se obter uma linha reta cuja inclinação fornece o valor de B e o intercepto o fator de escala.

### 3. O método de tentativa e erro

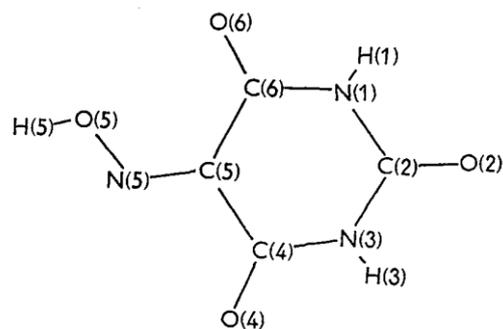
O primeiro método utilizado largamente para a solução do problema da fase foi o método de tentativa e erro que consiste, essencialmente, na proposta de um modelo para a distribuição dos átomos ou moléculas na cela unitária respeitadas várias condições e conhecimentos acerca da estrutura molecular do material em estudo. Com as coordenadas atômicas do modelo calculam-se os fatores de estrutura das reflexões observadas e calcula-se o Índice de discordância definido como

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}| - |F_{calc}|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad \text{Eq. 14}$$

Se esse valor for suficientemente baixo pode-se passar à fase seguinte que corresponde ao cálculo da densidade eletrônica usando o conjunto de fases prováveis fornecidas pelo modelo. Caso contrário deve-se propor outro modelo.

#### 3.1 Exemplo

Darei como exemplo a determinação da estrutura do ácido violúrico por mim determinada sob a supervisão do Prof. Brian Craven. [3]. O ácido violúrico é um barbiturato cuja fórmula é



**Figure 4:** Estrutura do ácido violúrico

A análise do seu difratograma revelou que ele cristaliza no sistema ortorrômbico, grupo espacial  $Cmc2_1$ , dimensões da cela unitária:  $a=6,224(2)$  Å,  $b=14,373(2)$  Å e  $c=7,508(2)$  Å,  $V=671,0$  Å<sup>3</sup>, densidade medida  $D_m=1,726$  e densidade calculada  $D_c=1,733$  o que revela a presença de quatro moléculas na cela unitária. 425 reflexões  $hkl$  simetricamente independentes foram registradas fotograficamente. A análise desses dados levou à conclusão de que a unidade assimétrica da cela unitária deveria conter apenas uma molécula com todos os seus átomos situados em uma posição especial coincidente com o plano de reflexão  $m$  perpendicular ao eixo  $a$  em  $x=0$  e  $\frac{1}{2}$  e distantes entre si de  $a/2 = 3,114$  Å, compatível com valores esperado entre moléculas planas paralelas. O uso do Método de Tentativa e Erro consistiu então em obter um modelo da molécula em cartolina e o plano  $bc$  na mesma escala e tentar distribuir os modelos moleculares respeitando as operações de simetria e evitando superposição dos modelos moleculares. Vários modelos para a estrutura foram encontrados e testados calculando-se as amplitudes e fases resultantes para cada modelo usando as coordenadas dos átomos de cada modelo. Usando a Eq. 7 comparou-se os módulos dos fatores de estrutura calculados pelo modelo e os observados experimentalmente e encontrou-se um razoável acordo para um dos modelos com um  $R$  igual a 32%. Tomando-se então os fatores de estrutura experimentais e as fases calculadas para o modelo calculou-se um mapa de densidade eletrônica que revelou máximos que correspondiam aproximadamente à estrutura molecular. As coordenadas obtidas para os átomos no mapa foram usadas para novo cálculo de fatores de estrutura e fases e com as novas fases repetiu-se o processo várias vezes até que toda a estrutura molecular ficou claramente definida. Além da molécula surgiu no mapa um inesperado pico que foi atribuído a uma molécula de água que, como se vê na Figura 5 faz quatro ligação de hidrogênio entre várias moléculas de ácido violúrico simetricamente relacionadas. O ineditismo desse fato levou B. Craven a devotar um grande esforço para elucidar melhor esse tipo de ligação, uma vez que não era possível determinar exatamente a posição dos átomos de hidrogênio no mapa de densidade eletrônica devido ao



seriam bem maiores que o dos átomos individuais levando a uma inevitável superposição, uma vez que o volume da cela unitária de Patterson é igual ao da densidade eletrônica. Caso todos os átomos tenham aproximadamente o mesmo número de elétrons esse mapa seria extremamente difícil de interpretar. Entretanto as coisas podem ficar mais claras se tivermos na molécula um átomo bem mais pesado como por exemplo um átomo de iodo em uma molécula orgânica que contenha carbono e oxigênio pois Iodo tem 53 elétrons enquanto o carbono e o oxigênio apenas seis e oito. Assim os máximos deveriam ter os seguintes valores:

$$I - I = 2.809$$

$$C - I = 318$$

$$O - I = 424$$

$$C - C = 36$$

$$C - O = 48$$

$$O - O = 64$$

Assim o pico I - I deveria se destacar e evidenciar a distância entre esses dois átomos. Uma análise das operações de simetria a que está sujeito o átomo de Iodo no Grupo Espacial em que a molécula cristaliza permite determinar suas coordenadas e iniciar a resolução da estrutura calculando as fases e amplitudes fornecidas apenas pela contribuição do Iodo e prosseguir na resolução da estrutura como descrito no método das tentativas calculando-se densidade eletrônica com os módulos dos fatores de estrutura experimentais e fases fornecidas pelo Iodo.

Para a aplicação do método de Patterson foram desenvolvidos muitos estratagemas auxiliares para a segura interpretação dos mapas que não vamos discutir neste texto. Podemos, entretanto, afirmar que esse método foi bastante utilizado até meados da década de 1960 para a solução da estrutura de pequenas moléculas (até cerca de 100 átomos sem contar os hidrogênios) usando derivados com átomos pesados e continua útil ainda hoje na determinação de estruturas de proteínas com a inclusão, por vários métodos, de um ou mais átomos pesados nos monocristais. Devido ao grande progresso, tanto na qualidade das medidas como nos recursos computacionais, foram concebidas variantes metodológicas como a substituição isomórfica múltipla (MIR) de átomos pesados nas moléculas de proteínas para a determinação das fases de um número razoável de fatores de estrutura que permitem tanto o cálculo de mapas de densidade eletrônica como sua interpretação [5].

### 3.3 Métodos Diretos.

As primeiras tentativas para encontrar relações entre as fases de várias reflexões se deve a Harker e Kasper [6] baseadas na desigualdade de Cauchy

$$\left| \sum_{j=1}^N a_j b_j \right|^2 \leq \sum_{j=1}^N |a_j|^2 \sum_{j=1}^N |b_j|^2$$

aplicada aos fatores de estrutura unitário para um cristal do grupo espacial  $P\bar{1}$ , triclinico centro simétrico, onde as fases como se vê nas Eqs. 5 e 6 somente podem ter valores zero ou  $\pi$ , permite chegar à seguinte desigualdade entre fatores de estrutura unitários,

$$U_H^2 \leq \frac{1}{2}(1 + U_{2H}).$$

Assim, se

$$U_H^2 > \frac{1}{2}$$

Teremos:

$$U_{2H} \geq 0$$

e a fase de  $U_{2H}$  terá que ser zero.

Este tipo de desigualdade somente pode ser usado para cristais centrossimétricos. e pode gerar outras desigualdades dependendo do grupo espacial do cristal. Entretanto gera poucos sinais e por essa razão não foi muito utilizada. Um grande progresso surge com as descobertas feitas por J. Karle e H. Hauptmann quando mostraram que sempre que os índices de Miller de três reflexões fortes cujos  $hkl$  envolvidos são linearmente dependentes vale a seguinte relação denominada um triplete:

$$\phi_{-H-K} + \phi_H + \phi_K + 2 \cdot 2\pi = 0 \quad (\text{modulo } 2\pi).$$

Em que  $H = h_1k_1l_1$ ,  $K = h_2k_2l_2$

Vemos então que se forem conhecidas ou arbitradas as fases de duas reflexões pode-se obter a fase de uma terceira cujos índices de Miller forem linearmente dependentes dos primeiros, exemplo as reflexões (100), (110) e (010). Essas relações são altamente prováveis quando as três reflexões envolvidas forem todas fortes e a força da relação é função do produto das intensidades das três reflexões envolvidas. Por essa razão, em vez de se utilizar diretamente as amplitudes dos fatores de estrutura observados, os mesmos são previamente transformados em fatores de estrutura normalizados definidos pela Eq. 12 aumentando assim o número de reflexões úteis para a formação dos tripletes.

Posteriormente Hauptmann estende essas relações para conjunto de quatro ou mais reflexões de acordo com o mesmo critério formando quartetos e quintetos de reflexões em que os índices de Miller são linearmente dependentes.

Obtidos os primeiros conjuntos de fases eles devem ser usados para calcular os mapas de densidade eletrônica utilizando os módulos dos fatores de estrutura experimentais e as

fases obtidas pelo Método Direto. Seguindo a rotina já descrita no Método de Tentativa e Erro, os mapas de densidade eletrônica são analisados procurando identificar os picos com posições atômicas que deverão, em conjunto, revelar a estrutura molecular do material em estudo.

Esse processo foi muito aperfeiçoado quando se decidiu atribuir valores de fases para algumas reflexões. A cada reflexão se atribui valores de fases igualmente espaçados tais como zero, 45, 90 e 135 graus. Se fizermos isso com três reflexões teremos 64 possíveis combinações de fase e para cada uma deve-se calcular e analisar a ocorrência de picos e sua correspondência com a estrutura molecular esperada. Essa, a primeira vista, parece uma tarefa demorada e tediosa! Entretanto usando os modernos computadores e os excelentes softwares existentes toda essa análise pode ser feita em muito pouco tempo. Por essa razão os Métodos Diretos evoluíram de uma maneira fantástica e são atualmente os preferidos para a determinação de estruturas das chamadas pequenas moléculas que podem atingir até cerca de 500 átomos!

Os mapas de densidade eletrônica fornecem a estrutura molecular e a estrutura cristalina que corresponde ao arranjo tridimensional das moléculas no sólido cristalino. Assim, para obter tais mapas com resolução atômica temos que levar em conta a difração pelas famílias de planos de alto  $hkl$  e de acordo com a lei de Bragg essas correspondem a pequenos espaçamentos interplanares.

#### **4. Estrutura de Proteínas**

O uso dos Métodos Diretos só é possível com cristais muito bem ordenados e o bom resultado da determinação de estrutura passa inicialmente por obter cristais de alta qualidade. Levantamos esse problema para concluirmos que o grande avanço trazido pelos métodos diretos ainda não é suficiente para seu uso rotineiro na determinação de estrutura de proteínas e outras macromoléculas, principalmente devido ao fato de essas substâncias não fornecerem monocristais adequados. Uma das causas é que normalmente seus cristais contém grande quantidade de solvente que é, inclusive, essencial para a manutenção da integridade da estrutura molecular. Assim para o caso das proteínas usa-se extensivamente o método de Patterson e vários outros métodos que utilizam o conhecimento de proteínas com estrutura já conhecida e que apresentem um grau razoável de homologia com a proteína em estudo.

Um grande esforço tem sido realizado para deduzir o enovelamento molecular das proteínas a partir do conhecimento da sequência dos aminoácidos que a compõem, a

chamada estrutura primária. Essa possibilidade foi sugerida por Christian B. Anfinsen, do National Institutes of Health, Bethesda, USA, que ganhou o prêmio Nobel de Química em 1972 por sua contribuição para o entendimento da conexão entre estrutura química e a ação catalítica do centro ativo da molécula de ribonuclease. Baseado em sua experiência nas propriedades químicas de proteínas ele expressou sua convicção de que a conformação de uma proteína deve representar o estado de equilíbrio termodinâmico mais estável no ambiente intracelular. Assim se fossem conhecidos todos os potenciais de interação entre todos os átomos da proteína seria possível deduzir a respectiva conformação molecular. Ora, isto exige considerar um grande volume de interações que somente depois do advento dos modernos computadores se tornou viável. Muitos pesquisadores têm perseguido esse objetivo e um resultado de excelente qualidade foi obtido em dezembro de 2020 pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Inteligência Artificial DeepMind que tem sede em Londres e pertence à GOOGLE. Esse notável feito mereceu grande divulgação pela imprensa [8].

Esse resultado deverá ter importantes consequências na área de determinação experimental da estrutura de proteínas por difração de raios X, pois o modelo estrutural teórico poderá ser inserido na cela unitária e usado na elucidação estrutural que, se bem sucedida, confirmará o modelo molecular teórico proposto. Assim evita-se a necessidade da obtenção de múltiplos derivados com átomos pesados para aplicação do Método de Patterson.

## **5. Refinamento das estruturas**

Quando o problema da fase estiver resolvido os mapas de densidade eletrônica devem ter resolução atômica e apresentar todos, ou quase todos, os átomos e, então inicia-se uma nova fase do trabalho que é o ajuste mais fino dos valores das intensidades observadas com os das calculadas. Para tanto usa-se extensivamente o método dos mínimos quadrados que através de vários ciclos de refinamento conduz finalmente aos valores muito precisos das coordenadas atômicas e de seus fatores de vibração térmica anisotrópicos e de todas as distâncias e ângulos das ligações intra e intermoleculares. O conjunto de todas essas informações são úteis para o entendimento das propriedades químicas e físicas dos materiais e ao planejamento de modificações que permitam melhorá-las de acordo com os interesses de cada área científica e/ou tecnológica a que o pesquisador, ou equipe de pesquisadores, se dedique.

## **Agradecimentos**

A autora agradece ao CNPq pela concessão de sua bolsa de pesquisadora sênior Proc. No. 306036/2017-24.

## **Bibliografia**

- [1] A. H. Compton e R. L. Doan; X-ray spectra from a ruled reflection grating; Proc. Nat. Acad. Of Science, Physics, September 1925.
- [2] Andre Authier, Early Days of X-ray Crystallography, pg. 158, International Union of Crystallography, Oxford University Press
- [3] B.M. Craven, Y. Mascarenhas; The Crystal Structure of perdeuterated Violuric Acid Monohydrate: The X-ray Diffraction Analysis, Acta Cryst (1964), 17, 407.
- [4] B.M. Craven, W. J. Takei The Crystal Structure of perdeuterated Violuric Acid Monohydrate: The Neutron Diffraction Analysis, Acta Cryst. 17, 415 (1964), 17, 407.
- [5] Blundell, T, L. and Johnson L. N.; Protein Crystallography, Chapters 8 to 14 Academic Press, 1976
- [6] Shenk, H. An Introduction to Direct Methods, published for the International Union of Crystallography by University College Cardiff Press, Cardiff, Wales.
- [7] A.J.C. Wilson, Nature150, 152 (1943)
- [8] <https://www.bbc.com/news/science-environment-55133972>.