

Altri Metodi Cristallografici

Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche
Curriculum Nanobiotecnologie

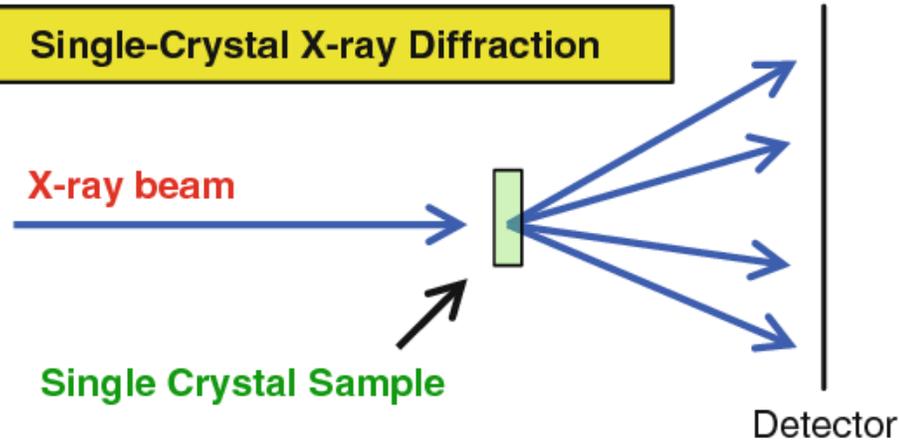
A.A. 2020-21

Diffrazione da Polveri

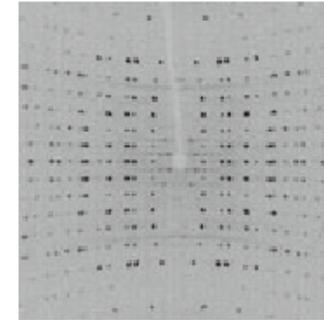


Diffrazione da cristallo singolo e polveri microcristalline

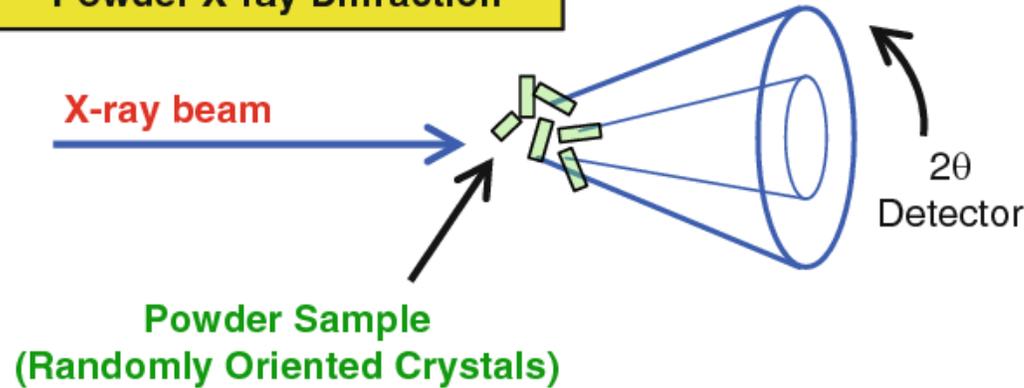
Single-Crystal X-ray Diffraction



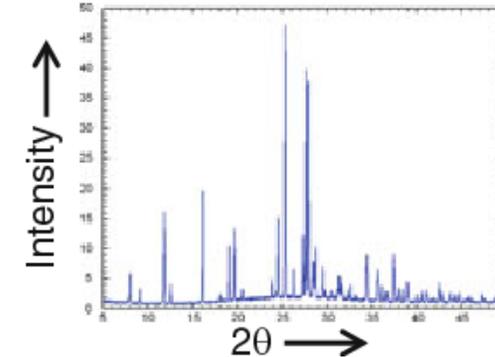
Measure 3-Dimensional Diffraction Data



Powder X-ray Diffraction



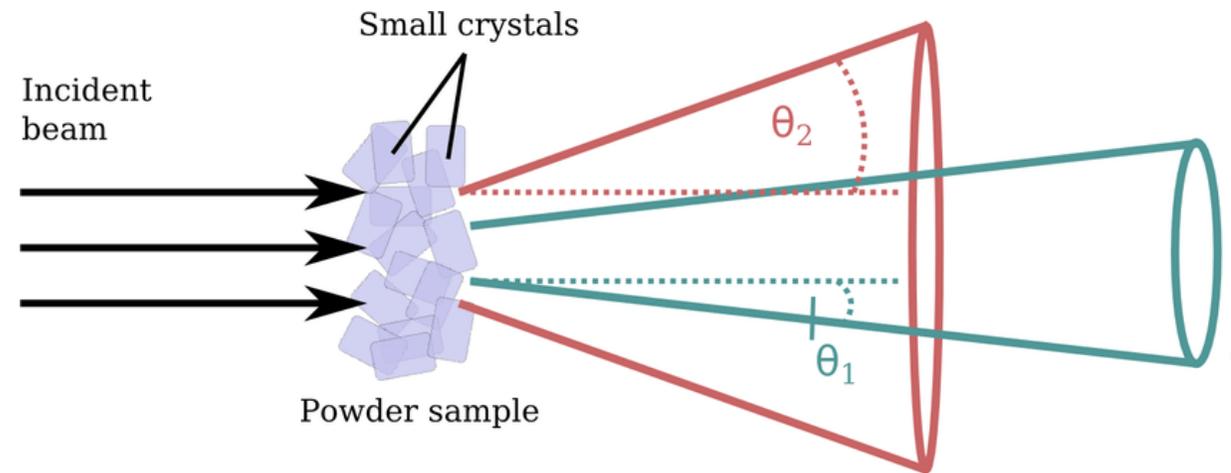
Measure 1-Dimensional Diffraction Data (Peak Overlap)



Diffrazione da polveri

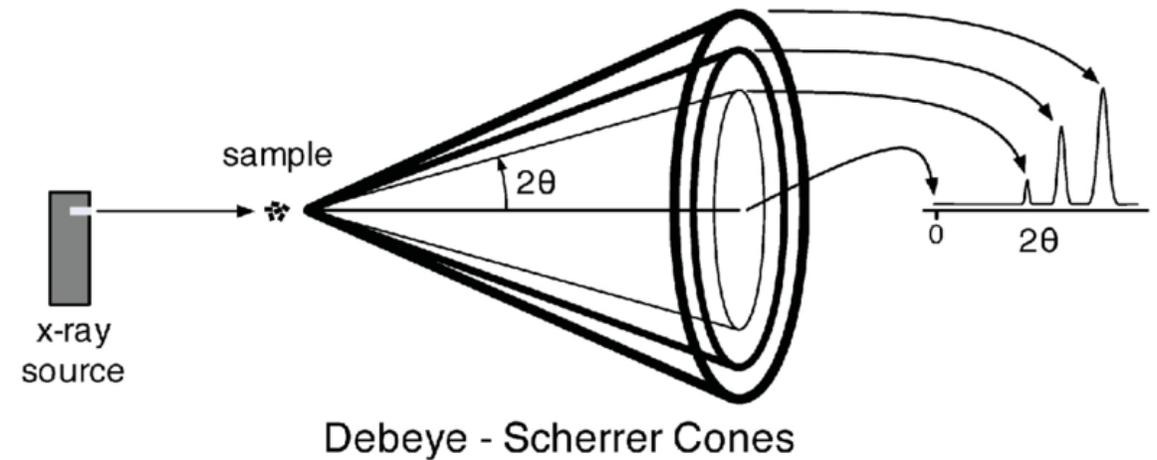
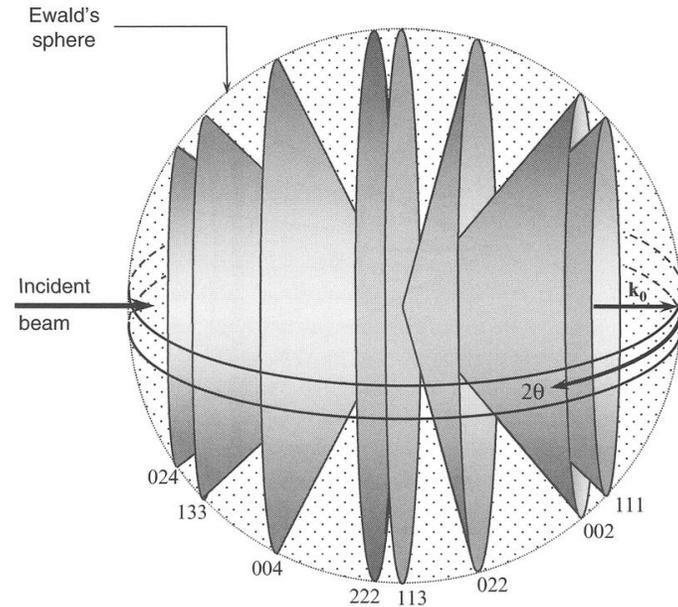
Nella diffrazione da cristallo singolo in cui i raggi sono diffratti da un singolo cristallo opportunamente orientato in modo da soddisfare la legge di Bragg.

Nella diffrazione da polveri ho un **campione costituito da un insieme di tanti microcristalli orientati casualmente e quindi in tutte le orientazioni possibili. Tutti i cristalli si trovano in condizioni di diffrazione secondo Bragg, ma con diversi angoli di diffrazione ϑ .**



Per il medesimo angolo di diffrazione, i microcristalli pur mantenendo lo stesso angolo ϑ con i raggi-X incidenti, possono produrre raggi diffratti con lo stesso valore di ϑ ma con direzioni diverse, quindi **distribuiti secondo un cono di diffrazione, questo genera la formazione di anelli di diffrazione**

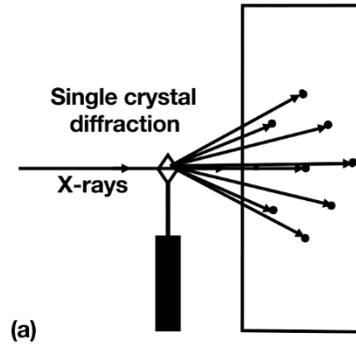
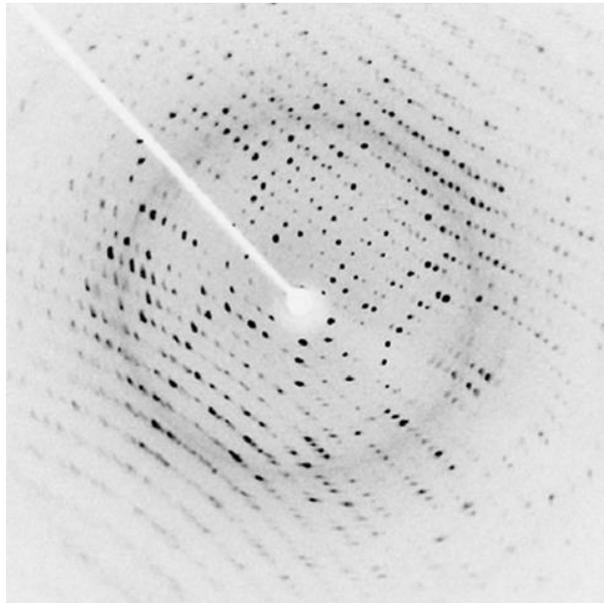
Coni di diffrazione



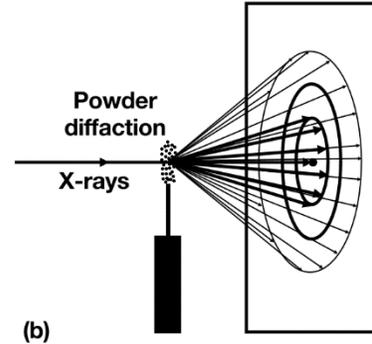
Poiché ho una orientazione casuale dei microcristalli, ogni singolo piano di Bragg, genera un cono di diffrazione. Ogni cono di diffrazione è caratterizzato da un angolo 2ϑ .

Il cono di diffrazione è intercettato da un detector (ad 1 o 2 dimensioni) e l'intensità diffratta è convertita in un grafico **angolo (di diffrazione) / intensità diffratta**.

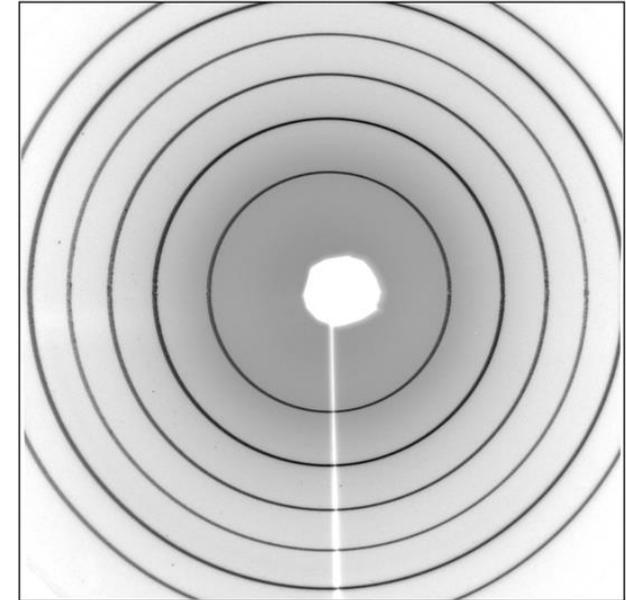
Pattern di diffrazione da polveri



Diffrazione da
Cristallo Singolo



Diffrazione
Da Polveri



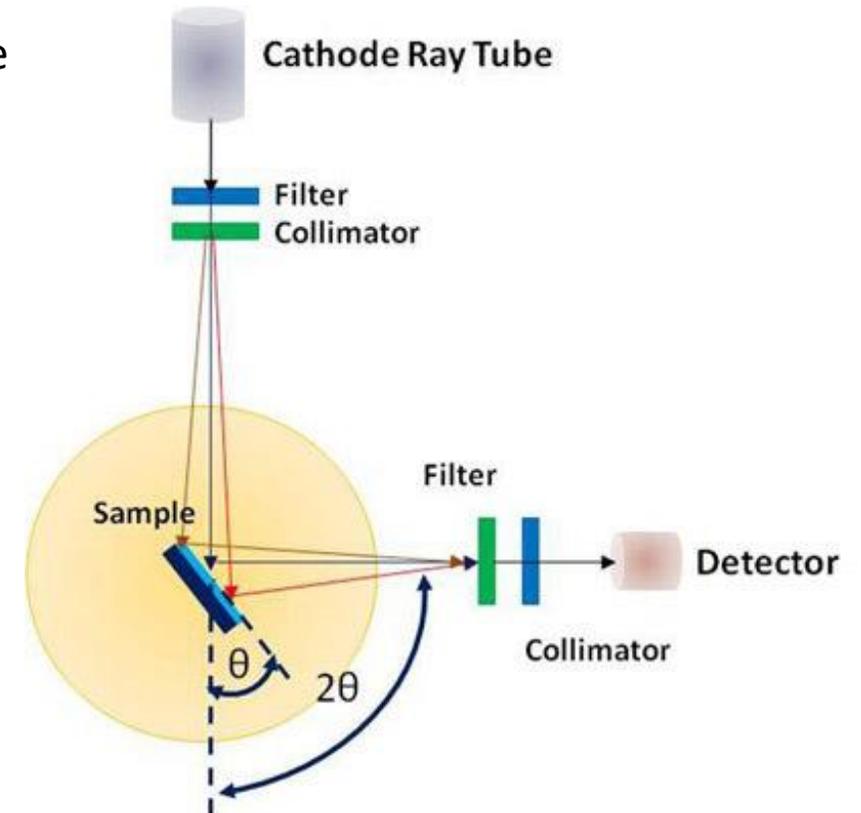
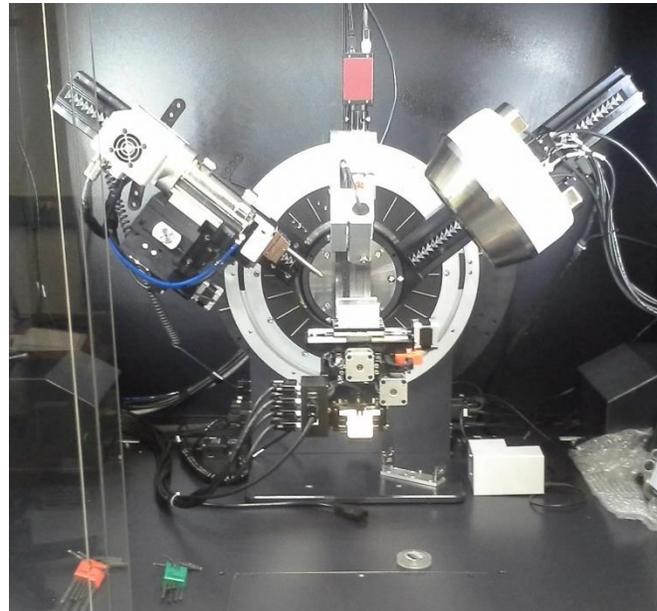
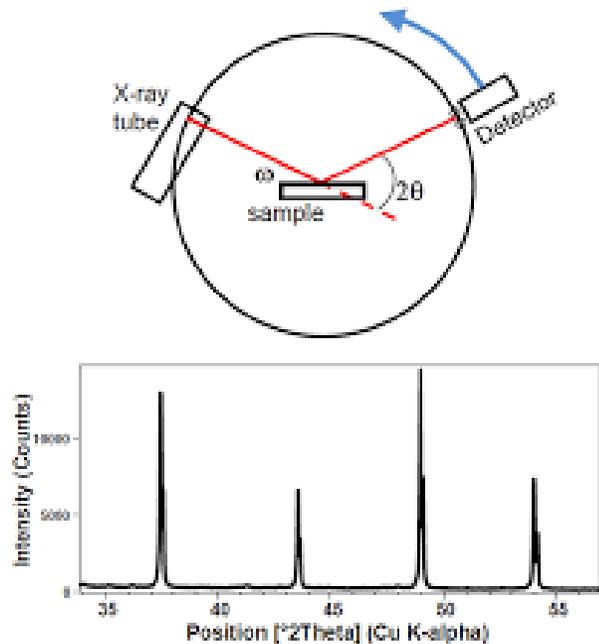
L'immagine di diffrazione prodotta da un campione di microcristalli disordinati (polveri) è molto diverso da quello prodotto da un cristallo singolo.

Nella diffrazione da polveri ho degli 'anelli' di diffrazione e non più degli 'spot' di diffrazione.

Ogni anello di diffrazione ha un valore di angolo di diffrazione ϑ specifico.

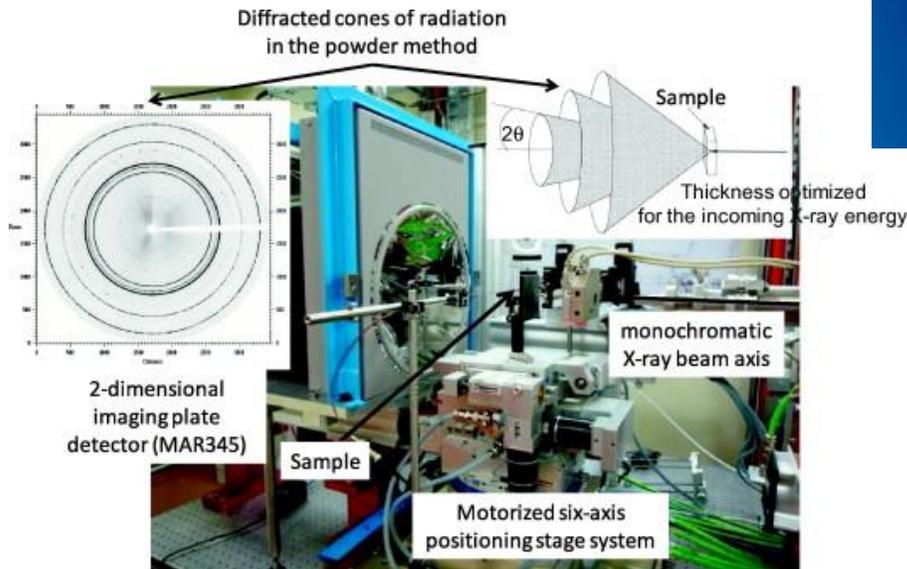
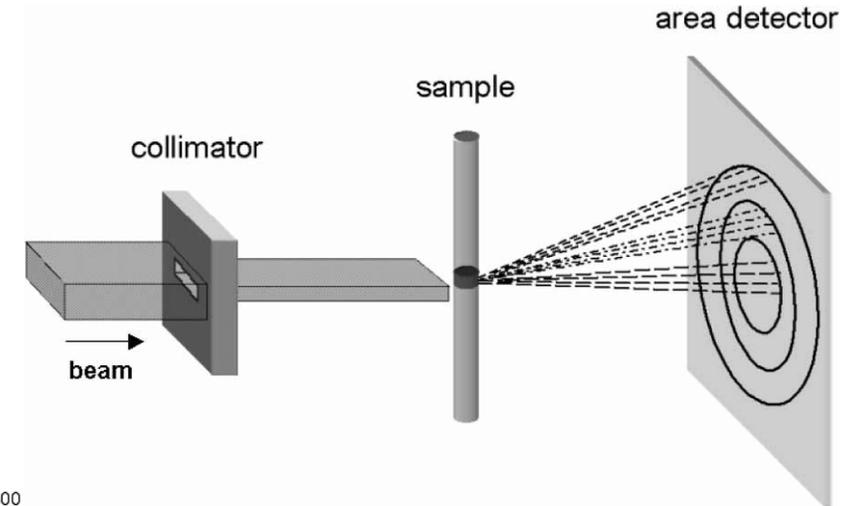
Strumentazione per diffrazione da polveri -riflessione

Una modalità classica per acquisire uno spettro da polveri consiste nel depositare la polvere su un supporto piano (holder), irradiare con i raggi-X e acquisire i raggi diffratti ai diversi angoli ϑ con un rivelatore puntuale. Si otterrà così uno spettro di intensità in funzione dell'angolo ϑ . Questo metodo è detto **'in riflessione'**

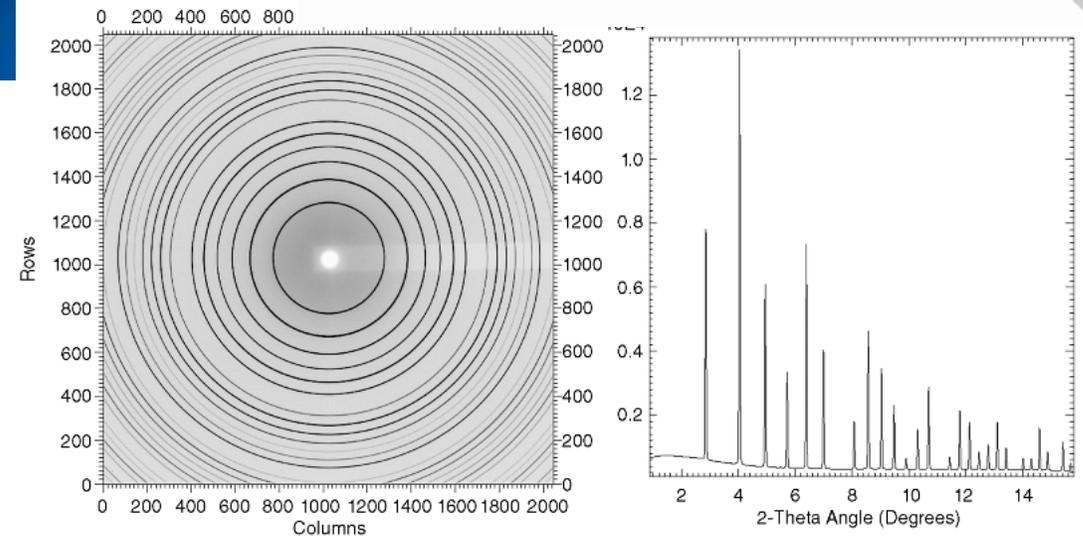


Strumentazione per diffrazione da polveri - trasmissione

Una modalità diversa, detta **'in trasmissione'** consiste invece nel introdurre il campione in un capillare sottile, e acquisire l'intero cono di diffrazione con un detector bidimensionale (imaging plate, CCD). Gli anelli di diffrazione saranno integrati per avere un **grafico intensità/angolo(2θ)**

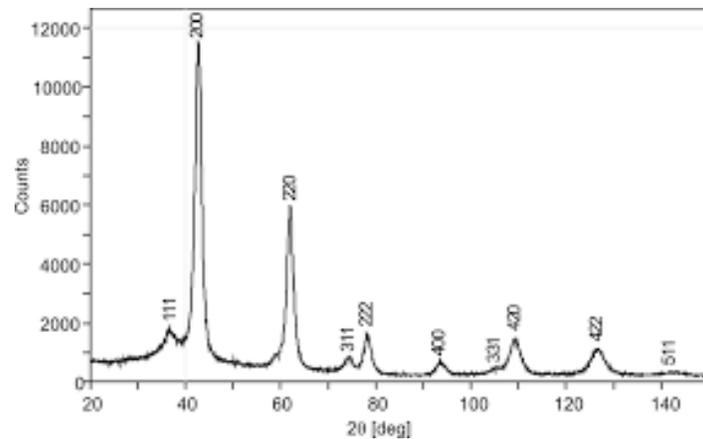


(a)

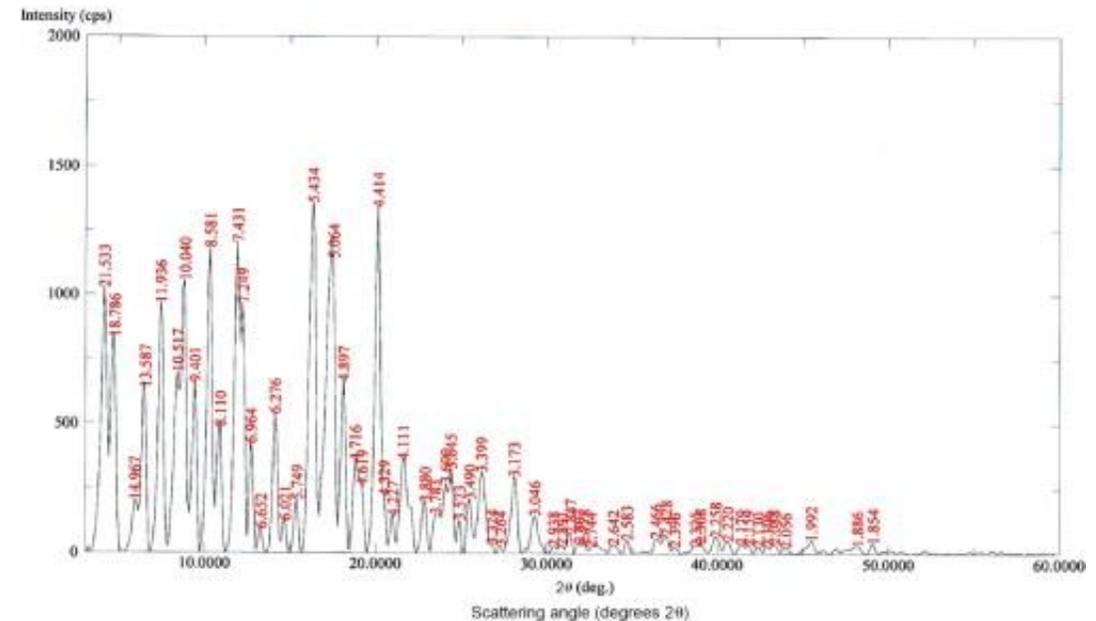


Pattern di diffrazione da polveri

A differenza della diffrazione da cristallo singolo, in cui determino l'intensità diffratta da ogni singolo piano di Bragg, nella diffrazione da polveri ho solo il valore dell'intensità diffratta in funzione dell'angolo di Bragg ϑ (generalmente si preferisce indicare 2ϑ).



Per strutture cristalline semplici è relativamente facile assegnare ogni picco di intensità ad un preciso piano di Bragg. In tal modo determino la cella unitaria (indicizzazione)



Per strutture cristalline più complesse, ho più picchi e anche sovrapposizione più o meno grande tra i vari picchi. L'indicizzazione è più complessa.

Utilizzo del metodo della diffrazione da polveri

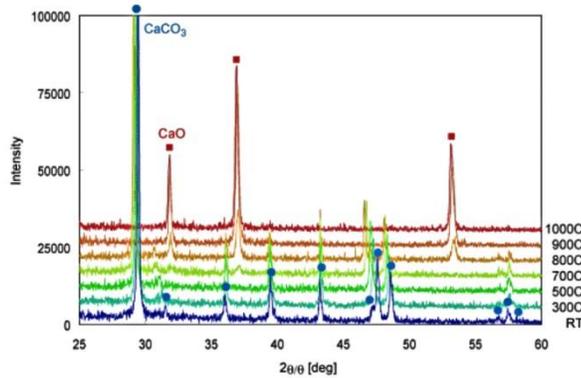
Il metodo della diffrazione da polveri è tecnicamente **molto semplice e molto rapido**, basta irradiare il campione di polveri (**policristallino**) con i raggi-X e acquisire i raggi diffratti, per avere tutti i dati di diffrazione disponibili. In linea di principio non sono costretto a ruotare il campione.

In virtù della **semplicità** e **rapidità** di acquisizione dei dati, il metodo delle polveri è largamente usato nella scienza dei materiali.

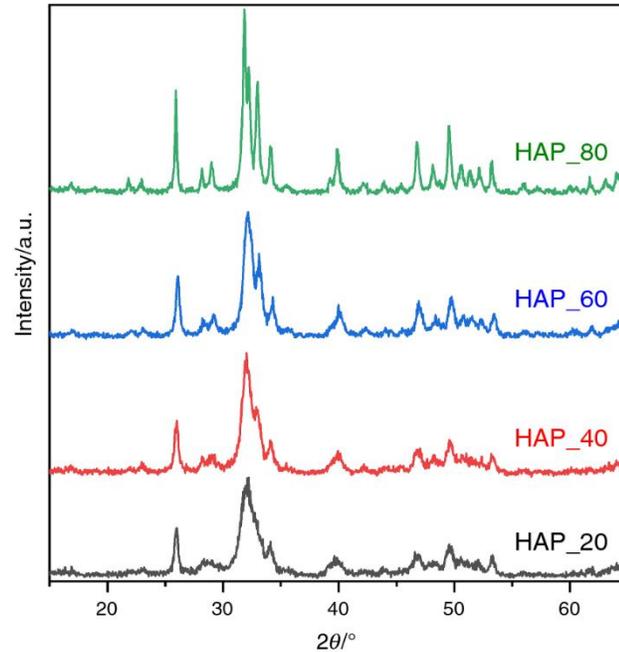
Tra gli usi più comuni:

- Studio di materiali in condizioni chimico-fisiche diverse
 - Cristallinità
 - Identificazione di una sostanza
 - Composizione di una miscela
 - Comparazione di diverse preparazioni
 - Studi di polimorfismo (diversa cella unitaria)
 - Determinazione strutturale
-

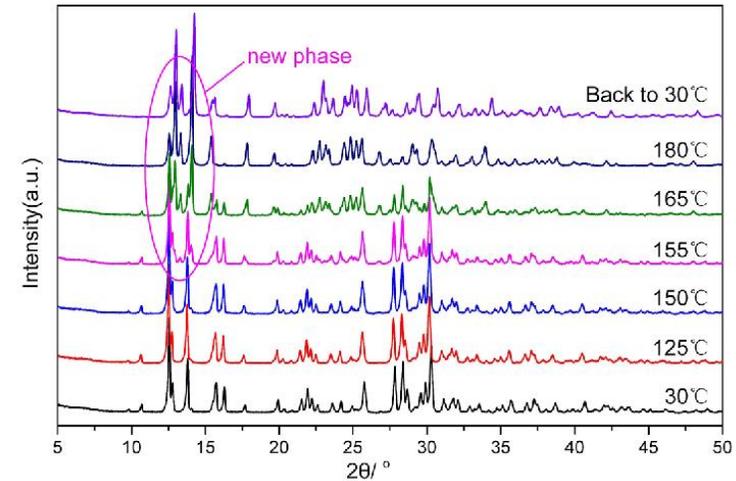
Diffrazione da polveri a diverse temperature



Degradazione del materiale
 $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO}$

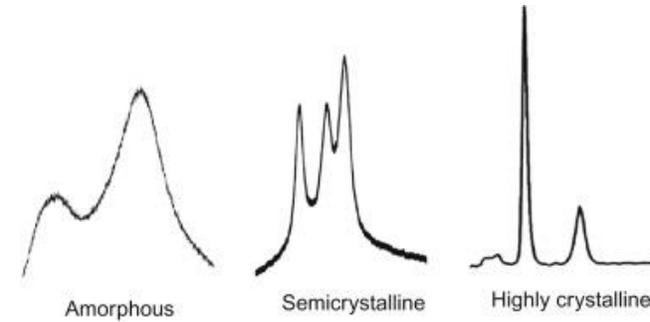
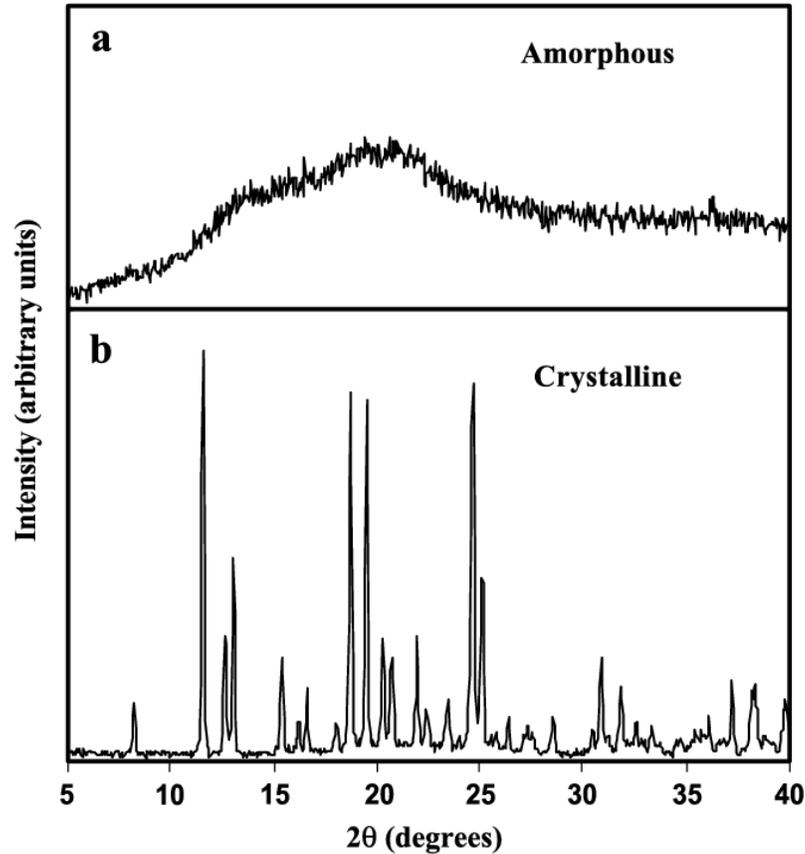


Presenza di impurezze al
variare della T
(nanosized hydroxyapatite)



Formazione di nuove forme
cristalline (Transizione di fase)

Cristallinità



La diffrazione da polveri è uno strumento rapido per valutare il grado di cristallinità di un dato composto (per esempio nello studio dei polimeri).

Un composto largamente amorfo (non-cristallino) non dà luogo a picchi di Bragg.

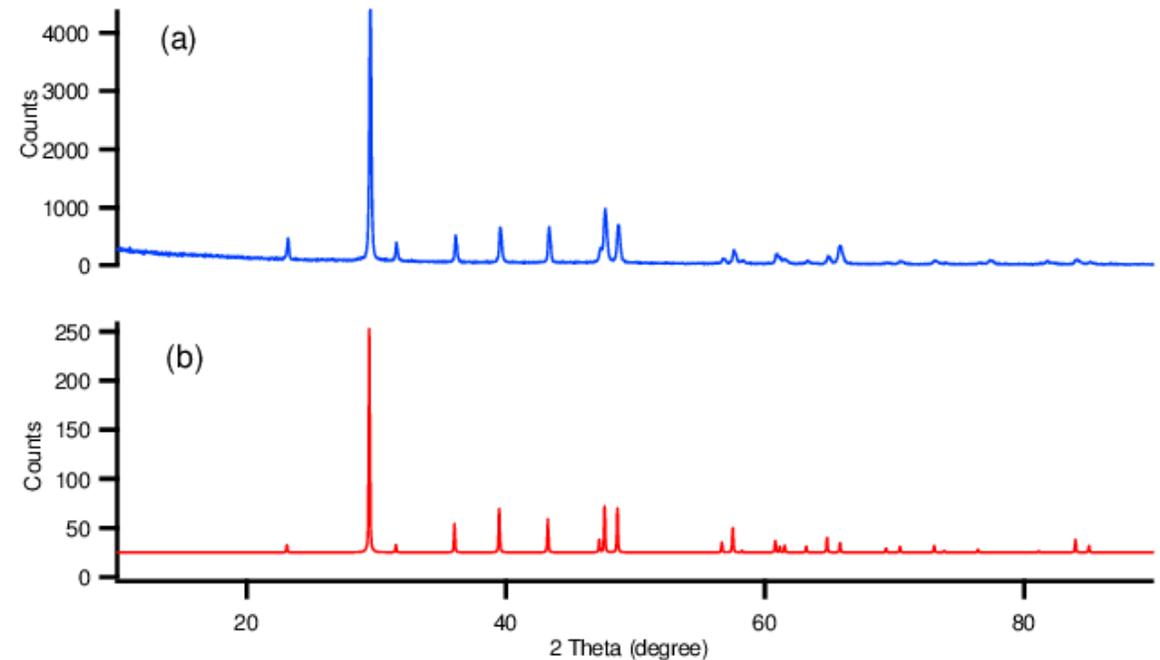
Diffrazione da polveri per l'identificazione di materiali

Esiste un database noto come **ICSD** che raccoglie i profili di spettro da polveri dei vari composti.

A partire dalle posizioni angolari (ϑ) dei picchi presenti in uno spettro da polveri di un campione (cristallino!) non noto, è possibile risalire alla natura chimica (e cristallografica) del campione, facendo una ricerca nel database ICSD.

Le posizioni dei picchi nel campione incognito e nella struttura nota (presente in ICSD), devono combaciare.

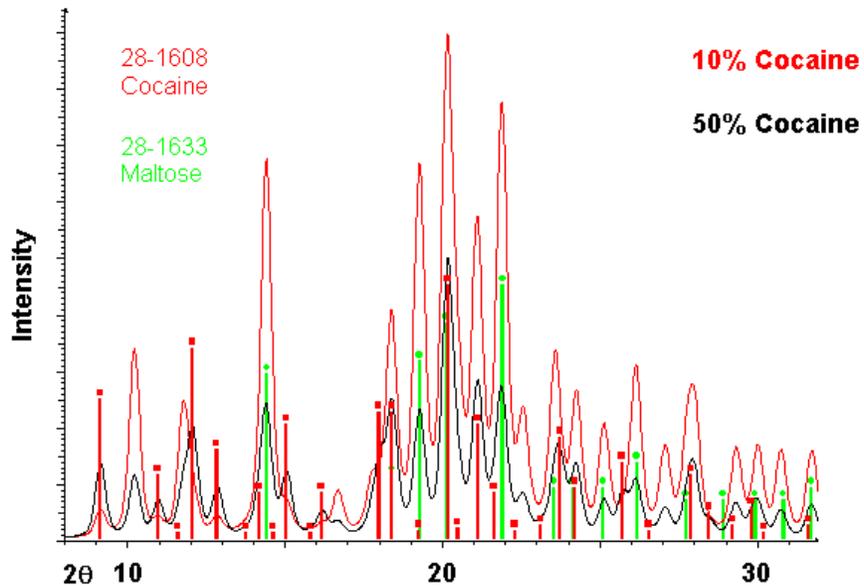
Profilo di polveri per il Campione sperimentale



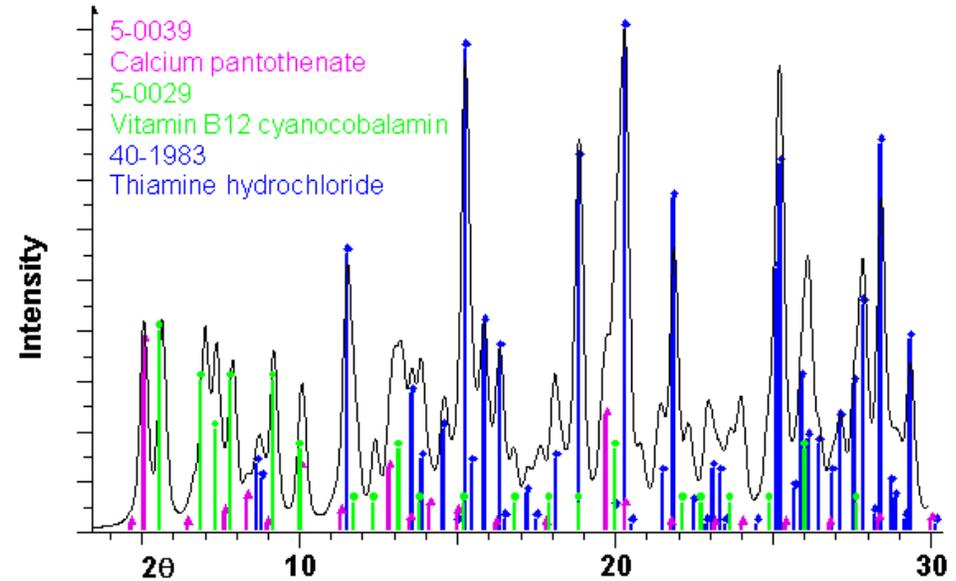
Profilo di polveri del CaCO_3 nel database ICSD

Phase Match qualitativo e quantitativo

Facendo ricorso al database ICSD e con opportuni software di ricerca e analisi, è possibile eseguire un'analisi qualitativa (**Phase Match**) e quantitativa dei vari componenti cristallini di un campione.



Spettri simulati, di un campione cocaina/maltosio al 50% (nero) o al 10% (rosso)



Analisi di una formulazione vitaminica

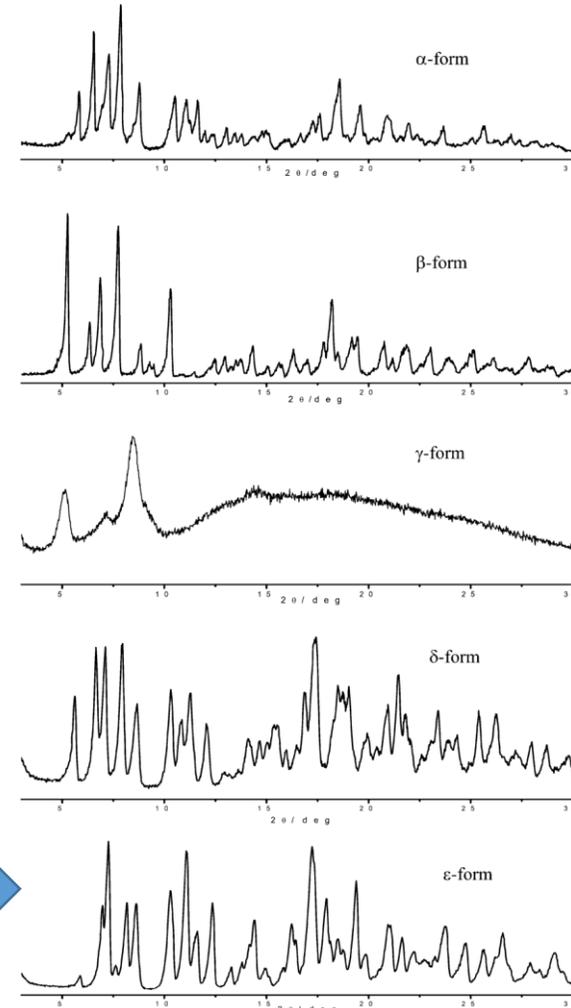
Polimorfismo

Nella preparazione di farmaci allo stato solido non è infrequente incontrare il problema del polimorfismo, ovvero il farmaco può assumere forme cristalline tra loro diverse.

La diversa forma cristallina non influenza la struttura della molecola, ma può influenzare la stabilità del preparato e soprattutto l'assorbimento del farmaco medesimo da parte dell'organismo.

La diffrazione da polveri è uno strumento molto potente per valutare qualitativamente e quantitativamente, la presenza dei vari polimorfi in una data preparazione.

Polimorfi della Rifaximina (antibiotico). Le forme δ , γ e amorfa sono assorbite dall'organismo meglio delle altre.



Comparazione di metodiche di preparazione

I diversi protocolli di preparazione di un farmaco, ma più in generale di qualsiasi materiale, può portare alla formazione di prodotti più o meno rispondenti alle proprietà desiderate.

Nel caso in cui il materiale in esame debba avere (o non avere!) una forma cristallina, la diffrazione da polveri offre un utilissimo strumento per valutare l'effetto del protocollo seguito sul prodotto finale.

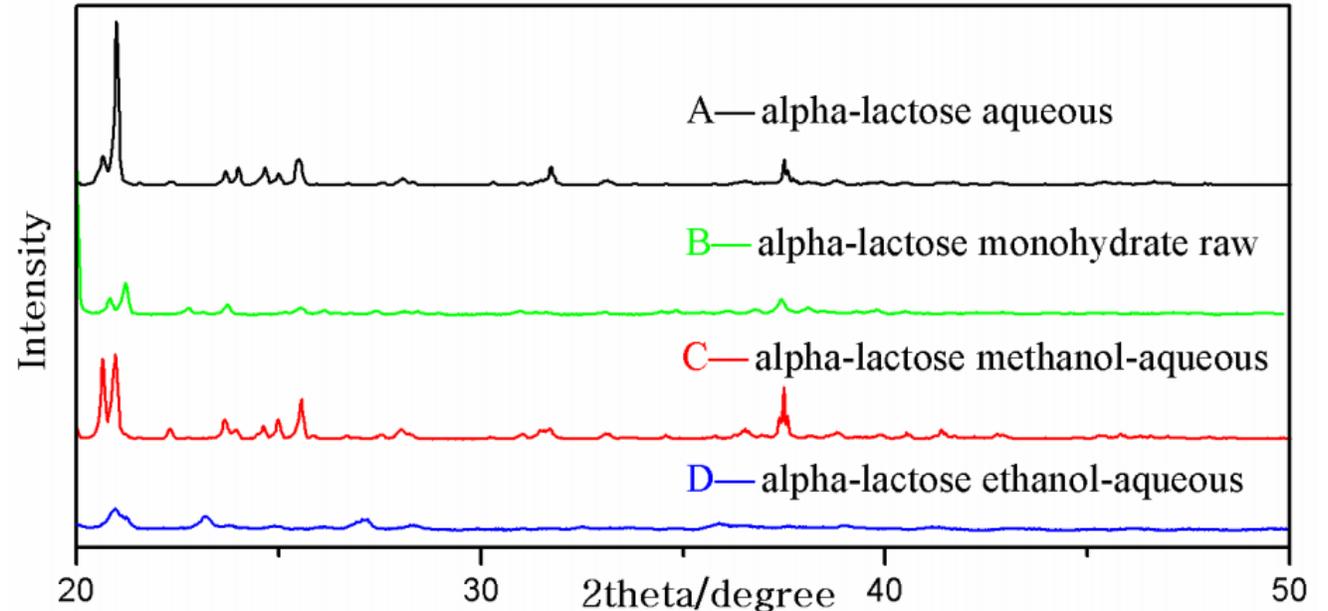


Fig.2. the X-ray patterns of $L\alpha \cdot H_2O$ subjected to different methods of dehydration.

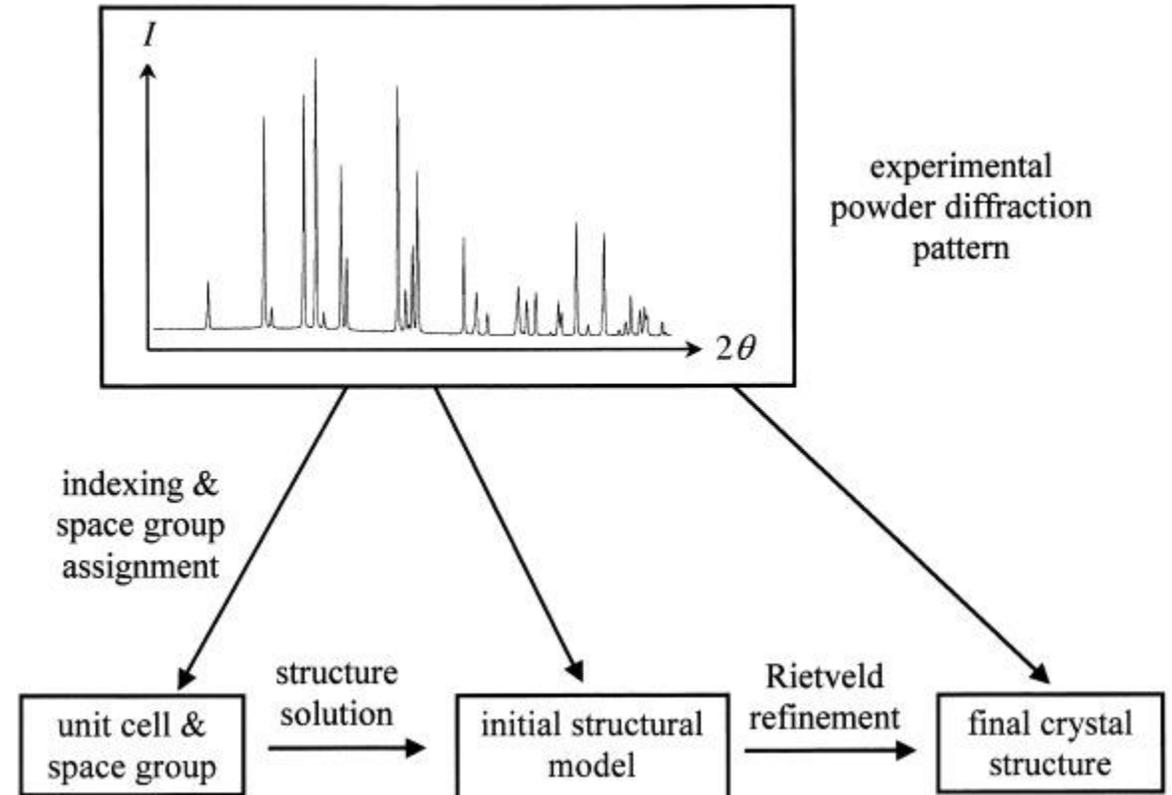
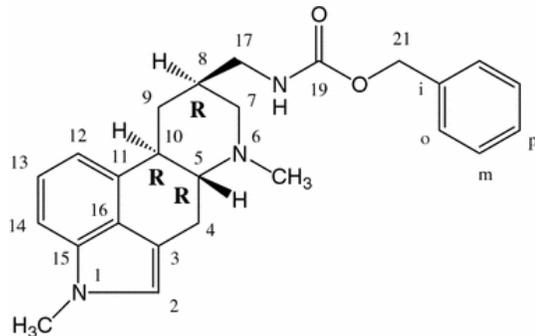
Confronto tra diversi metodi di disidratazione del lattosio. Alcuni approcci portano ad una 'amorfizzazione' del prodotto finale

Determinazione Strutturale

In alcuni casi è possibile determinare e ottimizzare (raffinare) la struttura cristallina a partire da uno spettro di polveri.

È un metodo applicabile a molecole relativamente piccole.

La procedura di raffinamento è basata sul fit dello spettro di polveri (**Metodo di Rietveld**)



Diffrazione da polveri e luce di sincrotrone

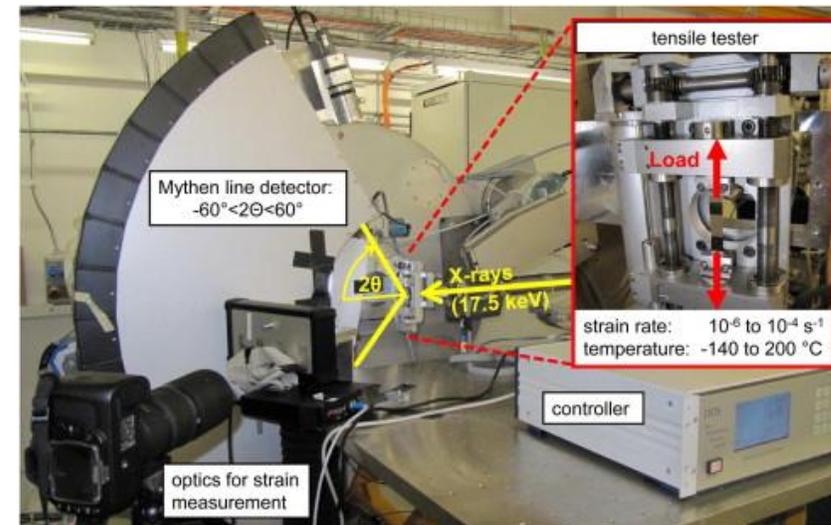
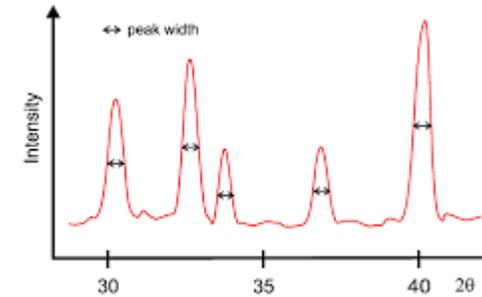
La luce di sincrotrone è di grande utilità nella diffrazione da polveri

- Bassa divergenza (picchi più stretti, meno sovrapposizioni)
- Elevata intensità del fascio incidente
- migliore rapporto S/N
 - ❖ Rapidità della misura
 - ❖ Lunghezza d'onda variabile
- λ variabile

Misure in condizioni 'non ambientali'

- Temperatura
- Pressione
- Umidità

Misure in funzione del tempo



Diffrazione da polveri e Proteine

La diffrazione da polveri non trova una larga applicazione in Biologia Strutturale:

Gli spettri delle macromolecole biologiche sono in genere troppo complessi per essere indicizzati correttamente.

Le macromolecole biologiche necessitano di uno stato fortemente idratato. Ottenere uno stato 'powder-like' non è facile.

Ci sono studi di 'nicchia' rivolti specialmente a complessi proteina ligando.

